Onderstaande tekst dient louter ter informatie en is juridisch niet bindend. De EU-instellingen zijn niet aansprakelijk voor de inhoud. Alleen de besluiten die zijn gepubliceerd in het Publicatieblad van de Europese Unie (te raadplegen in EUR-Lex) zijn authentiek. Deze officiële versies zijn rechtstreeks toegankelijk via de links in dit document

►B

VERORDENING (EG) Nr. 440/2008 VAN DE COMMISSIE

van 30 mei 2008

houdende vaststelling van testmethoden uit hoofde van Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH)

(Voor de EER relevante tekst)

(PB L 142 van 31.5.2008, blz. 1)

Gewijzigd bij:

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

▼B

VERORDENING (EG) Nr. 440/2008 VAN DE COMMISSIE

van 30 mei 2008

houdende vaststelling van testmethoden uit hoofde van Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH)

(Voor de EER relevante tekst)

Artikel 1

De in het kader van Verordening (EG) nr. 1907/2006 toe te passen testmethoden zijn opgenomen in de bijlage van deze verordening.

Artikel 2

De Commissie herbeziet indien nodig de in deze verordening vervatte testmethoden met het oog op de vervanging, de vermindering of de verfijning van proeven op gewervelde dieren.

Artikel 3

Alle verwijzingen naar bijlage V van Richtlijn 67/548/EEG worden gelezen als verwijzingen naar deze verordening.

Artikel 4

Deze verordening treedt in werking op de dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Zij is van toepassing met ingang van 1 juni 2008.

▼B

BIJLAGE

▼M6

Noot:

Voordat een van de volgende testmethoden voor het testen van een stof met meerdere bestanddelen, een stof van onbekende of wisselende samenstelling, een complex reactieproduct of biologisch materiaal (UVCB-stoffen) of een mengsel wordt gebruikt en daar waar de toepasbaarheid ervan voor het testen van stoffen met meerdere bestanddelen, UVCB-stoffen of mengsels niet in de desbetreffende testmethode is aangegeven, moet worden nagegaan of de methode geschikt is voor het beoogde regelgevingsdoel.

Indien de testmethode voor het testen van een stof met meerdere bestanddelen, een UVCB-stof of een mengsel wordt gebruikt, moet voor zover mogelijk voldoende informatie over de samenstelling van het mengsel beschikbaar worden gesteld, bijvoorbeeld aan de hand van de chemische identiteit van de bestanddelen, hun kwantitatieve aandeel in het mengsel en relevante eigenschappen van de bestanddelen.

▼B

DEEL A: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN

INHOUD

A.1. SMELT-/VRIESTEMPERATUUR

A.2. KOOKTEMPERATUUR

A.3. RELATIEVE DICHTHEID

A.4. DAMPSPANNING

A.5. OPPERVLAKTESPANNING

A.6. OPLOSBAARHEID IN WATER

A.8. VERDELINGSCOËFFICIËNT

A.9. VLAMPUNT

A.10. ONTVLAMBAARHEID (VASTE STOFFEN)

A.11. ONTVLAMBAARHEID (GASSEN)

A.12. ONTVLAMBAARHEID (CONTACT MET WATER)

A.13. PYROFORE EIGENSCHAPPEN VAN VASTE STOFFEN EN VLOEISTOFFEN

A.14. EXPLOSIEGEVAAR

A.15. ZELFONTBRANDINGSTEMPERATUUR (VLOEISTOFFEN EN GASSEN)

A.16. RELATIEVE ZELFONTBRANDINGSTEMPERATUUR VAN VASTE STOFFEN

A.17. OXIDERENDE EIGENSCHAPPEN (VASTE STOFFEN)

A.18. AANTALGEMIDDELD MOLECUULGEWICHT EN MOLECUULGEWICHTSVERDELING VAN POLYMEREN

A.19. GEHALTE VAN POLYMEREN AAN LAAGMOLECULAIRE BESTANDDELEN

A.20. OPLOS/EXTRACTIEGEDRAG VAN POLYMEREN IN WATER

A.21. OXIDERENDE EIGENSCHAPPEN (VLOEISTOFFEN)

A.22. NAAR LENGTE GEWOGEN MEETKUNDIG GEMIDDELDE VAN DE DIAMETER VAN VEZELS

A.23. 1-OCTANOL/WATER-VERDELINGSCOËFFICIËNT: LANGZAAM-ROERENMETHODE

A.24. VERDELINGSCOËFFICIËNT (N-OCTANOL/WATER), HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE-METHODE (HPLC)

A.25. DISSOCIATIECONSTANTEN IN WATER (TITRATIEMETHODE — SPECTROFOTOMETRISCHE METHODE — CONDUCTOMETRISCHE METHODE)

▼B

A.1. **SMELT-/VRIESTEMPERATUUR**

1. **METHODE**

De meeste van de beschreven methoden berusten op de testrichtlijnen van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in de referenties (2) en (3).

1.1. INLEIDING

De hier beschreven methoden en toestellen dienen te worden toegepast voor de bepaling van de smelttemperatuur van stoffen, ongeacht de mate van zuiverheid ervan.

De keuze van de methode hangt af van de aard van de te onderzoeken stof. De beperkende factor zal dan ook worden bepaald door de vraag of de stof al dan niet gemakkelijk, moeilijk of helemaal niet kan worden verpulverd.

Voor sommige stoffen is de bepaling van de vries- of stoltemperatuur zinvoller; ook de normen voor deze bepaling werden in de methode opgenomen.

Indien, als gevolg van de specifieke eigenschappen van de stof, geen van de bovenstaande parameters eenvoudig kan worden gemeten, kan een vloeipunt geschikt zijn.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Onder smelttemperatuur wordt verstaan de temperatuur, waarbij de faseovergang van vaste naar vloeibare toestand optreedt bij normale atmosferische druk; deze temperatuur komt in het ideale geval overeen met de vriestemperatuur.

Aangezien de faseovergang bij veel stoffen over een temperatuurbereik plaatsvindt, wordt deze vaak omschreven als het smelttraject.

Smelttemperatuur en -traject worden steeds uitgedrukt in K.

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-temperatuur, graden Celsius (^{o}C)

T: thermodynamische temperatuur, Kelvin (K)

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om van tijd tot tijd de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

In de referenties worden enige ijkstoffen genoemd (4).

▼B

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

De temperatuur (het temperatuurbereik), waarbij fase-overgang van vaste naar vloeibare of van vloeibare naar vaste toestand plaatsvindt, wordt bepaald. In de praktijk betekent dit dat een monster van de te onderzoeken stof bij atmosferische druk wordt verwarmd/gekoeld en dat de temperatuur in het begin- en het eindstadium van het smelt-/vriesproces wordt bepaald. Vijf onderzoekmethoden worden beschreven, namelijk: de capillaire methode, de methode met de verhitte plaat, de methode voor bepaling van de vriestemperatuur, thermische-analysemethoden, alsmede de bepaling van het vloeipunt (zoals ontwikkeld voor minerale oliën).

In sommige gevallen kan het gemakkelijker zijn de vriestemperatuur te bepalen in plaats van de smelttemperatuur.

1.4.1. **Capillaire methode**

1.4.1.1. *Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een vloeistofbad*

Een kleine hoeveelheid van de verpulverde stof wordt in een capillair gebracht en stevig aangedrukt. Het buisje wordt samen met een thermometer verwarmd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat de temperatuurstijging tijdens het eigenlijke smeltproces minder dan circa 1 K/min bedraagt. De temperatuur in het begin- en eindstadium van het smeltproces wordt bepaald.

1.4.1.2. *Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een metalen blok*

Als omschreven in 1.4.1.1, met dit verschil dat het capillair en de thermometer in een verwarmd metalen blok zijn aangebracht en door openingen in het blok kunnen worden waargenomen.

1.4.1.3. *Fotoceldetectie*

Het monster in het capillair wordt automatisch verhit in een metalen cilinder. Een lichtbundel wordt, via openingen in de cilinder, door de stof heen op een nauwkeurig geijkte fotocel gericht. De optische eigenschappen van de meeste stoffen veranderen van ondoorschijnend naar doorschijnend bij het smelten. Zodra de lichtintensiteit die de fotocel bereikt toeneemt, zendt deze een stopsignaal naar de digitale meter die de temperatuur afleest van een thermometer met platinaweerstand in de verwarmingskamer. Deze methode leent zich niet voor toepassing op sommige sterk gekleurde stoffen.

1.4.2. **Methode waarbij gebruik wordt gemaakt van een verhit oppervlak (hot stage)**

1.4.2.1. *De verhitte staaf volgens Kofler*

De verhitte staaf volgens Kofler bestaat uit twee stukken metaal die een verschillend warmtegeleidingsvermogen bezitten en elektrisch worden verwarmd. De staaf is zo ontworpen dat de temperatuur nagenoeg lineair langs de lengte ervan varieert. De temperatuur van de verhitte staaf kan variëren van 283 K tot 573 K; de temperatuur wordt met een voor elke staaf afzonderlijk geijkt ruitertje (met wijzer) afgelezen. Om een smelttemperatuur te bepalen, wordt de stof in een dunne laag direct op het oppervlak van de verhitte staaf gebracht. Binnen enkele seconden ontstaat er een scherpe scheidingslijn tussen de vloeibare en de vaste fase. De wijzer wordt ingesteld op de scheidingslijn, waarna de temperatuur kan worden afgelezen.

▼B

1.4.2.2. *Smeltpuntmicroscoop*

Er bestaan verschillende verhitte platen voor microscopische smelttemperatuurbepaling waarbij met zeer kleine hoeveelheden materiaal kan worden gewerkt. Bij de meeste verhitte platen wordt de temperatuur gemeten met een gevoelig thermokoppel, maar bij sommige met een kwikthermometer. Een toestel voor microscopische bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een verhitte plaat bestaat meestal uit een verwarmingskamer met een metalen plaat waarop het monster op een voorwerpglaasje wordt geplaatst, in het midden van de metalen plaat is een opening aangebracht zodat deze het licht van de microscoop doorlaat. Tijdens het gebruik wordt, om lucht uit de verwarmingskamer te weren, deze met een glazen plaat afgesloten.

De verwarming van het monster wordt ingesteld met een regelweerstand. Voor zeer nauwkeurige metingen bij optisch anisotrope stoffen kan gebruik worden gemaakt van gepolariseerd licht.

1.4.2.3. *De meniscusmethode*

Deze methode wordt speciaal toegepast voor polyamiden.

Bepaling van de temperatuur, waarbij de verplaatsing van een meniscus van siliconenolie die tussen een verhit oppervlak (hot stage) en een dekglas, geplaatst op het te onderzoeken polyamidemonster, is ingesloten, visueel wordt waargenomen.

1.4.3. **Methode voor de bepaling van de vriestemperatuur**

Het monster wordt in een speciaal proefbuisje in een toestel geplaatst voor de bepaling van de vriestemperatuur. Tijdens de afkoeling wordt het monster voortdurend zachtjes geroerd en de temperatuur wordt regelmatig afgelezen en geregistreerd. Zodra de temperatuur gedurende enkele aflezingen constant blijft, wordt deze temperatuur (na correctie voor afwijking van de thermometer) geregistreerd als de vriestemperatuur.

Onderkoeling moet worden voorkomen door een evenwicht te bewaren tussen de vaste en de vloeibare fase.

1.4.4. **Thermische analyse**

1.4.4.1. *Differentiële thermische analyse (DTA)*

Met deze techniek wordt het verschil in temperatuur geregistreerd tussen de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden blootgesteld. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie, zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme (smelten) of exotherme (bevriezen) afwijking van de basislijn van de temperatuurregistratie.

▼B

1.4.4.2. *Differentiële scanningcalorimetrie (DSC)*

Deze techniek registreert het verschil tussen de energieopname van de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden onderworpen. Deze energie is de energie die nodig is om dezelfde temperatuur voor beide stoffen te bereiken. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie, zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme (smelten) of exotherme (bevriezen) afwijking van de basislijn van de warmtestroomregistratie.

1.4.5. **Vloeipunt**

Deze methode werd ontwikkeld voor minerale oliën en is bruikbaar voor olieachtige stoffen met lage smelttemperaturen.

Na voorafgaande verwarming wordt het monster afgekoeld met een specifieke snelheid en telkens, iedere 3 K, onderzocht op vloeikarakteristieken. De laagste temperatuur waarbij nog beweging van de vloeistof wordt gezien, wordt genoteerd als het vloeipunt.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De toepasbaarheid en nauwkeurigheid van de verschillende methoden voor de bepaling van smelttemperaturen/smelttrajecten staat vermeld in de tabel.

TABEL: TOEPASBAARHEID VAN DE METHODEN

A. **Capillaire methode**

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurigheid ([1])	Bestaande norm
Smelttemperatuurtoestellen met vloeistofbad	Ja	Enkele	273 tot 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Smelttemperatuurtoestellen met metalen blok	Ja	Enkele	293 tot > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fotoceldetectie	Ja	Verscheidene met toepassing van hulpapparatuur	253 tot 573 K	± 0,5 K	

([1]) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof.

▼B

B. **Methode waarbij gebruik wordt gemaakt van een verhit oppervlak (hot stage) en methode voor de bepaling van de vriestemperatuur**

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurigheid (1)	Bestaande norm
Verhitte staaf volgens Kofler	Ja	Neen	283 tot > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Smeltpuntmicroscoop	Ja	Enkele	273 tot > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniscusmethode	Neen	Specifiek voor polyamiden	293 tot > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Vriestemperatuurmethode	Ja	Ja	223 tot 573 K	± 0,5 K	zoals BS 4695

(1) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof.

C. **Thermische analyse**

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurigheid (1)	Bestaande norm
Differentiële thermische analyse	Ja	Ja	173 tot 1 273 K	tot 600 K ± 0,5 K tot 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differentiële scanningcalorimetrie	Ja	Ja	173 tot 1 273 K	tot 600 K ± 0,5 K tot 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof.

D. **Vloeipunt**

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurigheid (1)	Bestaande norm
Vloeipunt	Voor minerale oliën en olieachtige stoffen	Voor minerale oliën en olieachtige stoffen	223 tot 323 K.	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

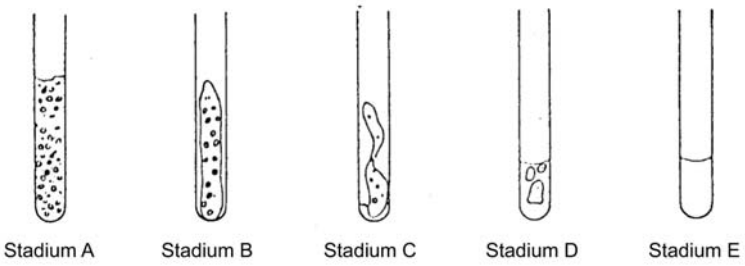
De aan te houden werkwijzen van bijna alle testmethoden staan beschreven in internationale en nationale normen (zie aanhangsel 1).

1.6.1. **Methoden waarbij gebruik wordt gemaakt van een capillair**

Bij een trage temperatuurstijging zullen verpulverde stoffen doorgaans volgens de in figuur 1 weergegeven stadia verlopen.

▼B

Figuur 1



Stadium A (begin van het smeltproces): fijne druppeltjes hangen op uniforme wijze aan de binnenwand van het capillair.

Stadium B er ontstaat ruimte tussen het monster en de binnenwand wegens krimpen van het monster.

Stadium C het gekrompen monster begint in te storten en wordt vloeibaar.

Stadium D op de oppervlakte wordt een volledige meniscus gevormd, maar een aanzienlijk gedeelte van het monster is nog vast.

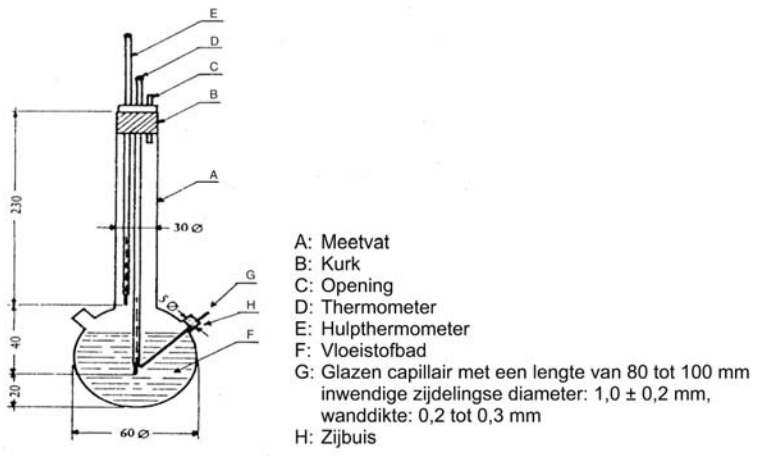
Stadium E (eindstadium van het smeltproces): er zijn geen vaste deeltjes meer.

Tijdens de smelttemperatuurbepaling wordt de temperatuur in het begin- en eindstadium van het smeltproces geregistreerd.

1.6.1.1. *Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een vloeistofbad*

In figuur 2 is een genormaliseerd glazen apparaat voor smelttemperatuurbepaling (JIS K 0064) afgebeeld. Alle specificaties zijn opgegeven in mm.

Figuur 2



▼B

Badvloeistof

Er moet een geschikte badvloeistof bepaald worden. De keuze van de vloeistof is afhankelijk van de smelttemperatuur van de te onderzoeken stof, bijvoorbeeld vloeibare paraffine voor stoffen met een smelttemperatuur van maximaal 473 K, siliconenolie voor stoffen met een smelttemperatuur van maximaal 573 K.

Voor stoffen met een smelttemperatuur hoger dan 523 K kan een mengsel, bestaande uit drie delen zwavelzuur en twee delen kaliumsulfaat (naar massa), worden gebruikt. Passende voorzorgsmaatregelen dienen te worden genomen wanneer een dergelijk mengsel wordt gebruikt.

Thermometer

Er mag alleen gebruik worden gemaakt van thermometers die aan de eisen in de volgende of daarmee overeenkomende normen voldoen:

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

Werkwijze

De droge stof wordt verpulverd in een mortier en in een aan één uiteinde dichtgesmolten capillair gebracht en wel zo dat het niveau van de vulling, nadat de stof stevig is aangedrukt, circa 3 mm bedraagt. Teneinde een gelijkvormig aangedrukt monster te verkrijgen, laat men het capillair vanaf een hoogte van circa 700 mm door een glazen buis verticaal op een horlogeglas vallen.

Het gevulde capillaire buisje wordt in een bad geplaatst en wel zo dat het midden van de kwikbol van de thermometer het capillair ter hoogte van het monster aanraakt. Doorgaans wordt het capillair in het toestel gebracht bij ongeveer 10 K beneden de smelttemperatuur.

De badvloeistof wordt zodanig verwarmd dat de temperatuurstijging circa 3 K/min bedraagt. De vloeistof moet worden geroerd. Bij ongeveer 10 K beneden de verwachte smelttemperatuur wordt de snelheid van de temperatuurstijging ingesteld op ten hoogste 1 K/min.

Berekening

De smelttemperatuur wordt als volgt berekend:

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

waarin:

T = de gecorrigeerde smelttemperatuur, uitgedrukt in K

T_D = de van thermometer D afgelezen temperatuur, in K

T_E = de van thermometer E afgelezen temperatuur, in K

n = het aantal schaalverdelingen van het kwikdraad op het uitstekende gedeelte van thermometer D.

1.6.1.2. *Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een metalen blok*

Apparatuur

De apparatuur bestaat uit:

— een cilindervormig metalen blok, waarvan het bovenste gedeelte hol is en een kamer vormt (zie figuur 3);

— een metalen stop met twee of meer openingen waarlangs buisjes in het metalen blok kunnen worden gebracht;

▼B

— een verwarmingssysteem voor het metalen blok, bijvoorbeeld een in het blok ingesloten elektrische weerstand;

— een regelbare weerstand voor de stroomtoevoer, indien van elektrische verwarming gebruik wordt gemaakt;

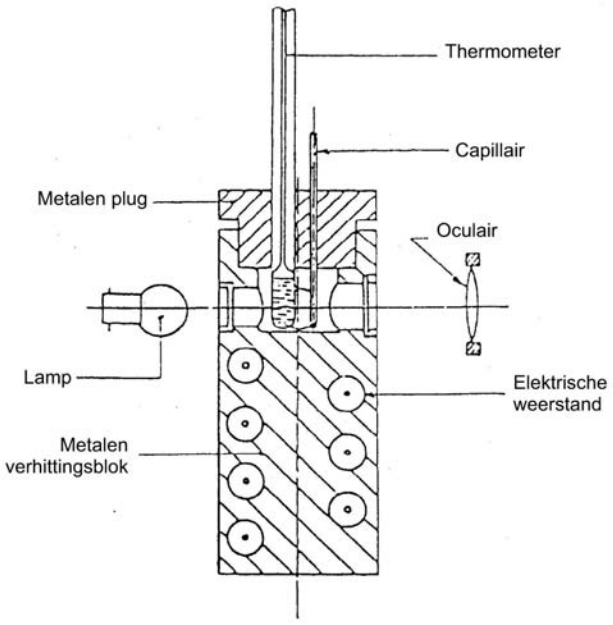
— in de zijwanden van de kamer, in rechte hoeken ten opzichte van elkaar, vier vensters van hittebestendig glas; voor één van deze vensters is een oculair aangebracht, waardoor het capillair kan worden waargenomen, de overige drie vensters worden gebruikt voor de verlichting van de kamer en inhoud daarvan;

— een aan één uiteinde gesloten capillair van hittebestendig glas (zie 1.6.1.1).

Thermometer

Zie de in 1.6.1.1 genoemde normen. Thermo-elektrische meetinstrumenten van vergelijkbare nauwkeurigheid kunnen ook worden gebruikt.

Figuur 3



1.6.1.3. *Fotoceldetectie*

Apparatuur en werkwijze:

Het apparaat bestaat uit een metalen kamer met een geautomatiseerd verwarmingssysteem. Drie capillairen worden overeenkomstig 1.6.1.1 gevuld en in de oven geplaatst.

▼B

Er zijn verscheidene lineaire temperatuurstijgingen beschikbaar voor het ijken van het apparaat; de gewenste temperatuurstijging wordt elektrisch ingesteld met een van tevoren gekozen constante snelheid en heeft een lineair verloop. Recorders geven de werkelijke oventemperatuur en de temperatuur van de stof in het capillair aan.

1.6.2. **Verwarmde oppervlakken (hot stages)**

1.6.2.1. *De verhitte staaf volgens Kofler*

Zie aanhangsel.

1.6.2.2. *Smeltpuntmicroscoop*

Zie aanhangsel.

1.6.2.3. *Meniscusmethode (polyamiden)*

Zie aanhangsel.

De opwarmsnelheid bij temperaturen in de buurt van de smelttemperatuur moet minder zijn dan 1 K/min.

1.6.3. **Methoden voor de vriestemperatuurbepaling**

Zie aanhangsel.

1.6.4. **Thermische analyse**

1.6.4.1. *Differentiële thermische analyse*

Zie aanhangsel.

1.6.4.2. *Differentiële scanningcalorimetrie*

Zie aanhangsel.

1.6.5. **Bepaling van het vloeipunt**

Zie aanhangsel.

2. **GEGEVENS**

Soms is een thermometercorrectie noodzakelijk.

3. **RAPPORTAGE**

In het eindverslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— de gebruikte methode;

— de nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en, indien van toepassing, voorafgaande zuivering;

— een schatting van de nauwkeurigheid.

Het gemiddelde van ten minste twee metingen die binnen de geschatte nauwkeurigheidsgrenzen (zie tabellen) vallen, wordt gerapporteerd als smelttemperatuur,

▼B

Als het temperatuurverschil tussen het beginpunt en het eindpunt van het smelten binnen de nauwkeurigheidsgrenzen van de methode valt, wordt de temperatuur van het eindstadium genomen als de smelttemperatuur; zo niet, dan moeten beide temperaturen worden gerapporteerd.

Als ontleding of sublimatie van de onderzochte stof optreedt voordat de smelttemperatuur is bereikt, dient de temperatuur waarbij dit effect optreedt, te worden gerapporteerd.

Alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

4. **LITERATUUR**

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

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

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

(4) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, 1976, Vol. 48, 505-515.

▼B

Aanhangsel

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd.

1. **Capillaire methoden**

1.1. Smelttemperatuurtoestellen met een vloeistofbad

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

1.2. Smelttemperatuurtoestellen met een metalen blok

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

2. **Hete oppervlakken**

2.1. Verwarmde staaf volgens Kofler

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

2.2. Smeltpuntmicroscoop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniscusmethode (polyamiden)

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”. Méthode du ménisque.

3. **Methoden voor vriestemperatuurbepaling**

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. **Thermische analyse**

4.1. Differentiële thermische analyse

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

▼B

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

4.2. Differentiële scanningcalorimetrie

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

5. **Bepaling van het vloeipunt**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieprodukten: 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. KOOKTEMPERATUUR

1. METHODE

De meeste van de beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in de referenties (2) en (3).

1.1. INLEIDING

De hier beschreven methoden en toestellen kunnen worden toegepast op vloeistoffen en op bij lage temperatuur smeltende stoffen, welke beneden de kooktemperatuur geen chemische reactie ondergaan (bijvoorbeeld: auto-oxidatie, omlegging, ontleding, enz.). De methoden zijn van toepassing op zuivere en onzuivere vloeistoffen.

De meeste aandacht wordt gegeven aan de fotoceldetectiemethode en thermische analysemethode, omdat hiermee zowel smelt- als kooktemperaturen kunnen worden bepaald. Bovendien kunnen deze metingen worden geautomatiseerd.

Het voordeel van de dynamische methode is, dat deze ook kan worden toegepast voor de bepaling van de dampspanning en dat het niet nodig is de kooktemperatuur te corrigeren tot normale druk (101,325 kPa) omdat de normale druk tijdens de meting kan worden ingesteld met behulp van een manostaat.

Opmerkingen:

De invloed van verontreinigingen op de bepaling van de kooktemperatuur is sterk afhankelijk van de aard van de verontreiniging. Indien in het monster vluchtige verontreinigingen aanwezig zijn, die de resultaten zouden kunnen beïnvloeden, kan de stof worden gezuiverd.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De normale kooktemperatuur wordt gedefinieerd als de temperatuur waarbij de dampdruk van een vloeistof gelijk is aan 101,325 kPa.

Als de kooktemperatuur niet wordt gemeten bij normale atmosferische druk, kan de temperatuurafhankelijkheid van de dampdruk worden beschreven met de vergelijking van Clausius-Clapeyron:

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

p = de dampspanning van de stof in pascal (Pa)

ΔH_v = de verdampingswarmte in J mol^{-1}

R = de universele molaire gasconstante = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = de thermodynamische temperatuur in K.

Bij vermelding van de kooktemperatuur moet de druk tijdens de meting worden opgegeven.

▼B

Herleidingen

Druk (eenheid: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(„bar” is nog toegestaan, doch het gebruik hiervan wordt niet aanbevolen).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(de eenheden mm Hg en Torr zijn niet meer toegestaan).

1 atm = standaardatmosfeer = 101 325 Pa

(de eenheid „atm” is niet toegestaan).

Temperatuur (eenheid: K)

t = T - 273,15

t: Celsiustemperatuur, graden Celsius (^{o}C)

T: thermodynamische temperatuur, kelvin (K)

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijking met de resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

Een aantal ijkstoffen is te vinden in de methoden die zijn opgenomen in het aanhangsel.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Vijf methoden voor de bepaling van de kooktemperatuur (of kooktraject) berusten op de meting van de kooktemperatuur, twee andere op thermische analyse.

1.4.1. **Bepaling met behulp van een ebullioscoop**

De ebullioscoop is oorspronkelijk ontwikkeld voor de bepaling van het molecuulgewicht via de kooktemperatuurverhoging, doch leent zich ook voor nauwkeurige metingen van de kooktemperatuur. Een zeer eenvoudig toestel is beschreven in ASTM D 1120-72 (zie aanhangsel). De vloeistof wordt in dit toestel onder evenwichtscondities bij atmosferische druk verwarmd totdat zij kookt.

1.4.2. **Dynamische methode**

Bij deze methode meet men de condensatietemperatuur van de damp met behulp van een geschikte thermometer in de reflux tijdens het koken. De druk kan bij deze methode worden gevarieerd.

1.4.3. **Destillatiemethode voor kooktemperatuur**

Bij deze methode destilleert men de vloeistof en meet men de condensatietemperatuur van de damp, alsmede de hoeveelheid destillaat.

▼B

1.4.4. **Methode volgens Siwoloboff**

Bij deze methode verwarmt men het monster in een monsterbuisje, dat in een verwarmd vloeistofbad wordt gehouden. Een dichtgesmolten capillair met een luchtbel onderin wordt in het monsterbuisje gebracht.

1.4.5. **Fotoceldetectie**

Naar het beginsel volgens Siwoloboff worden de opstijgende bellen automatisch gemeten met een fotocel.

1.4.6. **Differentiële thermische analyse**

Met deze techniek wordt het verschil in temperatuur geregistreerd tussen de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden blootgesteld. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie, zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme afwijking (koken) van de basislijn van de temperatuurregistratie.

1.4.7. **Differentiële scanningcalorimetrie**

Deze techniek registreert het verschil tussen de energieopname van de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden onderworpen. Deze energie is de energie die nodig is om dezelfde temperatuur voor beide stoffen te bereiken. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme afwijking (koken) van de basislijn van de warmtestroomregistratie.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De toepasbaarheid en nauwkeurigheid van de verschillende methoden voor de bepaling van de kooktemperatuur/kooktraject staan vermeld in tabel 1.

Tabel 1

Vergelijking van de methoden

Meetmethode	Geschatte nauwkeurigheid	Bestaande norm
Ebullioscoop	± 1,4 K (tot 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (tot 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dynamische methode	± 0,5 K (tot 600 K) (2)	
Destillatiemethode (kooktraject)	± 0,5 K (tot 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Volgens Siwoloboff	± 2 K (tot 600 K) (2)	
Fotoceldetectie	± 0,3 K (bij 373 K) (2)	
Differentiële thermische analyse	± 0,5 K (tot 600 K) ± 2,0 K (tot 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differentiële scanningcalorimetrie	± 0,5 K (tot 600 K) ± 2,0 K (tot 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Deze nauwkeurigheid geldt alleen voor eenvoudige toestellen zoals bijvoorbeeld beschreven in ASTM D 1120-72; de nauwkeurigheid kan worden verbeterd met meer verfijnde versies van de ebullioscoop.

(2) Deze nauwkeurigheid geldt alleen voor zuivere stoffen. Het gebruik in andere omstandigheden moet verantwoord worden.

▼B

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODEN

De werkwijzen van een aantal testmethoden zijn beschreven in internationale en nationale normen (zie aanhangsel).

1.6.1. **Ebullioscoop**

Zie aanhangsel.

1.6.2. **Dynamische methode**

Zie testmethode A.4 voor de bepaling van de dampspanning.

De waargenomen kooktemperatuur bij een druk van 101,325 kPa wordt geregistreerd.

1.6.3. **Destillatiemethode (kooktraject)**

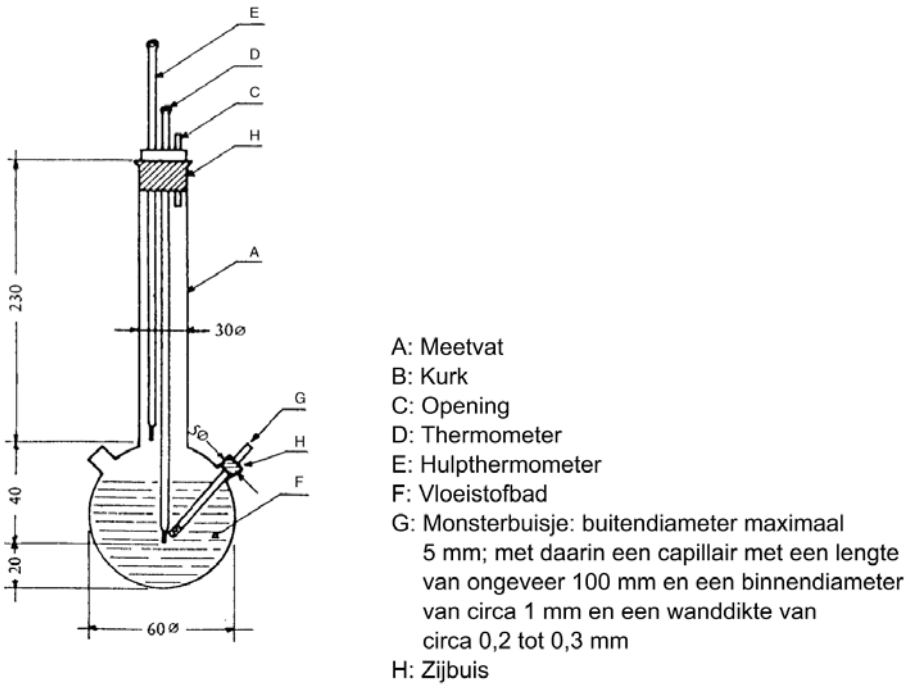
Zie aanhangsel.

1.6.4. **Methode volgens Siwoloboff**

Het monster wordt verwarmd in een smelttemperatuurtoestel in een monsterbuisje met een diameter van ongeveer 5 mm (figuur 1).

In figuur 1 staat een standaardapparaat voor de bepaling van de smelt- en kooktemperatuur (JIS K 0064) afgebeeld (glas, alle afmetingen in mm).

Figuur 1

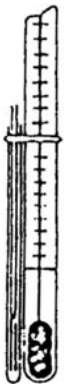


Een capillair (kookcapillair) dat op ongeveer 1 cm boven het ondereind is dichtgesmolten, wordt in het monsterbuisje gebracht. Het monsterbuisje wordt met de te onderzoeken stof gevuld, totdat het dichtgesmolten deel van het capillair zich onder het vloeistofoppervlak bevindt. Het monsterbuisje met het kookcapillair wordt met een elastiekje aan de thermometer bevestigd of met een zijstuk vastgezet (zie figuur 2).

▼B

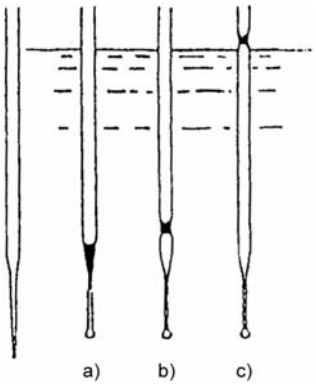
Figuur 2

Beginsel volgens Siwoloboff



Figuur 3

Gewijzigd beginsel



De badvloeistof wordt gekozen aan de hand van de kooktemperatuur. Bij temperaturen tot 573 K kan siliconenolie worden gebruikt. Vloeibare paraffine mag slechts worden gebruikt bij temperaturen tot 473 K. De verwarming van het vloeistofbad moet zo geregeld zijn, dat de temperatuur aanvankelijk 3 K/min stijgt. Het vloeistofbad moet worden geroerd. Bij ongeveer 10 K beneden de verwachte kooktemperatuur moet de verwarming zo worden ingesteld dat de temperatuur met minder dan 1 K/min stijgt. Zodra de kooktemperatuur wordt bereikt, beginnen er snel belletjes uit het kookcapillair te komen.

De kooktemperatuur wordt bereikt wanneer, bij tijdelijke afkoeling, de bellenvorming stopt en de vloeistof plotseling in het capillair omhoog komt. De bijbehorende stand van de thermometer is de kooktemperatuur van de te onderzoeken stof.

Bij het gewijzigd beginsel (figuur 3) wordt de kooktemperatuur bepaald in een smelttemperatuurcapillair. Deze wordt uitgetrokken tot een fijne punt van ongeveer 2 cm lengte, waarin een geringe hoeveelheid van het monster wordt opgezogen. Het open einde van de fijne punt wordt dicht gesmolten, zodat er zich onderin een kleine luchtbel bevindt (a). Bij verwarming in het smelttemperatuur toestel (b) zet de luchtbel uit. De kooktemperatuur komt overeen met de temperatuur waarbij de prop van de te onderzoeken stof op het niveau van het vloeistofoppervlak komt (c).

1.6.5. **Fotoceldetectie**

Het monster wordt verwarmd in een capillair in een verwarmd metaalblok.

Via geschikte openingen in het blok wordt een lichtbundel door de stof heen op een zorgvuldig geijkte fotocel gericht.

Terwijl de temperatuur van het monster oploopt, komen er luchtbellen uit het kookcapillair. Wanneer de kooktemperatuur wordt bereikt, neemt het aantal bellen flink toe. Hierbij verandert de intensiteit van het licht dat op de cel valt, waardoor het apparaat wordt stilgezet dat de temperatuur afleest van een thermometer met platina weerstand die in het blok is gemonteerd.

Deze methode is bijzonder nuttig omdat hiermee ook bepalingen mogelijk zijn beneden kamertemperatuur tot 253,15 K (– 20 °C) zonder enige veranderingen in de apparatuur. Het instrument moet alleen in een koelbad worden geplaatst.

▼B

1.6.6. **Thermische analyse**

1.6.6.1. *Differentiële thermische analyse*

Zie aanhangsel.

1.6.6.2. *Differentiële scanningcalorimetrie*

Zie aanhangsel.

2. **GEGEVENS**

Bij kleine afwijkingen van de normale druk (max. ± 5 kPa) worden de kooktemperaturen genormaliseerd tot Tn met behulp van de volgende numerieke vergelijking van Sidney Young:

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

waarin:

Δp = (101,325 - p), [let op het teken]

p = barometerstand in kPa,

f_T = tempo waarin de kooktemperatuur verandert met de druk in K/kPa,

T = gemeten kooktemperatuur in K,

T_n = kooktemperatuur gecorrigeerd tot normale druk in K.

De temperatuurcorrectiefactoren f_T en de vergelijkingen voor de benadering daarvan zijn opgenomen in de internationale en nationale normen die hierboven voor een groot aantal stoffen zijn genoemd.

Zo worden bijvoorbeeld in de methode DIN 53171 de volgende (bij benadering) correcties vermeld voor oplosmiddelen in verf (zie tabel 2).

Tabel 2:

Temperatuurcorrectiefactoren f_T

Temperatuur T (K)	Correctiefactor 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. **RAPPORTAGE**

In het eindverslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— de gebruikte methode;

— een nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en, indien van toepassing, voorafgaande zuivering;

— een schatting van de nauwkeurigheid.

Het gemiddelde van ten minste twee metingen die binnen de geschatte nauwkeurigheidsgrenzen (zie tabel 1) vallen, wordt genoteerd als kooktemperatuur.

De gemeten kooktemperaturen en hun gemiddelde moeten worden opgegeven, alsmede de druk(ken), waarbij de metingen zijn uitgevoerd, in kPa. De druk dient bij voorkeur dicht bij de normale atmosferische druk te liggen.

Alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

4. **LITERATUUR**

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

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Burterworths, London, 1975, vol. II.

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

▼B

Aanhangsel

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd:

1. **Ebullioscoop**

ASTM D 1120-72	Standard Test Method for Boiling Point of Engine Anti-freezes

2. **Destillatieprocess (kooktraject)**

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

3. **Differentiële thermische analyse en differentiële scanningcalorimetrie**

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

▼B

A.3. RELATIEVE DICHTHEID

1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in referentie (2).

1.1. INLEIDING

De hieronder beschreven methoden voor het bepalen van de relatieve dichtheid zijn van toepassing op vaste stoffen en op vloeistoffen, ongeacht de zuiverheid van deze stoffen. De verschillende methoden zijn vermeld in tabel 1.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De relatieve dichtheid, D20/4, van vaste stoffen of vloeistoffen is de verhouding tussen de massa van een volume te onderzoeken stof bij 20 °C en de massa van hetzelfde volume water bij 4 °C. De relatieve dichtheid heeft geen dimensie.

De dichtheid, p, van een stof is het quotiënt van de massa m en het volume v van deze stof.

De dichtheid, p, wordt uitgedrukt in kg/m^3 (SI-eenheden).

1.3. REFERENTIESTOFFEN (1) (3)

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methodes mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Er worden vier soorten methoden gebruikt.

1.4.1. **Methoden gebaseerd op de opwaartse kracht**

1.4.1.1. *Areometer* (hydrometer voor vloeistoffen)

Voldoende nauwkeurige en snelle dichtheidsbepalingen kunnen worden uitgevoerd met drijvende areometers; het gedeelte van de areometer dat in de vloeistof zakt, is bepalend voor de dichtheid van de vloeistof en kan van een schaalverdeling worden afgelezen.

1.4.1.2. *Hydrostatische balans* (voor vloeistoffen en vaste stoffen)

Het gewichtsverschil van een monster, gemeten in lucht en in een geschikte vloeistof (bijvoorbeeld water), kan worden gebruikt om de dichtheid ervan te bepalen.

Voor vaste stoffen geldt de gemeten dichtheid slechts voor het bewuste monster. Voor het bepalen van de dichtheid van vloeistoffen wordt een voorwerp met volume v eerst in lucht en vervolgens in de testvloeistof gewogen.

1.4.1.3. *Methode met ondergedompeld voorwerp* (voor vloeistoffen) (4)

Bij deze methode wordt de dichtheid van een vloeistof bepaald aan de hand van het verschil tussen de resultaten van een weging van de vloeistof voor en na het onderdompelen van een voorwerp met bekend volume in de te onderzoeken vloeistof.

▼B

1.4.2. **Methoden met de pyknometer**

Voor vaste stoffen en vloeistoffen kunnen pyknometers van uiteenlopende vorm en met bekend volume worden gebruikt. De dichtheid wordt berekend uit het verschil in gewicht tussen de volle en de lege pyknometer en het bekende volume daarvan.

1.4.3. **Vergelijkingspyknometer met lucht** (voor vaste stoffen)

De dichtheid van een vaste stof in willekeurige vorm kan bij kamertemperatuur worden gemeten met behulp van een gasvergelijkingspyknometer. Het volume van een stof wordt in lucht of in een inert gas gemeten in een cilinder waarvan het variabele volume gekalibreerd is. Voor de berekening van de dichtheid wordt na meting van het volume een massameting verricht.

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

De dichtheid van een vloeistof kan worden gemeten met behulp van een oscillerende dichtheidsmeter. Een mechanische oscillator in de vorm van een U-buis wordt in trilling gebracht bij de resonantiefrequentie van de oscillator die afhankelijk is van zijn massa. Bij het inbrengen van een monster verandert de resonantiefrequentie van de oscillator. Het apparaat moet worden geijkt met twee vloeistoffen van bekende dichtheid. Deze ijkstoffen moeten bij voorkeur zo worden gekozen dat de dichtheden ervan zich aan de uiteinden van het meetbereik bevinden.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De toepasbaarheid van de verschillende methoden voor bepaling van de relatieve dichtheid staat vermeld in de tabel.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

Normen, die als voorbeeld kunnen worden geraadpleegd voor aanvullende technische gegevens, zijn bijgevoegd in het aanhangsel.

De proeven moeten worden uitgevoerd bij 20 °C en ten minste in tweevoud.

2. **GEGEVENS**

Zie normen.

3. **RAPPORTAGE**

In het eindverslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— de gebruikte methode;

— een nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en, indien van toepassing, voorafgaande zuivering.

De relatieve dichtheid D_4^{20} dient te worden gerapporteerd zoals gedefinieerd onder 1.2, alsmede de fysische toestand van de onderzochte stof.

Alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

▼B

Tabel

Toepasbaarheid van de methoden

Meetmethode	Dichtheid		Maximale dynamische viscositeit	Bestaande norm
	Vaste stof	Vloeistof		
1.4.1.1. Areometer		Ja	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hydrostatische balans				
a) vaste stof	Ja			ISO 1183 (A)
b) vloeistof		Ja	5 Pa S	ISO 901 en 758
1.4.1.3. Methode met ondergedompeld voorwerp		Ja	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO 3507
a) vaste stof	Ja			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) vloeistof		Ja	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Vergelijkingspyknometer met lucht	Ja			DIN 55990 deel 3, DIN 53243
1.4.4. Oscillerende dichtheidsmeter		Ja	5 Pa s	

4. **LITERATUUR**

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

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

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

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugei zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm; 1979, Vol. 11, 427-430.

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

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

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

▼B

Aanhangsel

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd:

1. **Methoden gebaseerd op de opwaartse kracht**

1.1. Areometer

DIN 12790, ISO 387	Areometer; algemene aanwijzingen
DIN 12791	Deel I: Dichtheidsareometers: constructie, instelling en gebruik Deel II: Dichtheidsareometers: genormaliseerde maten, benaming Deel III: Gebruik en test
ISO 649-2	Laboratoriumglaswerk: Dichtheidsareometers voor algemeen gebruik
NF T 20-050	Chemische producten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vloeistoffen — Areometermethode
DIN 12793	Laboratoriumglaswerk: areometers voor bepaling van het meetbereik

1.2. Hydrostatische balans

Voor vaste stoffen

ISO 1183	Methode A: Methoden voor het bepalen van de dichtheid en relatieve dichtheid van kunststoffen met uitzondering van schuimplastics
NF T 20-049	Chemische producten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vaste stoffen uitgezonderd poeders en schuimproducten — Hydrostatische balansmethode
ASTM D 792	Soortelijk gewicht en dichtheid van kunststoffen door verplaatsing
DIN 53479	Proeven voor kunststoffen en elastomeren: bepaling van de dichtheid

Voor vloeistoffen

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Proeven voor minerale oliën en verwante materialen: bepaling van de dichtheid
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 en ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Dichtheid, soortelijk gewicht of API-gewicht van ruwe aardolie en vloeibare aardolieproducten met de areometermethode
BS 4714	Dichtheid, soortelijk gewicht of API-gewicht van ruwe aardolie en vloeibare aardolieproducten met de areometermethode

1.3. Methode met ondergedompeld voorwerp

DIN 53217	Proeven voor verf, vernis en soortgelijke producten; dichtheidsbepaling met de methode met ondergedompeld voorwerp

2. **Pyknometermethoden**

2.1. Voor vloeistoffen

ISO 3507	Pyknometers
ISO 758	Vloeibare chemische producten; bepaling van de dichtheid bij 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pyknometer (voor niet-vluchtige vloeistoffen die niet al te visceus zijn)
DIN 12798	Lipkin pyknometer (voor vloeistoffen met een kinematische viscositeit van minder dan 100.10^{-6} m^2 s^{-1} bij 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pyknometer (voor vloeistoffen zoals in DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pyknometer (voor vloeistoffen met een kinematische viscositeit van minder dan 100.10^{-6} m^2 s^{-1} bij 20 °C, vooral ook toepasbaar op koolwaterstoffen en oplossingen in water, alsmede op vloeistoffen met een hogere dampdruk, ongeveer 1 bar bij 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pyknometer (voor alle soorten visceuze vloeistoffen met een niet al te hoge dampdruk, in het bijzonder voor verven, vernissen en bitumen)
DIN 12807	Bingham pyknometer (voor vloeistoffen zoals in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pyknometer (in het bijzonder voor mengsels van ethanol en water)
DIN 12809	Pyknometer met ingeslepen thermometer en capillaire zijbuis (voor vloeistoffen die niet al te visceus zijn)
DIN 53217	Proeven voor verven, vernissen en soortgelijke producten; bepaling van de dichtheid met behulp van een pyknometer
DIN 51757	Punt 7: Proeven voor minerale oliën en verwante materialen; bepaling van de dichtheid
ASTM D 297	Hoofdstuk 15: Rubberproducten — chemische analyse
ASTM D 2111	Methode C: Organische halogeenverbindingen
BS 4699	Methode voor het bepalen van soortelijk gewicht en dichtheid van aardolieproducten (met behulp van een bicapillaire pyknometer met schaalverdeling)
BS 5903	Methode voor het bepalen van de relatieve dichtheid en dichtheid van aardolieproducten met behulp van een pyknometer met capillaire stop
NF T 20-053	Chemische producten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vaste stoffen in poeders en vloeistoffen — Pyknometermethode

▼B

2.2.	Voor vaste stoffen	
	ISO 1183	Methode B: Methode voor het bepalen van de dichtheid en relatieve dichtheid van kunststoffen, met uitzondering van schuimplastics
	NF T 20-053	Chemische producten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vaste stoffen in poeder en vloeistoffen — Pyknometermethode
	DIN 19683	Bepaling van de bodemdichtheid
3.	**Vergelijkingspyknometer met lucht**	
	DIN 55990	Deel 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ahnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. **DAMPSPANNING**

1. **METHODE**

Deze methode is gelijkwaardig aan OESO TG 104 (2004).

1.1. INLEIDING

Deze herziene versie van methode A.4 (1) bevat een aanvullende meetmethode, Effusiemethode: isotherme thermogravimetrie, ontwikkeld voor stoffen met zeer lage spanningen (tot 10^{-10} Pa). Gezien de behoefte aan meetmethoden, met name voor het bepalen van de dampspanning van stoffen met lage dampspanning, zijn de overige meetmethoden van deze methode herzien met betrekking tot andere toepassingsbereiken.

Bij thermodynamisch evenwicht is de dampspanning van een zuivere stof alleen een functie van de temperatuur. De fundamentele principes worden besproken in de referenties (2) en (3).

Er bestaat geen meetmethode die voor alle mogelijke waarden van de dampspanning, van minder dan 10^{-10} tot 10^5 Pa, van toepassing is. Deze methode omvat acht meetmethoden voor de dampspanning, die toepasbaar zijn voor verschillende dampspanningsbereiken. Tabel 1 biedt een vergelijking van de toepasbaarheid en het meetbereik van de verschillende methoden. De meetmethoden kunnen alleen worden toegepast voor verbindingen die niet ontleden onder de testomstandigheden. In gevallen waarin de experimentele methoden om technische redenen niet kunnen worden toegepast kan de dampspanning ook worden geschat. Een aanbevolen schattingsmethode wordt beschreven in het aanhangsel.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De dampspanning van een stof wordt gedefinieerd als de verzadigingsdruk boven een vaste stof of vloeistof.

Voor de druk dient de SI-eenheid, de pascal (Pa), te worden gebruikt. Andere eenheden die in het verleden zijn gebruikt worden hieronder weergegeven, samen met hun herleidingsfactoren:

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

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

1 bar = 10^5 Pa

De SI-eenheid van temperatuur is de kelvin (K). De formule voor het herleiden van graden Celsius naar Kelvin is:

$T = t + 273{,}15$

Hierin is T de Kelvintemperatuur ofwel de thermodynamische temperatuur en t de Celsiustemperatuur.

▼**M1**

Tabel 1

Meetmethode	Vaste stoffen	Vloeistoffen	Geschatte herhaalbaarheid	Geschatte reproduceerbaarheid	Aanbevolen bereik
Dynamische methode	Laag smeltpunt	Ja	tot 25 % 1-5 %	tot 25 % 1-5 %	10^3 Pa tot 2x10^3 Pa 2 × 10^3 Pa tot 10^5 Pa
Statische methode	Ja	Ja	5-10 %	5-10 %	10 Pa – 10^5 Pa 10^{-2} Pa tot 10^5 Pa (1)
Isoteniscoopmethode	Ja	Ja	5-10 %	5-10 %	10^2 Pa tot 10^5 Pa
Effusiemethode: dampspanningsbalans	Ja	Ja	5-20 %	tot 50 %	10^{-3} tot– 1 Pa
Effusiemethode: Knudsencel	Ja	Ja	10-30 %	—	10^{-10} tot 1 P
Effusiemethode: isotherme thermogravimetrie	Ja	Ja	5-30 %	tot 50 %	10^{-10} tot 1 Pa
Gasverzadigingsmethode	Ja	Ja	10-30 %	tot 50 %	10^{-10} tot 10^3 Pa
Draaienderotormethode	Ja	Ja	10-20 %	—	10^{-4} tot 0,5 Pa

(1) Bij gebruik van een capacitieve manometer.

1.3. PRINCIPE VAN DE TEST

Over het algemeen wordt de dampspanning bepaald bij verschillende temperaturen. Binnen een beperkt temperatuurbereik is de logaritme van de dampspanning van een zuivere stof omgekeerd evenredig met de thermodynamische temperatuur, volgens de vereenvoudigde vergelijking van Clausius-Clapeyron:

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

waarin:

p = de dampspanning van de stof in pascal (Pa)

ΔHv = de verdampingswarmte in J mol^{-1}

R = de universele molaire gasconstante, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = de thermodynamische temperatuur in K

▼**M1**

1.4. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet nodig om referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om van tijd tot tijd de werking van een methode te controleren en om vergelijkingen tussen resultaten van verschillende methoden mogelijk te maken.

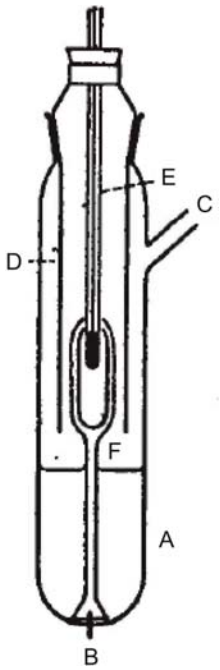
1.5. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.5.1. **Dynamische methode (methode van Cottrell)**

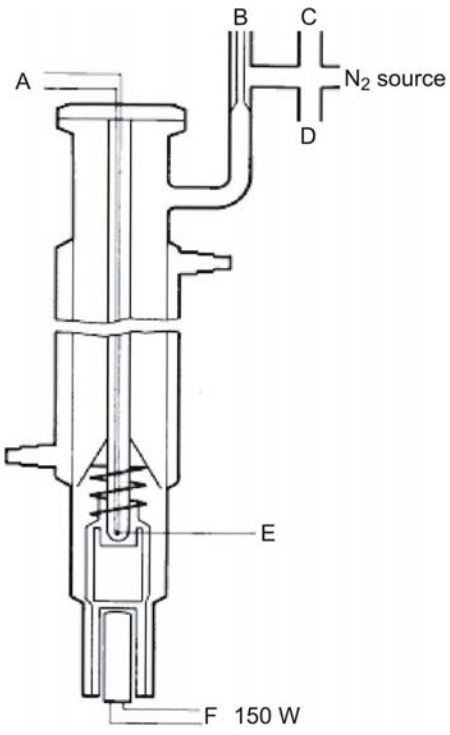
1.5.1.1. *Principe*

De dampspanning wordt bepaald door het meten van de kooktemperatuur van een stof bij verschillende ingestelde waarden van de druk tussen ongeveer 10^3 Pa en 10^5 Pa. Deze methode wordt ook aanbevolen voor het bepalen van de kooktemperatuur. Voor dat doel is de methode bruikbaar tot 600 K. De kooktemperatuur van vloeistoffen op een diepte van 3 tot 4 centimeter is ongeveer 0,1 °C hoger dan aan de oppervlakte, vanwege de hydrostatische druk van de vloeistofkolom. In de methode van Cottrell (4) wordt de thermometer in de damp boven de oppervlakte van de vloeistof geplaatst en wordt de kokende vloeistof voortdurend over de kwikbol van de thermometer geleid. De kwikbol wordt bedekt door een dunne vloeistoflaag die in evenwicht is met de damp bij atmosferische druk. Zo geeft de thermometer de echte kooktemperatuur aan, zonder meetfouten door oververhitting of hydrostatische druk. De oorspronkelijk door Cottrell gebruikte pomp is weergegeven in figuur 1. Buis A bevat de kokende vloeistof. Een platina draad B, die in de bodem is bevestigd, bevordert gelijkmatig koken. De zijbuis C leidt naar een condensor en de mantel D zorgt ervoor dat het koude condensaat niet bij de thermometer E kan komen. Als de vloeistof in A kookt, worden de in de trechter opgevangen bellen en vloeistof via de twee armen van de pomp F over de kwikbol van de thermometer geleid.

Figuur 1



Figuur 2



▼**M1**

Cottrell-pomp (4)

A: Thermokoppel

B: Vacuümbuffervolume

C: Precisiemanometer

D: Vacuüm

E: Meetpunt

F: Verwarmingselement (ca. 150 W)

1.5.1.2. *Apparatuur*

In figuur 2 is een zeer nauwkeurig meetapparaat weergegeven, dat werkt volgens het Cottrell-principe. Het bestaat uit een buis met een kookgedeelte aan de benedenzijde, een koeler in het midden, en een uitgang en een flens aan de bovenzijde. De Cottrell-pomp wordt in het kookgedeelte geplaatst, dat wordt verwarmd door middel van een elektrisch verwarmingspatroon. De temperatuur wordt gemeten via een mantelthermokoppel of een weerstandsthermometer die bij de flens aan de bovenzijde naar binnen steekt. De uitgang wordt verbonden aan het drukregelingssysteem, dat bestaat uit een vacuümpomp, een buffervolume, een manostaat voor het inlaten van stikstof om de druk te regelen, en een manometer.

1.5.1.3. *Werkwijze*

De stof wordt in het kookgedeelte gebracht. Indien vaste stoffen niet als poeder beschikbaar zijn, kunnen er problemen ontstaan, maar deze kunnen soms worden opgelost door de koelwatermantel te verwarmen. De apparatuur wordt bij de flens afgesloten en de stof wordt ontgast.

Vervolgens wordt de laagst gewenste druk ingesteld en wordt het verwarmingssysteem aangezet. Tegelijkertijd wordt de temperatuurvoeler verbonden met een recorder.

Het evenwicht is bereikt, wanneer bij een constante druk een constante kooktemperatuur kan worden afgelezen. Wees voorzichtig om „stoten” tijdens het koken te voorkomen. Voorts moet volledige condensatie plaatsvinden op de koeler. Bij het bepalen van de dampspanning van bij lage temperatuur smeltende stoffen moet men voorkomen dat de condensor verstopt raakt.

Nadat dit evenwichtspunt is geregistreerd, wordt een hogere druk ingesteld. Dit proces wordt herhaald totdat een druk van 10^5 Pa is bereikt (ongeveer 5 tot 10 meetpunten in totaal). Ter controle moeten de evenwichtspunten nogmaals worden bepaald bij afnemende druk.

1.5.2. **Statische methode**

1.5.2.1. *Principe*

In de statische methode (5) wordt de dampspanning bij thermodynamisch evenwicht bepaald bij een ingestelde temperatuur. Deze methode is geschikt voor stoffen en vloeistoffen die uit meerdere componenten bestaan en vaste stoffen in het bereik van 10^{-1} tot 10^5 Pa en eveneens, mits behoedzaam uitgevoerd, in het bereik van 1 tot 10 Pa.

▼**M1**

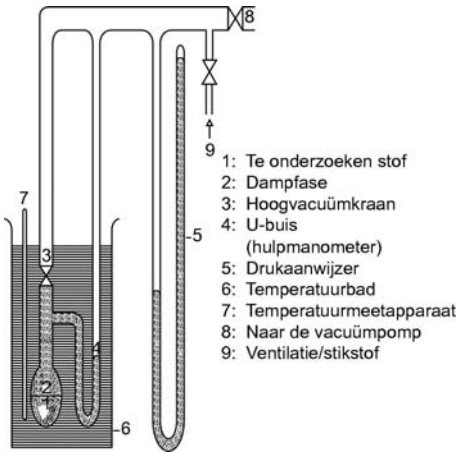
1.5.2.2. *Apparatuur*

De opstelling bestaat uit een thermostatisch bad (met een nauwkeurigheid van ± 0,2 K), een vat voor het monster dat verbonden is aan de vacuümleiding, een manometer en een drukregelingssysteem. De monsterruimte (figuur 3a) is verbonden aan de vacuümleiding via een kraan en een hulpmanometer (een U-buis met een geschikte manometervloeistof) die dient voor de nulpuntsinstelling. Afhankelijk van het drukbereik en het chemisch gedrag van de teststof zijn kwik, siliconenoliën en ftalaten geschikte manometervloeistoffen. Het gebruik van kwik dient echter om milieuredenen waar mogelijk te worden vermeden. De teststof mag niet merkbaar oplossen in of reageren met de vloeistof in de U-buis (figuur 3b). Voor de manometer kan kwik worden gebruikt in het bereik van normale drukken tot 10^2 Pa; siliconenvloeistoffen en ftalaten zijn geschikt voor drukken van 10 tot 10^2 Pa. Er bestaan ook andere drukmeters die gebruikt kunnen worden tot 10^2 Pa, en verwarmbare membraancapaciteitmanometers kunnen zelfs worden gebruikt bij drukken beneden 10^{-1} Pa. De temperatuur wordt aan de buitenkant van de monsterruimte of in het vat zelf gemeten.

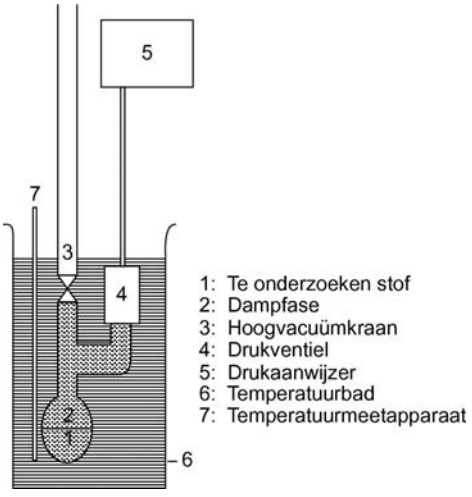
1.5.2.3. *Werkwijze*

Vul bij gebruikmaking van de in figuur 3a beschreven opstelling de U-buis met de gewenste vloeistof, die moet zijn ontgast bij hogere temperatuur voordat tot aflezen wordt overgegaan. De teststof wordt in de opstelling gebracht en bij lagere temperatuur ontgast. In het geval van een meercomponentensysteem moet de temperatuur laag genoeg zijn om te verzekeren dat de samenstelling van het materiaal niet verandert. Een evenwichtstoestand kan sneller worden bereikt door te roeren. Het monster kan onderkoeld worden met vloeibare stikstof of droog ijs, waarbij condensatie van lucht of pompvloeistof moet worden vermeden. Met de kraan boven de monsterruimte in geopende stand wordt vervolgens de ingesloten lucht gedurende een aantal minuten uit de apparatuur gepompt. Zo nodig moet de ontgassing verschillende keren herhaald worden.

Figuur 3a



Figuur 3b



▼**M1**

Als het monster verhit wordt met de kraan gesloten, stijgt de dampspanning. Dit verandert het evenwicht van de vloeistof in de U-buis. Om hiervoor te compenseren, wordt stikstof of lucht via de kraan in het toestel binnengelaten tot de vloeistof in de drukmeter weer bij nul staat. De hiervoor vereiste druk kan afgelezen worden bij kamertemperatuur op een manometer of op een instrument met hogere precisie. Deze druk komt overeen met de dampspanning van de stof bij die meettemperatuur. Bij gebruikmaking van de in figuur 3b weergegeven opstelling wordt de dampspanning direct afgelezen.

De dampspanning wordt bepaald met voldoende kleine temperatuurintervallen (ongeveer 5 tot 10 meetpunten in totaal) tot aan de gewenste maximumtemperatuur.

Ter controle moeten de metingen bij lage temperaturen herhaald worden. Als de waarden die verkregen worden bij de herhaalde metingen niet overeenkomen met de grafiek die is verkregen bij stijgende temperatuur, kan dit te wijten zijn aan een van de volgende situaties:

i) Het monster bevat nog altijd lucht (bijvoorbeeld stoffen met hoge viscositeit) of bij lage temperatuur kokende stoffen die vrijkomt/vrijkomen bij verwarming;

ii) De stof ondergaat een chemische reactie in het onderzochte temperatuurbereik (bijvoorbeeld afbraak, polymerisatie).

1.5.3. **Isoteniscoopmethode**

1.5.3.1. *Principe*

De isoteniscoop (6) is gebaseerd op het principe van de statische methode. Bij deze methode wordt een monster in een bol gebracht die op constante temperatuur wordt gehouden en die wordt verbonden met een manometer en een vacuümpomp. Verontreinigingen die vluchtiger zijn dan de te onderzoeken stof worden verwijderd door te ontgassen bij gereduceerde druk. De dampspanning van het monster bij de ingestelde temperatuur wordt in evenwicht gebracht met een bekende druk van een inert gas. De isoteniscoop is ontwikkeld om de dampspanning van bepaalde vloeibare koolwaterstoffen te meten, maar is eveneens geschikt voor onderzoek van vaste stoffen. Over het algemeen is de methode niet geschikt voor meercomponentensystemen. Bij monsters die niet-vluchtige verontreinigingen bevatten vertonen de resultaten slechts geringe meetfouten. Het aanbevolen meetbereik is 10^2 tot 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Apparatuur*

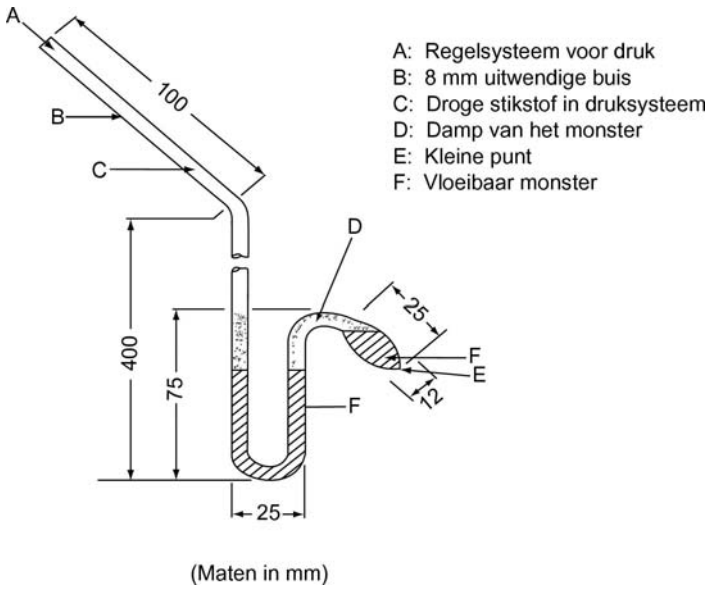
Een voorbeeld van een meetinstrument is afgebeeld in figuur 4. Zie ASTM D 2879-86 (6) voor een volledige beschrijving.

▼**M1**

1.5.3.3. *Werkwijze*

Voor vloeistoffen dient de stof zelf als vulvloeistof in de hulpmanometer. Een hoeveelheid vloeistof die voldoende is voor het vullen van de bol en de korte arm van de manometer, wordt in de isoteniscoop gebracht. De isoteniscoop wordt met het vacuümsysteem verbonden, leeggepompt en daarna gevuld met stikstof. Het leegmaken en doorspoelen van het systeem wordt tweemaal herhaald om de resterende zuurstof te verwijderen. De gevulde isoteniscoop wordt horizontaal gehouden zodat het monster zich in een dunne laag verspreidt over de monsterbol en de manometer. De druk in het systeem wordt gereduceerd tot 133 Pa en het monster wordt zachtjes verwarmd tot het juist kookt (verwijdering van opgeloste gassen). De isoteniscoop wordt dan zo gedraaid dat het monster terugloopt naar de bol en het de korte arm van de manometer vult. De druk wordt op 133 Pa gehouden. De uitgetrokken punt van de monsterbol wordt verwarmd met een kleine vlam, totdat de damp die uit het monster vrijkomt voldoende expandeert om een deel van het monster uit het bovenste gedeelte van de bol en de manometerarm te verplaatsen naar het manometergedeelte van de isoteniscoop en zo een met damp gevulde, stikstofvrije ruimte te creëren. Vervolgens wordt de isoteniscoop in een thermostatisch bad geplaatst, en de druk van de stikstof aangepast tot deze druk gelijk is aan de druk van het monster. Bij het evenwichtspunt is de dampspanning van de stikstof gelijk aan de dampspanning van de stof.

Figuur 4



(Maten in mm)

Voor vaste stoffen worden manometervloeistoffen zoals siliconenoliën of ftalaten gebruikt, afhankelijk van het druk- en temperatuurbereik. De ontgaste manometervloeistof wordt in de ronding van de lange arm van de isoteniscoop gebracht. Daarna wordt de te onderzoeken vaste stof in de bol gebracht en bij hogere temperatuur ontgast. Vervolgens wordt de isoteniscoop gekanteld zodat de manometervloeistof in de U-buis kan stromen.

▼M1

1.5.4. **Effusiemethode: dampspanningsbalans** (7)

1.5.4.1. *Principe*

Een monster van een teststof wordt verwarmd in een kleine oven en in een vacuüm stolp gebracht. De oven wordt afgesloten met een deksel met kleine openingen van bekende diameter. De damp van de stof die door een van de openingen ontsnapt, wordt naar de balansschaal van een zeer gevoelige balans geleid, die ook is omgeven door een vacuüm stolp. In sommige ontwerpen wordt de balansschaal omgeven door een koelpot voor warmteafvoer naar buiten door middel van thermische geleiding en wordt deze door straling gekoeld zodat de ontsnappende damp erop condenseert. De impuls van de dampstroom werkt als kracht op de balansschaal. De dampspanning kan op twee manieren worden afgeleid: rechtstreeks uit de kracht op de balansschaal en tevens uit de verdampingssnelheid met behulp van de Hertz-Knudsen-vergelijking (2):

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

waarin:

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

M = molaire massa (g mol^{-1})

T = temperatuur (K)

R = universele gasconstante (J mol^{-1} K^{-1})

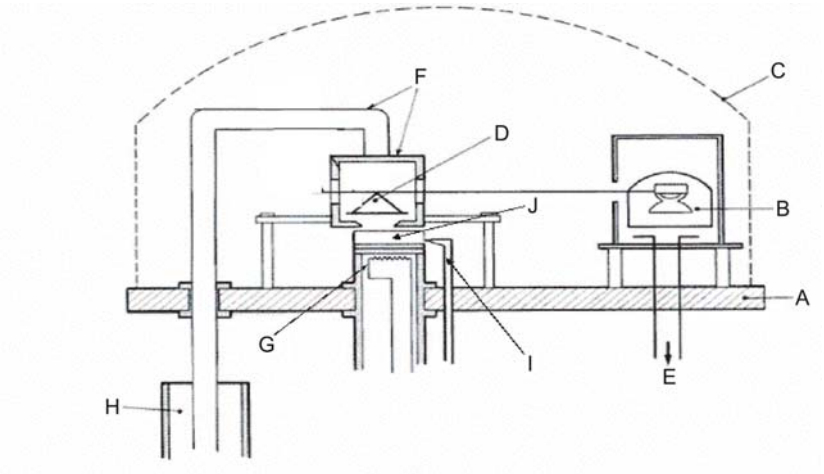
p = dampspanning (Pa)

Het aanbevolen meetbereik is 10^{-3} tot 1 Pa.

1.5.4.2. *Apparatuur*

Het algemene principe van de opstelling is weergegeven in figuur 5.

Figuur 5



A: Grondplaat

B: Instrument met bewegende spiraal

C: Stolp

D: Balans met balansschaal

E: Vacuüm meetinstrument

F: Koelpot en koelstaaf

G: Verdampingsoven

H: Dewarvat met vloeibare stikstof

I: Temperatuurmeting van het monster

J: Teststof

▼**M1**

1.5.5. **Effusiemethode: Knudsencel**

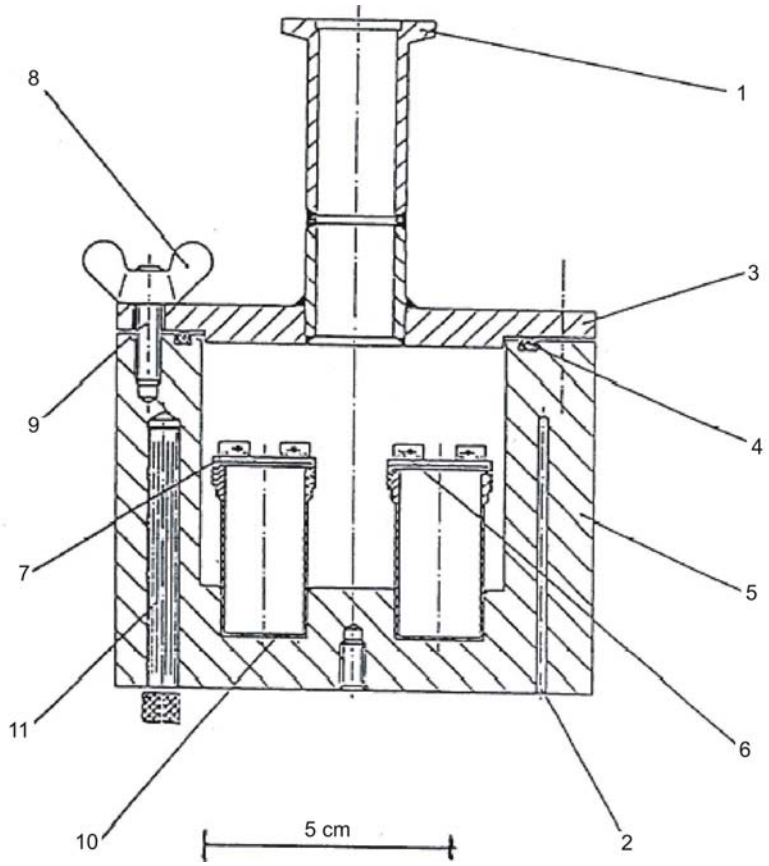
1.5.5.1. *Principe*

Deze methode berust op de schatting van de massa van de hoeveelheid teststof die per tijdseenheid in de vorm van damp door een gekalibreerde micro-opening uit een Knudsencel (8) stroomt, in ultravacuüm toestand. De uitgestroomde dampmassa kan verkregen worden door bepaling van de afname van de massa van de cel of door condensatie van de damp bij lage temperatuur en bepaling van de hoeveelheid verdampte stof met behulp van chromatografie. De dampspanning wordt berekend door toepassing van de Hertz-Knudsen-vergelijking (zie paragraaf 1.5.4.1) met correctiefactoren die afhankelijk zijn van de parameters van de apparatuur (9). Het aanbevolen meetbereik is 10^{-10} tot 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Apparatuur*

Het algemene principe van de opstelling is weergegeven in figuur 6.

Figuur 6



1:	Verbinding naar vacuüm	7:	Deksel met schroefdraad
2:	Uitsparingen voor platina weerstandsthermometer of temperatuurmeting en -regeling	8:	Vleugelmoeren
3:	Deksel voor vacuümva	9:	Bouten
4:	O-ring	10:	Roestvrijstalen uitstroomcel
5:	Aluminium vacuümvat	11:	Verwarmingspatroon
6:	Onderdeel voor het plaatsen en verwijderen van de cellen		

▼M1

1.5.6. **Effusiemethode: isotherme thermogravimetrie**

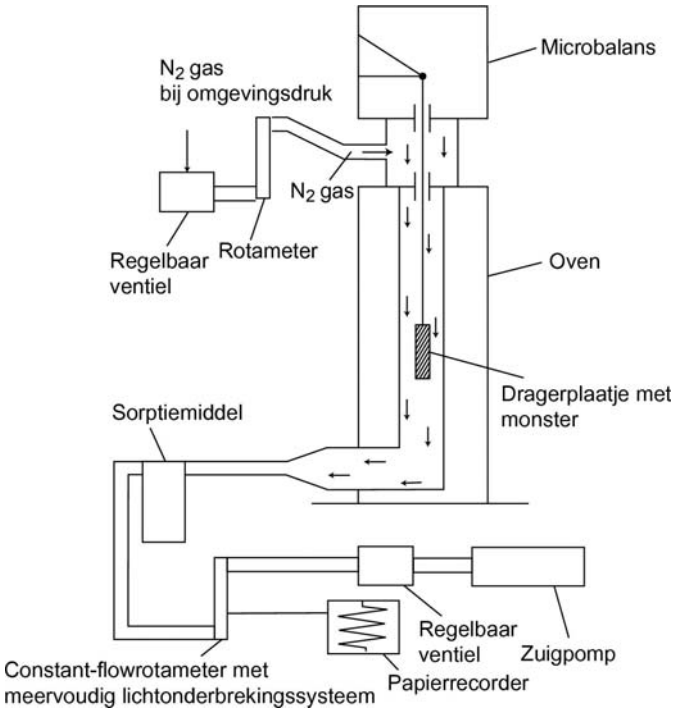
1.5.6.1. *Principe*

Deze methode berust op bepaling van de verhoogde verdampingssnelheden voor de teststof bij hogere temperaturen en omgevingsdruk door middel van thermogravimetrie (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). De verdampingssnelheden v_T worden verkregen door de gekozen verbinding bloot te stellen aan een atmosfeer van langzaam stromend inert gas en bij bekende isotherme temperaturen T in Kelvin de gewichtsafname gedurende geschikte tijdsperioden te meten. De dampspanningen p_T worden berekend uit de v_T-waarden met behulp van het lineaire verband tussen de logaritme van de dampspanning en de logaritme van de verdampingssnelheid. Indien nodig kan worden geëxtrapoleerd tot temperaturen van 20 en 25 °C door log p_T uit te zetten tegen 1/T. Deze methode is geschikt voor stoffen met dampspanningen tot 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) en met een zuiverheid die zo dicht mogelijk de 100 % benadert, teneinde een verkeerde interpretatie van de gemeten gewichtsafname te vermijden.

1.5.6.2. *Apparatuur*

Het algemene principe van de proefopstelling is weergegeven in figuur 7.

Figuur 7



De verdampte teststofmoleculen worden meegevoerd in een stroom van droog stikstofgas. Deze strijkt langs het dragerplaatje, dat aan een microbalans in een thermostatisch geregelde ruimte hangt. Na het verlaten van deze ruimte wordt de gasstroom gezuiverd door een sorptiemiddel.

1.5.6.3. *Werkwijze*

De teststof wordt als homogene laag op het oppervlak van een geruwd glasplaatje aangebracht. Bij vaste stoffen wordt het plaatje gelijkmatig bevochtigd met een oplossing van de stof in een geschikt oplosmiddel en in een inerte atmosfeer gedroogd. Voor de meting wordt het dragerplaatje in een thermogravimetrisch analyseapparaat gehangen, waarna continu de gewichtsafname als functie van de tijd wordt gemeten.

▼M1

De verdampingssnelheid v_T bij een bepaalde temperatuur wordt berekend uit de gewichtsafname Δm van het dragerplaatje met behulp van de vergelijking

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

waarin F staat voor de oppervlakte van de teststoflaag, gewoonlijk de oppervlakte van het dragerplaatje, en t de tijd is waarin de massa met Δm afneemt.

De dampspanning p_T wordt berekend op basis van het verband met de verdampingssnelheid v_T:

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

waarin C en D constanten zijn die specifiek zijn voor de gebruikte proefopstelling en die afhangen van de diameter van de meetruimte en de stroomsnelheid van het stikstofgas. Deze constanten moeten eenmalig worden bepaald door een reeks verbindingen met bekende dampspanningen te meten en log p_T uit te zetten tegen log v_T (11)(21)(22).

Het verband tussen de dampspanning p_T en de kelvintemperatuur T wordt gegeven door

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

waarin A en B constanten zijn die worden verkregen door log p_T uit te zetten tegen 1/T. Met behulp van deze vergelijking kan door extrapolatie de dampspanning voor iedere andere temperatuur worden verkregen.

1.5.7. **Gasverzadigingsmethode** (23)

1.5.7.1. *Principe*

Inert gas wordt bij kamertemperatuur en met een bekende stroomsnelheid door of over een monster van de teststof geleid. De stroomsnelheid moet laag genoeg zijn om de noodzakelijke verzadiging in de gasfase te verzekeren. De getransporteerde stof wordt opgevangen, over het algemeen met behulp van een sorptiemiddel, en aan kwantitatieve analyse onderworpen. Als een alternatief voor dampvallen met daarop volgende analyse kunnen in serie gezette analytische technieken zoals chromatografie worden gebruikt om de hoeveelheid getransporteerde stof te meten. De dampspanning wordt berekend met de aanname dat wordt voldaan aan de ideale gaswet en dat de totale druk van een gasmengsel gelijk is aan de som van de drukken van de componenten van het gasmengsel. De partiële druk van de teststof, met andere woorden de dampspanning, wordt berekend uit het bekende totale gasvolume en het gewicht van het getransporteerde materiaal.

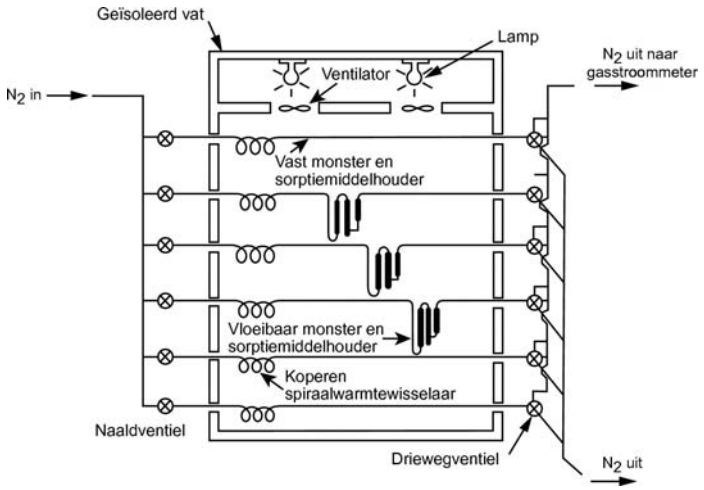
De gasverzadigingsmethode is geschikt voor vaste en vloeibare stoffen en kan worden gebruikt voor dampspanningen tot 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). De methode is het betrouwbaarst voor dampspanningen beneden 10^3 Pa. Boven 10^3 Pa levert de methode over het algemeen een te hoge waarde voor de dampspanning op, waarschijnlijk als gevolg van aerosolvorming. Aangezien de metingen van de dampspanningen bij kamertemperatuur worden uitgevoerd hoeven de data niet te worden geëxtrapoleerd vanaf hoge temperaturen en wordt extrapolatie vanaf hoge temperaturen, dikwijls aanleiding tot ernstige meetfouten, vermeden.

1.5.7.2. *Apparatuur*

De methode vereist het gebruik van een thermostatisch geregeld vat. In de opzet in figuur 8 is een vat weergegeven met drie houders voor vaste monsters en drie houders voor vloeibare monsters, zodat zowel voor een vast als voor een vloeibaar monster een analyse in drievoud kan worden uitgevoerd. De temperatuur wordt constant gehouden ± 0,5 °C of beter.

▼**M1**

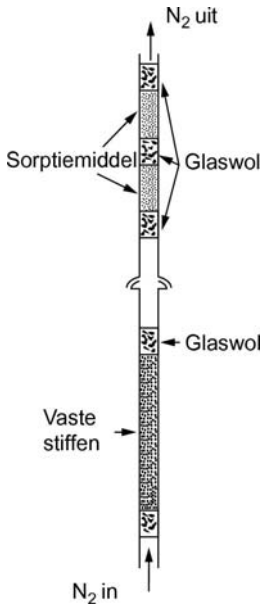
Figuur 8



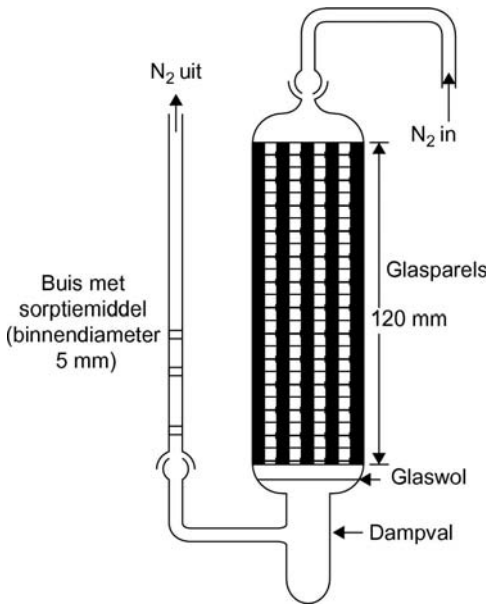
Als dragergas wordt over het algemeen stikstof gebruikt, maar in een enkel geval kan een ander gas nodig zijn (24). Het dragergas moet droog zijn. De gasstroom wordt in 6 stromen gesplitst, geregeld met naaldventielen (opening ongeveer 0,79 mm), en stroomt het vat in door koperen buizen met een binnendiameter van 3,8 mm. Als zich een temperatuurevenwicht heeft ingesteld stroomt het gas door het monster en de sorptieval, waarna het het vat verlaat.

Vaste monsters worden geladen in glazen buisjes met een binnendiameter van 5 mm, met propjes glaswol aan weerszijden (zie figuur 9). In figuur 10 is een houder voor vloeibare monsters weergegeven en een sorptiesysteem. De best reproduceerbare methode om de dampspanning van vloeistoffen te meten is door de vloeistof aan te brengen op glasparels of op een inert sorptiemiddel als silica, en hiermee de houder te beladen. Als alternatief kan men het dragergas door een grof glasfrit leiden en het door een kolom van vloeibare teststof laten borrelen.

Figuur 9



Figuur 10



▼**M1**

Het sorptiesysteem bevat een voor- en een nafilter. Bij heel lage dampspanningen worden slechts kleine hoeveelheden stof door het sorptiemiddel opgevangen en kan adsorptie aan de glaswol en de glazen buizen tussen monster en sorptiemiddel een aanzienlijk probleem vormen.

Met vast CO_2 gekoelde dampvallen vormen een andere efficiënte manier om het verdampte materiaal te verzamelen. Ze geven geen tegendruk op de verzadigingskolom en bovendien laat het opgevangen materiaal zich gemakkelijk kwantitatief analyseren.

1.5.7.3. *Werkwijze*

De stroomsnelheid van het uitstromende dragergas wordt gemeten bij kamertemperatuur. De stroomsnelheid wordt gedurende het experiment regelmatig gecontroleerd om zeker te zijn van de nauwkeurigheid van de waarde voor het totale volume van het dragergas. Continue controle met een massastroommeter verdient de voorkeur. Verzadiging van de gasfase kan aanzienlijke contacttijden vergen en dus vrij lage gasstroomsnelheden (25).

Aan het einde van het experiment worden het voor- en het nafilter van het sorptiesysteem apart geanalyseerd. De verbinding op elk filter wordt gedesorbeerd door toevoeging van een oplosmiddel. De resulterende oplossingen worden aan kwantitatieve analyse onderworpen om de massa te bepalen die van elk filter is gedesorbeerd. De keuze van de analysemethode (alsmede de keuzen van het sorptiemiddel en het desorberende oplosmiddel) hangt af van de aard van de teststof. De desorptie-efficiëntie wordt bepaald door een bekende hoeveelheid van de monsterstof op het sorptiemiddel aan te brengen, desorptie uit te voeren en te analyseren hoeveel is teruggewonnen. Het is van belang dat de desorptie-efficiëntie wordt gecontroleerd op of nabij de monsterconcentratie onder testomstandigheden.

Om er zeker van te zijn dat het dragergas verzadigd is met de teststof worden drie verschillende gasstroomsnelheden gebruikt. Als de berekende dampspanning niet verandert afhankelijk van de stroomsnelheid wordt aangenomen dat het gas is verzadigd.

De dampspanning wordt berekend met behulp van de vergelijking:

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

waarin:

p = dampspanning (Pa)

W = massa van de verdampte teststof (g)

V = volume verzadigd gas (m^3)

R = universele molaire gasconstante (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatuur (K)

M = molaire massa van de teststof (g mol^{-1}).

De gemeten volumes moeten worden gecorrigeerd voor druk- en temperatuurverschillen tussen de stroomsnelheidsmeter en de verzadigingskolom.

▼M1

1.5.8. **Draaienderotormethode**

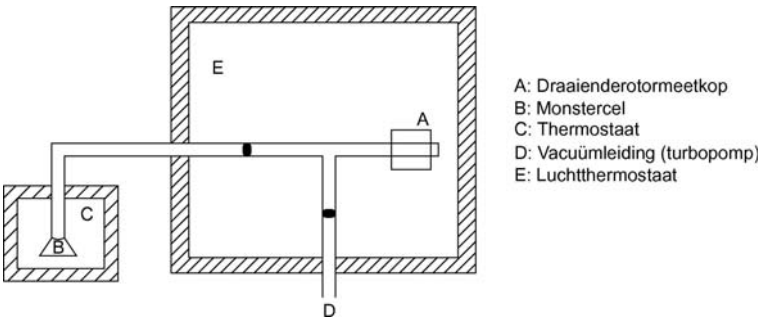
1.5.8.1. *Principe*

Bij deze methode wordt gebruikgemaakt van een draaienderotorviscositeitsmeter, met als meetelement een kleine stalen kogel die zweeft in een magnetisch veld en die aan het draaien wordt gebracht door rotatie van de velden (26)(27)(28). De draaisnelheid kan worden bepaald met meetspoelen. Als de kogel een bepaalde draaisnelheid (gewoonlijk ongeveer 400 toeren per seconde) heeft bereikt, wordt de energietoevoer gestopt waardoor een vertraging van de draaisnelheid optreedt, die het gevolg is van de gaswrijving. De afname van de rotatiesnelheid wordt gemeten als functie van de tijd. De dampspanning wordt afgeleid uit de drukafhankelijke snelheidsafname van de stalen kogel. Het aanbevolen meetbereik is 10^{-4} tot 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Apparatuur*

Een schematische tekening van de proefopstelling is afgebeeld in figuur 11. De meetkop wordt geplaatst in een van thermostaatregeling voorziene ruimte (geregeld op 0,1 °C). De monsterhouder wordt in een aparte van een thermostaatregeling voorziene ruimte (eveneens geregeld op 0,1 °C) gebracht. Om condensatie te voorkomen, worden alle andere onderdelen van de opstelling op een hogere temperatuur gehouden. Het hele toestel wordt verbonden aan een hoogvacuümsysteem.

Figuur 11



2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. GEGEVENS

In elk van de voorafgaande methoden moet de dampspanning ten minste bij twee temperaturen worden bepaald. Bepaling van de dampspanning bij drie of meer temperaturen in het bereik van 0 tot 50 °C verdient de voorkeur, aangezien men dan kan controleren of de dampspanningskromme lineair is. Bij de effusiemethode (Knudsencel en isotherme thermogravimetrie) en de gasverzadigingsmethode, wordt een temperatuurbereik voor de meting van 120 tot 150 °C aanbevolen in plaats van 0 tot 50 °C.

2.2. TESTVERSLAG

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

— de gebruikte methode;

▼M1

— de nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en indien van toepassing, voorafgaande zuivering;

— het vereiste minimumaantal van twee waarden voor de dampspanning en de bijbehorende temperaturen — bij voorkeur drie of meer — in het bereik van 0 tot 50 °C (of 120 tot 150 °C);

— ten minste één van de temperaturen dient 25 °C of lager te zijn, indien technisch mogelijk volgens de gekozen methode;

— alle ruwe gegevens;

— grafiek van log p tegen 1/T;

— geschatte waarde van de dampspanning bij 20 of 25 °C.

Indien een verandering (faseovergang, ontleding) wordt waargenomen, dienen de volgende gegevens te worden opgenomen:

— aard van de verandering;

— temperatuur waarbij de verandering optreedt bij atmosferische druk;

— dampspanning bij 10 °C respectievelijk 20 °C beneden de overgangstemperatuur en bij 10 °C respectievelijk 20 °C boven deze temperatuur (tenzij het een overgang is van vaste fase naar gasfase).

Alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

3. **LITERATUUR**

(1) *Publicatieblad van de Europese Unie* L 383 A, 26-47 (1992).

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼M1

Aanhangsel

Schattingsmethode

INLEIDING

De berekende waarden van de dampspanning kunnen als volgt worden gebruikt:

— om te bepalen welke van de experimentele methoden geschikt is;

— om een schatting of grenswaarde te verkrijgen, ingeval de experimentele methode om technische redenen niet toegepast kan worden.

SCHATTINGSMETHODE

De dampspanning van vloeistoffen en vaste stoffen kan worden geschat met behulp van de gewijzigde Correlatie van Watson (a). Het enige benodigde gegeven is de normale kooktemperatuur. De methode is toepasbaar in het drukbereik van 10^5 tot 10^{-5} Pa.

Uitgebreide informatie over deze methode wordt gegeven in het „Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (b). Zie ook OECD Environmental Monograph No.67 (c).

BEREKENINGSMETHODE

De dampspanning wordt als volgt berekend:

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

waarin:

T = betreffende temperatuur

T_b = normaal kookpunt

P_{vp} = dampspanning bij temperatuur T

ΔH_{vb} = verdampingswarmte

ΔZ_b = compressibiliteitscoëfficiënt (geschat op 0,97)

m = empirische factor afhankelijk van de fysische toestand bij de betreffende temperatuur

Voorts:

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

waarin K_F een empirische factor is waarin de polariteit van de stof tot uitdrukking komt. K_F-waarden voor verscheidene typen verbindingen worden opgesomd in referentie (b).

▼**M1**

Dikwijls zijn gegevens beschikbaar waarin een kookpunt bij verlaagde druk wordt gegeven. In dergelijke gevallen wordt de dampspanning als volgt berekend:

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

waarin T_1 staat voor het kookpunt bij de verlaagde druk P_1.

VERSLAG

Bij gebruik van de schattingsmethode dient de berekening uitvoerig in het verslag te worden gedocumenteerd.

LITERATUUR

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

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

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

▼B

A.5. OPPERVLAKTESPANNING

1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in referentie (2).

1.1. INLEIDING

De hier beschreven methoden zijn geschikt voor de bepaling van de oppervlaktespanning van waterige oplossingen.

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de oplosbaarheid in water, de structuur, de hydrolyseerbaarheid en de kritische concentraties voor de vorming van micellen.

De hieronder beschreven methoden zijn geschikt voor de meeste chemische stoffen, ongeacht de zuiverheid ervan.

Bepaling van de oppervlaktespanning met behulp van de ringspanningsmeter is alleen mogelijk voor waterige oplossingen met een dynamische viscositeit van minder dan ongeveer 200 mPa s.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De vrije-oppervlakte-enthalpie per oppervlakte-eenheid heet de oppervlaktespanning.

De oppervlaktespanning wordt uitgedrukt in

N/m (SI-eenheid) of in m

N/m (SI-subeenheid).

1 N/m = 10^3 dyne/cm

1 mN/m = 1 dyne/cm in het verouderde cgs-systeem.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

Een aantal referentiestoffen met zeer uiteenlopende oppervlaktespanningen staan vermeld in referenties (1) en (3).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

De methoden berusten op de meting van de maximale kracht die verticaal moet worden uitgeoefend op een beugel of een ring die het oppervlak van de te onderzoeken vloeistof in een meetbak raakt, om deze beugel of ring van dit oppervlak te scheiden, of op een plaat waarvan een rand het oppervlak raakt, om de vloeistoflaag die zich heeft gevormd op te trekken.

Stoffen die oplosbaar zijn in water met een concentratie van ten minste 1 mg/l worden getest in waterige oplossingen bij één concentratie.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Deze methoden zijn nauwkeuriger dan waarschijnlijk voor milieubeoordelingsdoeleinden noodzakelijk is.

▼B

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

De stof wordt opgelost in gedestilleerd water. De concentratie van deze oplossing moet 90 % van die van een verzadigde oplossing in water bedragen. Indien deze concentratie de 1 g/l overschrijdt, wordt een oplossing van 1 g/l gebruikt voor de bepaling. Stoffen met een oplosbaarheid in water van minder dan 1 mg/l hoeven niet te worden onderzocht.

1.6.1. **Plaatmethode**

Zie ISO 304 en NF T 73-060 („Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films").

1.6.2. **Beugelmethode**

Zie ISO 304 en NF T 73-060 („Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films").

1.6.3. **Ringmethode**

Zie ISO 304 en NF T 73-060 („Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films").

1.6.4. **Geharmoniseerde ringmethode (OESO)**

1.6.4.1. *Apparatuur*

In de handel verkrijgbare spanningsmeters kunnen voor deze metingen worden gebruikt. Zij bestaan uit:

— draaitafeltje;

— systeem voor het meten van de kracht;

— meetlichaam (ring);

— meetvat.

1.6.4.1.1. Draaitafeltje

Het draaitafeltje wordt gebruikt als draagvlak voor het meetvat met temperatuurregeling, waarin de te onderzoeken stof zich bevindt. Tezamen met het systeem voor het meten van de kracht is het draaitafeltje aan een rek gemonteerd.

1.6.4.1.2. Systeem voor het meten van de kracht

Het systeem voor het meten van de kracht (zie figuur) bevindt zich boven het draaitafeltje. De fout bij het meten van de kracht mag niet meer bedragen dan ± 10^{-6} N, hetgeen overeenkomt met een foutgrens van ± 0,1 mg in een massameting. De meetschaal van de in de handel verkrijgbare tensiometers is meestal geijkt in mN/m zodat de oppervlaktespanning met een nauwkeurigheid van 0,1 mN/m rechtstreeks in mN/m kan worden afgelezen.

▼B

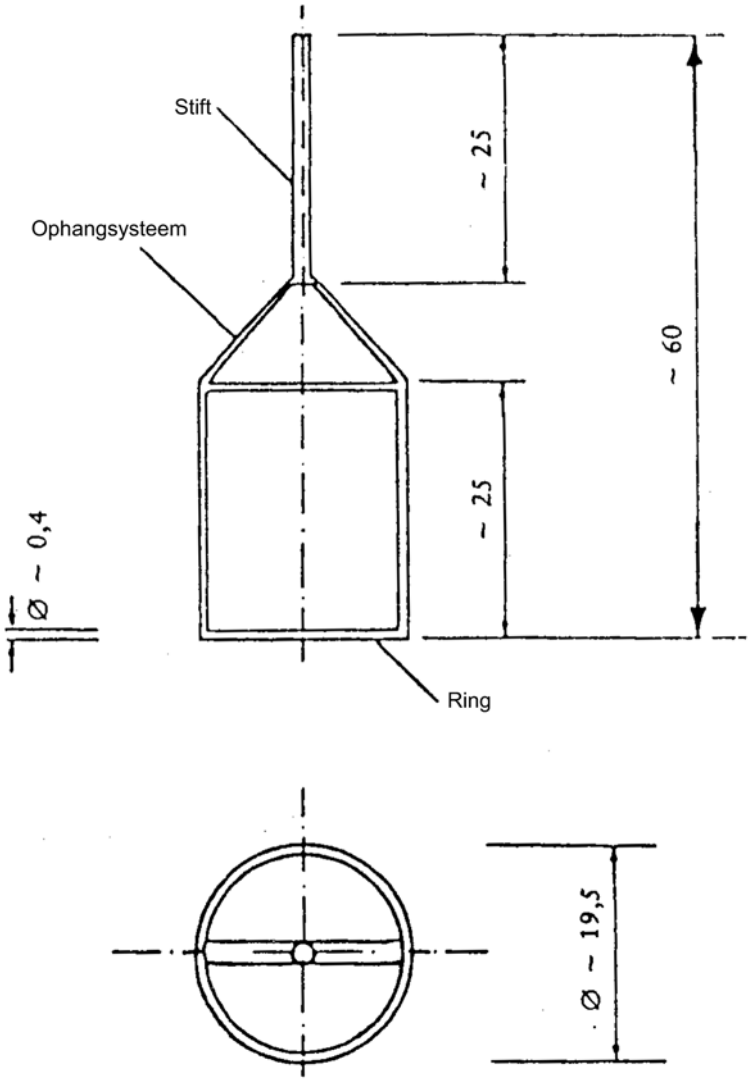
1.6.4.1.3. Meetlichaam (ring)

De ring bestaat meestal uit een draad van platina-iridium met een dikte van ongeveer 0,4 mm en een gemiddelde omtrek van 60 mm. De ring wordt horizontaal opgehangen aan een metalen stift en een ophangsysteem om de verbinding met het krachtmeetsysteem tot stand te brengen (zie figuur).

Figuur

Meetlichaam

(alle maten in mm)



1.6.4.1.4. Meetvat

Voor de te onderzoeken oplossing wordt een glazen meetvat met temperatuurregeling gebruikt. Het meetvat dient zo te zijn ontworpen dat tijdens de meting de temperatuur van de testvloeistof en de gasfase daarboven constant is en dat het monster niet kan verdampen. Ronde glazen bekers met een inwendige doorsnede van ten minste 45 mm zijn aanvaardbaar.

▼B

1.6.4.2. *Voorbereiding van het apparaat*

1.6.4.2.1. Schoonmaken

Glazen vaten dienen zorgvuldig te worden schoongemaakt. Zo nodig moeten zij worden gespoeld met heet chroomzuur en vervolgens met stroperig fosforzuur (83 tot 98 gewichtsprocent H_3PO_4), dan grondig gespoeld met leidingwater, uitgewassen met tweemaal gedestilleerd water tot een neutrale pH, en vervolgens gedroogd of omgespoeld met een gedeelte van de te onderzoeken vloeistof.

De ring wordt eerst zorgvuldig in water gespoeld ten einde wateroplosbare stoffen te verwijderen, daarna kort in chroomzuur gedompeld, in tweemaal gedestilleerd water gewassen tot een neutrale pH is bereikt en ten slotte kort verhit boven een methanolvlam.

NB:

Verontreinigende stoffen zoals siliconen die niet in chroomzuur of fosforzuur oplossen, dienen met een geschikt organisch oplosmiddel te worden verwijderd.

1.6.4.2.2. IJking van het apparaat

Bij de validering van het apparaat wordt het nulpunt gecontroleerd en zodanig ingesteld dat met de uitslag van de wijzer een nauwkeurige bepaling in mN/m mogelijk is.

Opstellen:

Het apparaat wordt, bijvoorbeeld met behulp van een waterpas aan de onderzijde van de tensiometer, horizontaal opgesteld; hiertoe wordt gebruik gemaakt van de schroeven aan de onderzijde van het apparaat.

Instelling van het nulpunt:

Na het aanbrengen van de ring aan het apparaat en alvorens deze in de vloeistof te dompelen wordt de wijzer van de tensiometer op nul gezet en wordt nagegaan of de ring evenwijdig aan het vloeistofoppervlak loopt. Hierbij kan het vloeistofoppervlak als spiegel worden gebruikt.

IJking:

Het ijken kan op twee manieren geschieden:

a) Met behulp van een massa; hierbij worden ruiters met een bekende massa van 0,1 tot 1,0 g op de ring aangebracht; de ijkfactor Φ_a, waarmee alle afgelezen waarden moeten worden vermenigvuldigd, wordt bepaald met behulp van de volgende vergelijking (1):

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

waarin:

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

m = massa van de ruiter (g)

g = versnelling door de zwaartekracht (981 cm s^{-2} op zeeniveau)

b = gemiddelde omtrek van de ring (in cm)

σ_a = uitslag van de tensiometer na het plaatsen van de ruiter op de ring (mN/m).

▼B

b) Met behulp van water; hierbij wordt gebruik gemaakt van zuiver water met een oppervlaktespanning van bijvoorbeeld 72,3 mN/m bij 23 °C; deze procedure verloopt weliswaar vlotter dan die met de ruiters, maar houdt steeds het gevaar in dat de oppervlaktespanning van het water onjuist is door de aanwezigheid van sporen oppervlakteactieve stoffen.

De ijkfactor, Φ_b, waarmee alle meetresultaten moeten worden vermenigvuldigd, wordt bepaald met behulp van de volgende vergelijking (2):

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

waarin:

σ_o = literatuurwaarde voor de oppervlaktespanning van water (mN/m),

σ_g = gemeten waarde voor de oppervlaktespanning van het water (mN/m) beide bij dezelfde temperatuur.

1.6.4.3. *Bereiding van de monsters*

De te onderzoeken stoffen worden tot de gewenste concentraties in water opgelost; er mogen geen onoplosbare stoffen in het water voorkomen.

De oplossing moet op constante temperatuur worden gehouden (± 0,5 °C). Aangezien de oppervlaktespanning van een oplossing in het meetvat met de tijd verandert, moeten er op verschillende tijdstippen metingen worden verricht en moet van de resultaten een kromme worden uitgezet waaruit het verloop van de oppervlaktespanning als functie van de tijd blijkt. Zodra geen verdere wijzigingen meer worden waargenomen, is er een evenwichtstoestand bereikt.

Stof en gasvormige verontreinigingen beïnvloeden het resultaat van de meting. De meting dient derhalve te worden verricht onder een scherm.

1.6.5. **Testomstandigheden**

De metingen dienen plaats te vinden bij ongeveer 20 °C en de temperatuur dient op ± 0,5 °C na constant te zijn.

1.6.6. **Uitvoering van de proef**

De te meten oplossingen dienen in het zorgvuldig schoongemaakte meervat te worden overgebracht waarbij schuimvorming wordt vermeden; vervolgens wordt het meetvat op de tafel van het testapparaat geplaatst. Het tafelblad met het meetvat wordt omhoog gebracht tot de ring is gedompeld onder het oppervlak van de te onderzoeken oplossing. Vervolgens laat men het tafelblad geleidelijk en regelmatig (met een snelheid van ongeveer 0,5 cm/min) zakken om de ring van het oppervlak vrij te maken, tot de maximale kracht is bereikt. De vloeistoflaag die aan de ring hangt, mag de ring niet loslaten. Na de meting wordt de ring weer onder het oppervlak gedompeld en wordt de meting herhaald tot een constante waarde voor de oppervlaktespanning is bereikt. Bij iedere bepaling dient de tijd, die verlopen is sinds het overbrengen van de vloeistof naar het meetvat, te worden genoteerd. De meter wordt afgelezen op het moment van de maximale kracht die vereist is om de ring van het oppervlak van de vloeistof los te trekken.

▼B

2. **GEGEVENS**

Ter berekening van de oppervlaktespanning wordt de van het apparaat afgelezen waarde in mN/m eerst vermenigvuldigd met de ijkfactor Φ_a of Φ_b (afhankelijk van de toegepaste ijkprocedure). Dit leidt tot een waarde die slechts bij benadering juist is en daarom nog verder moet worden gecorrigeerd.

Harkins en Jordan (4) hebben langs empirische weg correctiefactoren bepaald voor oppervlaktespanningen die met de ringmethode zijn gemeten; deze correctiefactoren zijn afhankelijk van de afmetingen van de ring, de dichtheid van de vloeistof en de oppervlaktespanning.

Het is tamelijk omslachtig om de correctiefactor voor iedere meting afzonderlijk met behulp van de tabellen van Harkins en Jordan te bepalen voor de berekening van de oppervlaktespanning; daarom kan voor waterige oplossingen gebruik worden gemaakt van een vereenvoudigde procedure waarbij de gecorrigeerde waarden voor de oppervlaktespanning rechtstreeks uit de volgende tabel worden afgelezen (tussenliggende waarden worden via interpolatie verkregen).

Tabel

Correctie van de gemeten oppervlaktespanning

Uitsluitend voor waterige oplossingen, $p \approx 1$ g/cm^3

R	= 9,55 mm (gemiddelde straal van de ring)
r	= 0,185 mm (straal van de draad van de ring)

Gemeten waarde	Gecorrigeerde waarde (mN/m)	
	(IJking met massa (zie 1.6.4.2.2 (a))	IJking met water (zie 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

Gemeten waarde	Gecorrigeerde waarde (mN/m)	
	(IJking met massa (zie 1.6.4.2.2 (a))	IJking met water (zie 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	—

Deze tabel werd opgesteld aan de hand van de correctie volgens Harkins en Jordan en overeenkomstig de DIN-normen (DIN 53914) voor water en waterige oplossingen (met een dichtheid van p = 1 g/cm^3) en voor in de handel verkrijgbare ringen met afmetingen R = 9,55 mm (gemiddelde straal van de ring) en r = 0,185 mm (straal van de draad van de ring). De tabel geeft de gecorrigeerde waarden voor oppervlaktespanningsmetingen die werden uitgevoerd na ijking met massa of met water.

Volgens een alternatieve methode zonder voorafgaande ijking kan de oppervlaktespanning als volgt worden berekend:

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

waarin:

F = de kracht die op de dynamometer wordt afgelezen bij het breken van de film

R = de straal van de ring

f = de correctiefactor (1).

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFENEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— gebruikte testmethode;

— gebruikt type water of oplossing;

— nauwkeurige specificatie van de stoffen (beschrijving en verontreinigingen);

— meetresultaten: afgelezen oppervlaktespanning waarbij zowel de afzonderlijke resultaten als het rekenkundig gemiddelde daarvan moet worden vermeld, alsmede het gecorrigeerde gemiddelde (waarbij rekening is gehouden met de correctiefactór voor het apparaat en de correctietabel);

▼B

— concentratie van de oplossing;

— temperatuur bij de meting;

— ouderdom van de gebruikte oplossing, en met name de tijd tussen de bereiding en de meting van de oplossing;

— beschrijving van de tijdafhankelijkheid van de oppervlaktespanning, na het overbrengen van de oplossing in het meetvat;

— alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, en met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de stof.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Met het oog op het feit dat gedestilleerd water een oppervlaktespanning heeft van 72,75 mN/m bij 20 °C, dienen stoffen met een oppervlaktespanning van minder dan 60 mN/m, zoals gemeten met deze methode, beschouwd te worden als oppervlakteactieve stoffen.

4. **LITERATUUR**

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

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

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

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

▼M4

A.6. **OPLOSBAARHEID IN WATER**

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 105 (1995) van de OESO (TG 105). Deze testmethode is een herziene versie van de oorspronkelijke TG 105, die in 1981 is vastgesteld. Er zijn geen inhoudelijke verschillen tussen de huidige versie en die uit 1981. De wijzigingen betreffen voornamelijk de vorm. De herziening is uitgevoerd op basis van EU-testmethode „Oplosbaarheid in water” ([1]).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

2. De oplosbaarheid in water van een stof kan aanzienlijk worden beïnvloed door de aanwezigheid van verontreinigingen. Deze testmethode betreft de bepaling van de oplosbaarheid in water van niet-vluchtige, chemisch zuivere stoffen die stabiel zijn in water. Alvorens de oplosbaarheid in water te bepalen, is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de te onderzoeken stof, zoals de structuurformule, de dampspanning, de dissociatieconstante en de hydrolyse (als functie van de pH).

3. In deze testmethode worden twee methoden beschreven: de kolomelutiemethode en de methode met de kolf, die respectievelijk van toepassing zijn op stoffen waarvan de oplosbaarheid minder of meer bedraagt dan 10^{-2} g/l. Tevens wordt een eenvoudige inleidende test beschreven. Daarmee kan worden bepaald wat bij benadering de juiste hoeveelheid van het monster is om in de uiteindelijke test te gebruiken, alsmede hoeveel tijd er nodig is om de verzadigingswaarde te bereiken.

DEFINITIES EN EENHEDEN

4. De oplosbaarheid van een stof in water is de massaconcentratie van de stof in een verzadigde oplossing in water bij een gegeven temperatuur.

5. De oplosbaarheid in water wordt uitgedrukt als de massa van opgeloste stof per volume van de oplossing. De SI-eenheid is kg/m^3 (g/l kan ook worden gebruikt).

REFERENTIESTOFFEN

6. Het is niet nodig om bij het onderzoeken van een stof referentiestoffen te gebruiken.

BESCHRIJVING VAN DE METHODEN

Testomstandigheden

7. De test wordt bij voorkeur uitgevoerd bij 20 ± 0,5 °C. De gekozen temperatuur moet in alle betrokken delen van de apparatuur constant worden gehouden.

Inleidende test

8. In een maatcilinder van 10 ml, voorzien van een glazen stop, worden stapsgewijs toenemende volumes water op kamertemperatuur toegevoegd aan ongeveer 0,1 g monster (vaste stoffen moeten worden fijngemaakt). Nadat een hoeveelheid water is toegevoegd, wordt het mengsel telkens gedurende 10 minuten geschud en vervolgens visueel onderzocht op eventuele onopgeloste delen van het monster. Als het monster of delen ervan onopgelost zijn nadat nog 10 ml water is toegevoegd, wordt het experiment herhaald in een maatcilinder van 100 ml. De benaderde waarde van de oplosbaarheid is hieronder in tabel 1 vermeld onder de hoeveelheid water waarin het monster

▼M4

geheel wordt opgelost. Bij een lagere waarde van de oplosbaarheid kan het lang duren om een teststof op te lossen en moet minimaal 24 uur in acht worden genomen. Als de teststof na 24 uur nog steeds niet is opgelost, moet langer (maximaal 96 uur) worden gewacht of moet worden geprobeerd de stof verder te verdunnen om te bepalen of de kolomelutiemehode dan wel de methode met de kolf moet worden gebruikt.

Tabel 1

ml water voor 0,1 g opgeloste stof	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
benaderde waarde van de oplosbaarheid in g/l	> 1 000	1 000 tot en met 200	200 tot en met 100	100 tot en met 50	50 tot en met 10	10 tot en met 1	< 1

Kolomelutiemethode

Principe

9. Deze methode is gebaseerd op de elutie van de te onderzoeken stof met water uit een microkolom welke is gevuld met een inert dragermateriaal dat van tevoren is gedekt met een overmaat aan de te onderzoeken stof (2). De oplosbaarheid in water is gelijk aan de massaconcentratie van het eluaat wanneer deze een plateau bereikt als functie van de tijd

Apparatuur

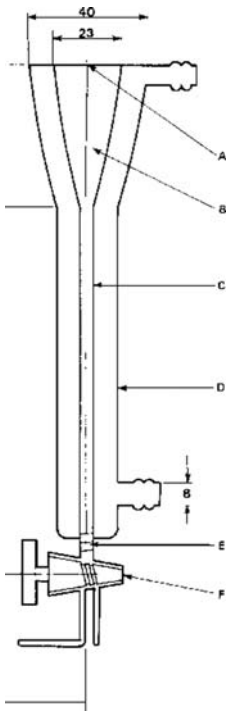
10. De apparatuur bestaat uit een microkolom (figuur 1) die op constante temperatuur wordt gehouden. Deze wordt aangesloten op een recirculatiepomp (figuur 2) of op een voorraadfles (figuur 3). De microkolom bevat een inerte drager die op zijn plaats wordt gehouden door een kleine prop glaswol, waarmee ook deeltjes worden weggefilterd. Bruikbare materialen voor de drager zijn bijvoorbeeld glasparels, diatomeeënaarde of andere inerte materialen.

11. De microkolom in figuur 1 is geschikt voor de opstelling met recirculatiepomp. Zij is aan de bovenzijde voorzien van een hoofdruimte voor vijf kolomvolumina (die aan het begin van het experiment worden afgevoerd) en voor het volume van vijf monsters (die tijdens het experiment worden genomen om te worden geanalyseerd). Eventueel kunnen de afmetingen worden verminderd indien tijdens het experiment water aan het systeem kan worden toegevoegd ter vervanging van de eerste vijf kolomvolumina welke met verontreinigingen worden afgevoerd. De kolom is door middel van slangen, gemaakt van een inert materiaal, verbonden met de circulatiepomp, die een opbrengst van ongeveer 25 ml/h moet kunnen leveren. Als recirculatiepomp kan bijvoorbeeld een peristaltische pomp of een membraanpomp worden gebruikt. Er moet op worden toegezien dat geen verontreiniging en/of adsorptie plaatsvindt met het materiaal van de slangen.

12. In figuur 3 is een schema van een opstelling met een voorraadfles afgebeeld. In deze opstelling is de microkolom voorzien van een eenwegkraan. De kolom en de voorraadfles zijn verbonden door middel van een glazen slijpstuk en slangen, gemaakt van een inert materiaal. Het debiet door de voorraadfles moet ongeveer 25 ml/h bedragen.

▼**M4**

Figuur 1



Afmetingen in mm

A. Aansluiting voor glazen slijpstuk

B. Hoofdruimte

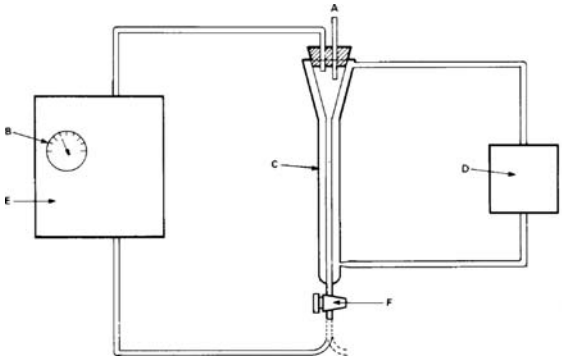
C. Inwendig 5

D. Uitwendig 19

E. Prop glaswol

F. Kraan

Figuur 2



A. Evenwicht met atmosferische druk

B. Stromingsmeter

C. Microkolom

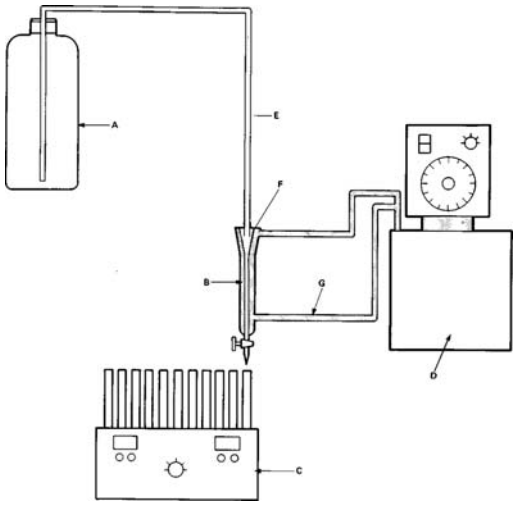
D. Circulatiepomp met thermostaatregeling

E. Recirculatiepomp

F. Tweewegkraan voor bemonstering

▼**M4**

Figuur 3



A. Voorraadfles (bijvoorbeeld een kolf van 2,5 liter)

B. Kolom

C. Fractieverzamelaar

D. Thermostaat

E. Teflonslang

F. Glazen slijpstuk

G. Waterleiding (tussen thermostaat en kolom, inwendige diameter ongeveer 8 mm)

13. Ongeveer 600 mg dragermateriaal wordt overgebracht in een rondbodemkolf van 50 ml. Een geschikte hoeveelheid van de teststof wordt opgelost in een vluchtig en analytisch zuiver oplosmiddel en de juiste hoeveelheid van deze oplossing wordt bij het dragermateriaal gevoegd. Het oplosmiddel wordt, bijvoorbeeld met behulp van een roterende verdamper, volledig verdampt. Bij onvolledige verwijdering van het oplosmiddel kan het dragermateriaal, ten gevolge van verdelingseffecten aan het oppervlak, tijdens de elutiefase niet worden verzadigd met water. Het beladen dragermateriaal wordt gedurende twee uur bevochtigd in ongeveer 5 ml water en de suspensie wordt in de microkolom gebracht. Als alternatief kan men ook het droge, beladen dragermateriaal direct in de met water gevulde microkolom brengen, en daarna twee uur wachten totdat een evenwichtstoestand is ontstaan.

14. Het laden van het dragermateriaal kan aanleiding geven tot problemen en daarmee tot onjuiste resultaten, bijvoorbeeld als de teststof wordt afgezet als olie. Deze problemen moeten worden onderzocht en de bijzonderheden moeten worden gerapporteerd.

Werkwijze met circulatiepomp

15. De stroming door de kolom wordt op gang gebracht. Een debiet van ongeveer 25 ml/h (dit komt overeen met ongeveer 10 kolomvolumina/uur voor de beschreven kolom) wordt aanbevolen. Ten minste de eerste vijf kolomvolumina worden afgevoerd om wateroplosbare verontreinigingen te verwijderen. De apparatuur blijft in werking totdat een evenwichtstoestand is bereikt; hiervoor geldt dat de concentraties in vijf opeenvolgende monsters niet meer dan ± 30 % mogen verschillen op aselecte wijze. Tussen de tijdstippen, waarop deze monsters worden genomen, moeten ten minste tien kolomvolumina passeren. Afhankelijk van de toegepaste analysemethode kan het de voorkeur genieten een concentratie/tijdcurve op te stellen om aan te tonen dat het evenwicht is bereikt.

▼M4

Werkwijze met voorraadfles

16. Er wordt een aantal opeenvolgende monsters van het eluaat genomen voor analyse volgens de gekozen methode. In het middengebied van het eluaat, wanneer de concentraties constant zijn binnen ± 30 % in ten minste vijf opeenvolgende fracties, worden de fracties gebruikt om de oplosbaarheid te bepalen.

17. Als eluens wordt bij voorkeur dubbel gedestilleerd water gebruikt. Gedeïoniseerd water met een soortelijke weerstand van meer dan 10 megohm/cm en een totaal gehalte aan organische koolstof van minder dan 0,01 % kan ook worden gebruikt.

18. Bij beide werkwijzen wordt een tweede reeks metingen verricht waarbij het debiet de helft is van de aanvankelijke waarde. Als de resultaten van beide series metingen overeenstemmen, worden de testresultaten geaccepteerd. Als de gemeten oplosbaarheid bij het laagste debiet hoger blijkt, dan moet het halveren van het debiet worden voortgezet, totdat twee opeenvolgende series metingen dezelfde oplosbaarheid geven.

19. Bij beide werkwijzen moeten de fracties aan de hand van het Tyndall-effect worden gecontroleerd op aanwezigheid van deeltjes in colloïdale toestand. De aanwezigheid van deeltjes maakt de test ongeldig, zodat de test moet worden herhaald nadat de filterwerking van de kolom is verbeterd.

20. De pH van elk monster moet worden gemeten, bij voorkeur met behulp van speciaal indicatorpapier.

Methode met de kolf

Principe

21. De teststof (vaste stoffen moeten worden fijngemaakt) wordt opgelost in water bij een temperatuur die iets hoger is dan de testtemperatuur. Zodra verzadiging is bereikt, wordt het mengsel afgekoeld en op de testtemperatuur gehouden. Als alternatief, en op voorwaarde dat men er, via geschikte monsternamen, zeker van is dat het verzadigingsevenwicht is bereikt, kan de meting rechtstreeks bij de testtemperatuur worden uitgevoerd. Vervolgens wordt de massaconcentratie van de teststof in de waterige oplossing, welke geen onopgeloste deeltjes mag bevatten, bepaald aan de hand van een geschikte analysemethode (3).

Apparatuur

22. Het volgende materiaal is nodig:

— gangbaar laboratoriumglaswerk en -apparatuur;

— een apparaat om de oplossingen in beweging te brengen bij constante temperatuur;

— zo nodig voor emulsies een centrifuge (bij voorkeur met thermostaat), en

— analyseapparatuur.

Werkwijze

23. Aan de hand van de inleidende test wordt bepaald hoeveel van de teststof nodig is om de gewenste hoeveelheid water te verzadigen. In drie van een glazen stop voorziene glazen vaten (bijvoorbeeld centrifugebuizen, kolven) wordt telkens ongeveer vijfmaal die hoeveelheid materiaal afgewogen. De op grond van de analysemethode en het oplosbaarheidsbereik vastgestelde hoeveelheid water wordt in elk vat gegoten. De vaten worden goed afgesloten en vervolgens bij 30 °C geschud. Hiervoor moet een schud- of roermachine worden gebruikt waarmee bij constante temperatuur kan worden gewerkt, bijvoorbeeld een magneetroerder in een waterbak met thermostaatregeling. Na één dag wordt 24 uur gewacht totdat in één van de vaten onder af en toe roeren bij de testtemperatuur een evenwichtstoestand is ontstaan. Vervolgens wordt de inhoud van het vat gecentrifugeerd bij de testtemperatuur, waarna de concentratie van de teststof in de heldere waterige oplossing volgens een

▼M4

geschikte analysemethode wordt bepaald. De beide andere kolven ondergaan dezelfde behandeling nadat respectievelijk twee en drie dagen bij 30 °C is gewacht totdat een evenwichtstoestand is ontstaan. Als de gemeten concentraties in ten minste de twee laatstgenoemde vaten onderling niet meer dan 15 % verschillen, worden de testresultaten geaccepteerd. Als de resultaten van de vaten 1, 2 en 3 toenemende waarden geven, moet de hele test worden herhaald, waarbij langer wordt gewacht tot een evenwichtstoestand is ontstaan.

24. De test kan ook worden uitgevoerd zonder voorverwarming bij 30 °C. Om de snelheid te kunnen schatten waarmee het verzadigingsevenwicht zich instelt, worden monsters genomen totdat blijkt dat verder roeren geen invloed meer heeft op de gemeten concentraties.

25. De pH van elk monster moet worden gemeten, bij voorkeur met behulp van speciaal indicatorpapier.

Analytische bepalingen

26. Bij voorkeur wordt een methode toegepast waarmee verschillende stoffen kunnen worden onderscheiden, aangezien kleine hoeveelheden opgeloste verontreinigingen kunnen leiden tot grote fouten in de gemeten oplosbaarheid. Voorbeelden van zulke methoden zijn: gas- of vloeistofchromatografie, titratie, fotometrie, voltametrie.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

Kolomelutiemethode

27. Voor elke serie metingen moeten het gemiddelde en de standaardafwijking worden berekend van ten minste vijf opeenvolgende monsters, die op het verzadigingsniveau zijn genomen. De gemiddelde waarden uit twee tests met verschillend debiet mogen onderling niet meer dan 30 % verschillen.

Methode met de kolf

28. Het gemiddelde van de aparte resultaten voor de drie kolven, die onderling niet meer dan 15 % mogen verschillen, wordt berekend.

Testverslag

Kolomelutiemethode

29. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

— de resultaten van de inleidende test;

— de chemische identiteit en verontreinigingen en indien van toepassing, de voorafgaande zuivering;

— de concentraties, debieten en pH-waarden voor elk monster;

— het gemiddelde en de standaardafwijking van ten minste vijf monsters uit elke serie die op het verzadigingsniveau zijn genomen;

— het gemiddelde van ten minste twee opeenvolgende series;

— de temperatuur van het water tijdens het verzadigingsproces;

— de analysemethode;

— de aard van het dragermateriaal;

— het laden van het dragermateriaal;

— het gebruikte oplosmiddel;

— elke gebleken chemische instabiliteit van de stof tijdens de test;

— alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de teststof.

▼**M4**

Methode met de kolf

30. In het verslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

— de resultaten van de inleidende test;

— de chemische identiteit en verontreinigingen en indien van toepassing, de voorafgaande zuivering;

— de afzonderlijke analysen en het gemiddelde, indien meer dan één waarde werd bepaald, voor iedere kolf;

— de pH van elk monster;

— het gemiddelde van de waarden voor de verschillende kolven die onderling overeenstemden;

— de testtemperatuur;

— de analysemethode;

— elke gebleken chemische instabiliteit van de stof tijdens de test;

— alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de teststof.

LITERATUUR:

(1) Richtlijn 92/69/EEG van de Commissie van 31 juli 1992 houdende zeventiende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen (PB L 383 van 29.12.1992, blz. 113).

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

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

▼B

A.8. VERDELINGSCOËFFICIËNT

1. METHODE

De „schudfles”-methode berust op de testrichtlijn van de OESO (1).

1.1. INLEIDING

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de structuurformule, dissociatieconstante, oplosbaarheid in water, hydrolyse, oplosbaarheid in *n*-octanol en oppervlaktespanning van de stof.

Metingen van ioniseerbare stoffen dienen alleen te worden uitgevoerd met de niet-geïoniseerde vorm van de stof (vrij zuur of vrije base) verkregen met behulp van een geschikte buffer met een pH van minstens één pH-eenheid onder (vrij zuur) of boven (vrije base) de pK.

Deze testmethode omvat twee verschillende procedures: de schudflesmethode en de hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC). De eerste methode is toepasbaar wanneer de log P_{ow}-waarde (zie verder voor definities) in het bereik van - 2 tot 4 valt, de tweede methode in het bereik van 0 tot 6. Alvorens een van beide experimentele procedures uit te voeren, dient eerst een voorlopige schatting van de verdelingscoëfficiënt te worden gemaakt.

De schudflesmethode is alleen van toepassing op chemisch zuivere stoffen die oplosbaar zijn in water en *n*-octanol. De methode is niet van toepassing op oppervlakteactieve stoffen (waarvoor een berekende waarde of een raming, gebaseerd op de individuele oplosbaarheid in *n*-octanol en water, moet worden gerapporteerd).

De HPLC-methode is niet toepasbaar op sterke zuren en basen, metaalcomplexen en oppervlakte-actieve stoffen die met het eluent kunnen reageren. Voor deze stoffen dient een berekende waarde of een raming, gebaseerd op de individuele oplosbaarheid in n -octanol en water, te worden gerapporteerd.

De HPLC-methode is minder gevoelig voor de aanwezigheid van verontreinigingen in de teststof dan de schudflesmethode. Desondanks kunnen verontreinigingen soms de interpretatie van de resultaten bemoeilijken omdat moeilijk kan worden bepaald welke piek bij welke stof hoort. Voor mengsels die een band zonder resolutie geven, moeten de boven- en ondergrens van log P worden gerapporteerd.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De verdelingscoëfficiënt (P) is gedefinieerd als de verhouding van de concentraties in evenwichtstoestand (C_j) van een opgeloste stof in een twee-fasensysteem bestaande uit twee niet-mengbare oplosmiddelen. Voor *n*-octanol en water:

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

De verdelingscoëfficiënt (P) is daarom het quotiënt van twee concentraties; gewoonlijk wordt deze waarde opgegeven als een logaritme met grondtal tien (log P).

▼B

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Schudflesmethode

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

HPLC-methode

Om de gemeten HPLC-gegevens van een stof te kunnen correleren met de P-waarde, moet een ijklijn worden gemaakt van log P tegen de chromatografische gegevens, met behulp van minstens 6 referentiepunten. De gebruiker dient de geschikte referentiestoffen te kiezen. Zo mogelijk dient de P_{ow}-waarde van minstens één referentiestof boven, en die van minstens één referentiestof onder de P_{ow} van de teststof te liggen. Voor log P-waarden kleiner dan 4 kan bij de ijking worden uitgegaan van met de schudflesmethode verkregen gegevens. Voor log P-waarden groter dan 4 kan de ijking worden uitgevoerd met behulp van gevalideerde waarden uit de literatuur, op voorwaarde dat deze overeenkomen met de berekende waarden. Voor een grotere nauwkeurigheid verdient het de voorkeur om referentiestoffen te kiezen die qua structuur verwant zijn aan de te onderzoeken stof.

Er zijn uitgebreide lijsten beschikbaar met log P_{ow}-waarden voor verschillende categorieën chemicaliën (2)(3). Als er geen gegevens over de verdelingscoëfficiënt van structureel verwante stoffen beschikbaar zijn, mag een meer algemene ijking worden toegepast met andere ijkstoffen.

In aanhangsel 2 wordt een lijst van aanbevolen ijkstoffen en hun P_{ow}-waarden gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Schudflesmethode**

Om een verdelingscoëfficiënt te kunnen bepalen, moet een evenwichtstoestand zijn bereikt tussen alle componenten van het systeem; de concentraties van de opgeloste stoffen moeten vervolgens in beide fasen worden bepaald. Uit de literatuur blijkt dat er voor dit probleem, dat wil zeggen het grondig mengen van beide fasen gevolgd door fasescheiding ten einde de evenwichtsconcentraties van de te onderzoeken stof te bepalen, verschillende technische oplossingen bestaan.

1.4.2. **HPLC-methode**

HPLC wordt uitgevoerd met analytische kolommen, gepakt met een in de handel verkrijgbare vaste fase, bestaande uit chemisch aan silica gebonden lange koolwaterstofketens (bijvoorbeeld C_8, C_{18}). Chemische stoffen die in deze kolommen geïnjecteerd worden, bewegen met verschillende snelheden door deze kolommen, wat een gevolg is van het verschil in verdeling tussen de mobiele fase en de stationaire koolwaterstoffase. Mengsels van stoffen worden geëlueerd in volgorde van waterafstotendheid, wateroplosbare stoffen het eerst en olieoplosbare stoffen het laatst, afhankelijk van hun koolwaterstof/water-verdelingscoëfficiënt. Op deze wijze kan de verhouding tussen de retentietijd in de (omgekeerde fase) kolom en de *n*-octanol/water-verdelingscoëfficiënt worden bepaald. De verdelingscoëfficiënt wordt afgeleid uit de capaciteitsfactor k, met de volgende formule:

▼B

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

waarin t_R = retentietijd van de te onderzoeken stof, en t_0 = gemiddelde tijd die een molecuul van het oplosmiddel nodig heeft om de kolom te passeren (dode tijd).

Kwantitatieve analysemethoden zijn niet vereist, alleen de elutietijd moet worden bepaald.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

1.5.1. **Herhaalbaarheid**

Schudflesmethode

Om de nauwkeurigheid van de verdelingscoëfficiënt te garanderen moeten duplo-metingen worden verricht onder drie uiteenlopende testomstandigheden; hierbij kan zowel de hoeveelheid stof als de verhouding van de hoeveelheden oplosmiddel worden gevarieerd. De gevonden waarden van de verdelingscoëfficiënt moeten, uitgedrukt in gewone logaritmen, binnen een interval van ± 0,3 logeenheden vallen.

HPLC-methode

Om de betrouwbaarheid van de meting te vergroten moeten duplometingen worden verricht. De log P-waarden, afgeleid uit de individuele metingen, moeten binnen een bereik van ± 0,1 log-eenheid liggen.

1.5.2. **Gevoeligheid**

Schudflesmethode

Het meetbereik van de methode wordt bepaald door de detectiegrens van de analysemethode. Deze moet voldoende laag zijn om log P_{ow}-waarden in het bereik van – 2 tot 4 te kunnen bepalen (onder speciale voorwaarden kan dit bereik uitgebreid worden tot een log P_{ow} van 5), wanneer de concentratie van de opgeloste stof in geen van beide fasen hoger is dan 0,01 mol per liter.

HPLC-methode

Met de HPLC-methode kunnen verdelingscoëfficiënten worden bepaald in het log P_{ow}-bereik van 0 tot 6.

Normaal gezien kan de verdelingscoëfficiënt van een mengsel worden geschat tot op ± 1 log-eenheid van de schudfleswaarde. Voorbeelden van correlaties kunnen worden teruggevonden in de literatuur (4, 5, 6, 7, 8). Grotere nauwkeurigheid kan meestal worden bereikt met behulp van correlatiekrommen gebaseerd op referentiemengsels met verwante structuur (9).

▼B

1.5.3. **Specificiteit**

Schudflesmethode

De verdelingswet van Nernst geldt alleen voor verdunde oplossingen bij constante temperatuur, druk en pH. De wet geldt bovendien voor een zuivere stof die wordt verdeeld tussen twee zuivere oplosmiddelen. Indien in één of beide fasen tegelijkertijd verschillende opgeloste stoffen voorkomen, dan kan dit van invloed zijn op de resultaten.

Dissociatie of associatie van de opgeloste moleculen leidt tot afwijkingen van de verdelingswet van Nernst. Dergelijke afwijkingen blijken uit de concentratieafhankelijkheid van de verdelingscoëfficiënt.

Wegens het voorkomen van meervoudige evenwichtstoestanden mag deze test niet zonder correcties worden toegepast op ioniseerbare stoffen. Voor dergelijke stoffen dient het gebruik van bufferoplossingen in plaats van water te worden overwogen; de pH van de buffer dient ten minste 1 pH-eenheid te verschillen van de pKa van de stof en men dient rekening te houden met het belang van deze pH met betrekking tot het milieu.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Inleidende schatting van de verdelingscoëfficiënt**

De verdelingscoëfficiënt wordt bij voorkeur geschat aan de hand van een berekeningsmethode (zie aanhangsel 1) of, indien van toepassing, op basis van de oplosbaarheidsverhouding van de te onderzoeken stof in de zuivere oplosmiddelen (10).

1.6.2. **Schudflesmethode**

1.6.2.1. *Voorbereiding*

n-Octanol: de verdelingscoëfficiënt moet worden bepaald met analytisch zuiver oplosmiddel.

Water: er moet gebruik worden gemaakt van gedestilleerd of dubbel gedestilleerd water uit apparatuur van glas of kwarts. Voor ioniseerbare verbindingen dienen zo nodig bufferoplossingen in plaats van water te worden gebruikt.

Opmerking:

Er mag geen gebruik worden gemaakt van water dat rechtstreeks uit een ionenwisselaar komt.

1.6.2.1.1. Voorverzadiging van de oplosmiddelen

Alvorens een verdelingscoëfficiënt te bepalen, worden de fasen van het oplosmiddelsysteem onderling verzadigd door uitschudden bij de temperatuur van het experiment. Hiertoe is het handig om gedurende 24 uur twee grote voorraadflessen met analytisch zeer zuiver *n*-octanol, respectievelijk water, waaraan voldoende water respectievelijk *n*-octanol is toegevoegd, mechanisch te schudden en daarna te laten staan totdat de fasen zich afscheiden en een verzadigingstoestand is ontstaan.

▼B

1.6.2.1.2. Voorbereiding van de test

Het twee-fasensysteem moet het testvat bijna vullen. Aldus wordt vervluchtiging van de vloeistof voorkomen. De volumeverhouding en de benodigde hoeveelheid van de te onderzoeken stof worden bepaald door:

— de inleidende bepaling van de verdelingscoëfficiënt (zie 1.6.1);

— de minimale hoeveelheid van de te onderzoeken stof vereist voor de analyse;

— de beperking van de maximale concentratie in beide fasen tot 0,01 mol/l.

Er worden drie tests uitgevoerd: in de eerste test wordt gewerkt met de berekende volumeverhouding *n*-octanol/water; in de tweede test wordt deze verhouding gedeeld door twee, in de derde test wordt deze verhouding vermenigvuldigd met twee (bijvoorbeeld 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. De te onderzoeken stof

Er wordt een voorraadoplossing bereid uit *n*-octanol voorverzadigd met water. De concentratie van deze voorraadoplossing moet nauwkeurig worden bepaald voor gebruik bij de bepaling van de verdelingscoëfficiënt. Deze oplossing moet onder stabiele omstandigheden bewaard worden.

1.6.2.2. *Testomstandigheden*

De testtemperatuur moet constant (± 1 °C) worden gehouden binnen een bereik van 20-25 °C.

1.6.2.3. *Meetprocedure*

1.6.2.3.1. Instelling van het verdelingsevenwicht

Voor de verschillende testomstandigheden moeten steeds twee testvaten worden gevuld met de vereiste, nauwkeurig bekende hoeveelheden van beide oplosmiddelen en de gewenste hoeveelheid voorraadoplossing.

Het volume van de *n*-octanol-fasen moet worden gemeten. De testvaten moeten in een schudmachine worden geplaatst of met de hand worden geschud. Aanbevolen wordt om, bij gebruik van een centrifugebuis, deze snel 180° te draaien om de transversale as, zodat de ingesloten lucht door de beide fasen omhoog beweegt. De ervaring heeft geleerd dat 50 van dergelijke bewegingen gewoonlijk voldoende zijn om het verdelingsevenwicht te bereiken. Om zeker te zijn wordt aangeraden om 100 bewegingen uit te voeren in 5 minuten.

1.6.2.3.2. Scheiding van de fasen

Indien noodzakelijk, moet het mengsel worden gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. Dit moet worden gedaan in een laboratoriumcentrifuge bij kamertemperatuur; indien een centrifuge zonder temperatuurregeling wordt gebruikt, moeten de centrifugebuizen ten minste gedurende één uur op de testtemperatuur worden gehouden, zodat de evenwichtstoestand zich kan instellen voordat de analyse wordt uitgevoerd.

▼B

1.6.2.4. *Analyse*

Voor bepaling van de verdelingscoëfficiënt moet de concentratie van de te onderzoeken stof in beide fasen worden bepaald. Dit kan worden gedaan door onder de verschillende testomstandigheden uit alle buizen een monster van iedere fase te nemen en dit volgens de gekozen procedure te analyseren. De totale hoeveelheid van de te onderzoeken stof in beide fasen wordt berekend en vergeleken met de oorspronkelijke hoeveelheid toegevoegde stof.

Van de waterfase moet een monster worden genomen volgens een procedure waardoor zo min mogelijk sporen n-octanol worden meegenomen: voor de bemonstering van de waterfase kan een glazen injectiespuit met verwisselbare naald worden gebruikt. De injectiespuit moet van tevoren gedeeltelijk worden gevuld met lucht. De lucht moet zachtjes worden uitgedreven terwijl de naald door de *n*-octanol-fase wordt gestoken. De benodigde hoeveelheid van de waterfase wordt in de injectiespuit gezogen. De spuit wordt snel uit de oplossing gehaald, waarna de naald wordt losgemaakt. De inhoud van de injectiespuit kan nu worden gebruikt als monster van de waterfase. De concentratie in de twee afzonderlijke fasen dient bij voorkeur te worden bepaald met behulp van een analysemethode waarmee verschillende stoffen kunnen worden onderscheiden. Enkele voorbeelden van geschikte analysenmethoden zijn:

— fotometrische methoden;

— gaschromatografie;

— hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC).

1.6.3. **HPLC-methode**

1.6.3.1. *Voorbereiding*

Apparatuur

Benodigd is een vloeistofchromatograaf, uitgerust met een niet-pulserende pomp en een geschikte detectie-in-richting. Het gebruik van een injectieventiel met injectielussen wordt aangeraden. Aangezien de aanwezigheid van polaire groepen in de stationaire fase het juiste gedrag van de HPLC-kolom ernstig kan beïnvloeden, dient deze een zo klein mogelijk percentage polaire groepen te bevatten (11). Men kan gebruik maken van in de handel verkrijgbare, met microdeeltjes gevulde, omgekeerde fasepakkingen of van voorgepakte kolommen. Tussen het injectiesysteem en de analytische kolom kan een voorkolom worden geïnstalleerd.

Mobiele fase

Methanol en water, beide van HPLC-kwaliteit, worden gebruikt als elutiemiddel, dat voor gebruik wordt ontgast. Isokratische elutie dient te worden toegepast. Men moet methanol/water-verhoudingen met minimaal 25 % watergehalte gebruiken, normaliter neemt men een 3:1 (v/v) methanol/watermengsel om verbindingen met een log P van 6 binnen het uur te elueren, bij een stroomsnelheid van 1 ml/minuut. Voor verbindingen met een hoge log P kan het noodzakelijk zijn om de elutietijd te verkorten (evenals voor de referentiestoffen) door de polariteit van de mobiele fase of de kolomlengte te verminderen.

Stoffen met een zeer lage oplosbaarheid in n-octanol geven met de HPLC-methode veelal abnormaal lage log P_{ow}-waarden; de pieken van dergelijke stoffen vallen soms samen met het oplosmiddelfront. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat het verdelingsproces te traag verloopt om het evenwicht te bereiken binnen de tijdsduur die normaal voor een HPLC-scheiding nodig is. Het kan dan nuttig zijn om de stroomsnelheid en/of de methanol/water-verhouding te verlagen ten einde een betrouwbare waarde te verkrijgen.

▼B

Test- en referentiestoffen moeten in voldoende concentratie oplosbaar zijn in de mobiele fase om detectie mogelijk te maken. Alleen in uitzonderingsgevallen mogen additieven in het methanol/watermengsel worden gebruikt, daar toevoegingen de eigenschappen van de kolom veranderen. Voor chromatogrammen met additieven is het verplicht een aparte kolom van hetzelfde type te gebruiken. Als methanol/water niet voldoet, mogen andere organisch-oplosmiddel/water-mengsels worden gebruikt, bijvoorbeeld ethanol/water of acetonitril/water.

De pH van het eluent is kritisch voor ioniseerbare stoffen. Hij moet in het juiste pH-bereik van de kolom liggen, gewoonlijk tussen 2 en 8. Bufferen wordt aangeraden. Voorzichtigheid dient in acht te worden genomen om neerslag van zout en achteruitgang van de kolom te voorkomen, hetgeen optreedt met sommige organische fase/buffermengsels. HPLC-metingen met stationaire fasen op basis van silica boven pH 8 worden afgeraden omdat het gebruik van een alkalische mobiele fase kan leiden rot een snelle achteruitgang van de kolomeigenschappen.

Opgeloste stoffen

De referentiestoffen dienen zo zuiver mogelijk te zijn. Verbindingen voor test- of ijkdoeleinden worden, indien mogelijk, opgelost in de mobiele fase.

Testomstandigheden

De temperatuur gedurende de metingen mag niet meer variëren dan ± 2 K.

1.6.3.2. **Meting**

Berekening van de dode tijd t_0

De dode tijd t_0 kan bepaald worden met of wel een homologe serie (bijvoorbeeld n-alkylmethylketonen) of wel organische stoffen die niet worden tegengehouden (bijvoorbeeld thioureum of formamide). Ter berekening van de dode tijd t_0 met een homologe serie moet een set van ten minste 7 stoffen uit dezelfde serie worden geïnjecteerd en moeten de respectieve retentietijden worden bepaald. De ruwe retentietijden $t_{r(nc + 1)}$ worden uitgezet als functie van $t_{r(nc)}$, en het snijpunt a en de helling b van de regressievergelijking:

$$t_{r(nc + 1)} = a + bt_{r\ (nc)}$$

worden bepaald (n_c = aantal koolstofatomen). De dode tijd t_0 wordt dan gegeven door:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

▼B

IJklijn

De volgende stap bestaat uit het construeren van een correlatiekromme van log k-waarden tegen log P voor geschikte referentiestoffen. In de praktijk wordt een set van 5 tot 10 standaard-referentiestoffen, met een log P-waarde rond het te verwachten bereik, tegelijkertijd geïnjecteerd en worden de retentietijden bepaald, bij voorkeur met een recorder/integrator die is verbonden met het detectiesysteem. De corresponderende logaritmen van de capaciteitsfactoren, log k, worden berekend en uitgezet als functie van log P, bepaald met de schudflesmethode. De ijking wordt uitgevoerd met regelmatige tussenpozen, minstens eenmaal per dag, zodat rekening kan worden gehouden met mogelijke veranderingen in het gedrag van de kolom.

Bepaling van de capaciteitsfactor van de te onderzoeken stof

De teststof wordt in een zo klein mogelijke hoeveelheid van de mobiele fase geïnjecteerd. De retentietijd wordt bepaald (in duplo), om zo de capaciteitsfactor k te kunnen berekenen. Uit de correlatiegrafiek van de ijkstoffen kan de verdelingscoëfficiënt van de teststof worden geïnterpoleerd. Voor zeer lage en zeer hoge verdelingscoëfficiënten is extrapolatie noodzakelijk. In deze gevallen dient men extra aandacht te besteden aan de betrouwbaarheidsgrenzen van de regressielijn.

2. **GEGEVENS**

Schudflesmethode

De betrouwbaarheid van de gevonden waarden voor P kan worden onderzocht door de gemiddelden van de duplo-bepalingen te vergelijken met het totale gemiddelde.

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen);

— indien de methoden niet toepasbaar zijn (bijvoorbeeld oppervlakteactieve stoffen), dient een berekende waarde of een schatting gebaseerd op de individuele oplosbaarheid in n-octanol en water te worden opgegeven;

— alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof.

Voor de schudflesmethode:

— het resultaat van de inleidende schatting, indien van toepassing;

— testtemperatuur;

— gegevens over de analytische procedures voor bepaling van de concentraties;

— tijd en snelheid van centrifugeren, indien van toepassing;

▼B

— de gemeten concentraties in beide fasen voor elke bepaling (dit betekent dat in totaal 12 concentraties worden vermeld);

— het gewicht van de onderzochte stof, het volume van elke fase in elk testvat en de berekende totale hoeveelheid van de onderzochte stof in elke fase bij evenwicht;

— de berekende waarden van de verdelingscoëfficiënt (P) en het gemiddelde voor iedere groep testomstandigheden, evenals het gemiddelde van alle metingen; indien er aanwijzingen zijn dat de verdelingscoëfficiënt afhankelijk is van de concentratie, dient dit te worden vermeld in het testrapport;

— de standaardafwijking van de afzonderlijke P-waarden ten opzichte van het gemiddelde;

— de logaritme (grondtal 10) van de P-waarde gemiddeld over alle metingen;

— de theoretisch berekende waarde van P_{ow}, wanneer deze is bepaald of wanneer de gemeten waarde groter is dan 10^4;

— pH van het gebruikte water en van de waterfase tijdens het experiment;

— indien bufferoplossingen worden gebruikt, de redenen voor het gebruik van bufferoplossingen in plaats van water, samenstelling, concentratie en pH van de bufferoplossingen, pH van de waterige fase vóór en na het experiment.

Voor de HPLC-methode:

— het resultaat van de inleidende schatting, indien van toepassing;

— test- en referentiestoffen, en de zuiverheid;

— testtemperatuur;

— de pH waarbij de bepaling wordt uitgevoerd;

— details van de analytische en de voorkolom, de mobiele fase en de detectiemethode;

— retentiegegevens en log P-waarden uit de literatuur voor de bij de ijking gebruikte referentiestoffen;

— details van de gevonden regressielijn (log k tegen log P);

— gemiddelde retentiegegevens en de geïnterpoleerde log P-waarde voor de teststof;

— beschrijving van de apparatuur en de werkomstandigheden;

— elutieprofielen;

— de hoeveelheden test- en referentiestoffen die in de kolom zijn gebracht;

— dode tijd en hoe hij gemeten werd.

▼B

4. **LITERATUUR**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(15) CV. Eadsforth en P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1 459.

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

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani en E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1 207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson en G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1 113.

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Aanhangsel 1

Berekenings-/schattingsmethoden

INLEIDING

Een algemene inleiding tot berekeningsmethoden, gegevens en voorbeelden worden gegeven in het „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (a).

Berekende waarden voor P_{ow} kunnen worden gebruikt:

— om te beslissen welke van de experimentele methoden het meest geschikt is (schudflesbereik: log P_{ow}: – 2 tot 4, HPLC-bereik: log P_{ow}: 0 tot 6);

— om de geschikte testvoorwaarden te kunnen kiezen (bijvoorbeeld referentiestoffen voor de HPLC-methode, n-octanol/water-volumeverhoudingen voor de schudflesmethode);

— ter controle voor het laboratorium zelf van eventuele fouten in het experiment;

— om een P_{ow}-schatting te leveren in die gevallen waar de experimentele methoden om technische redenen niet kunnen worden toegepast.

SCHATTINGSMETHODE

Inleidende schatting van de verdelingscoëfficiënt

De waarde van de verdelingscoëfficiënt kan geschat worden met behulp van de oplosbaarheid van de teststof in zuivere oplosmiddelen. Hiervoor geldt:

$$P_{geschat} = \frac{c_{n-oktanol}\,\text{verzadigd}}{c_{water}\,\text{verzadigd}}$$

BEREKENINGSMETHODEN

Principe van de berekeningsmethoden

Alle berekeningsmethoden zijn gebaseerd op de formele fragmentatie van het molecuul in geschikte substructuren, waarvoor betrouwbare log P_{ow}-fragmentconstanten bekend zijn. De log P_{ow} van het volledige molecuul wordt dan berekend als de som van de afzonderlijke waarden van de overeenkomstige fragmenten, plus de som van de correctietermen voor intramoleculaire wisselwerkingen.

Lijsten van fragmentconstanten en correctietermen zijn te vinden in de literatuur (b)(c)(d)(e). Sommige hiervan worden regelmatig bijgewerkt (b).

Kwaliteitscriteria

Over het algemeen vermindert de betrouwbaarheid van een berekeningsmethode met het toenemen van de complexiteit van de onderzochte stof. Voor eenvoudige moleculen met laag molecuulgewicht en slechts één of twee functionele groepen kan een afwijking van 0,1 tot 0,3 log P_{ow}-eenheden worden verwacht tussen de resultaten van de verschillende fragmentatiemethoden en de gemeten waarde. Voor meer complexe moleculen kan de fout groter zijn. Dit is afhankelijk van de betrouwbaarheid en beschikbaarheid van fragmentconstanten, alsmede van het vermogen om intramoleculaire wisselwerkingen (bijvoorbeeld waterstofbruggen) te herkennen en het juiste gebruik van de correctietermen (minder problematisch met de computersoftware CLOGP-3) (b). In geval van ioniserende verbindingen is het belangrijk de lading of de mate van ionisatie juist in te schatten.

▼B

Berekeningsprocedures

Hansch π-methode

De oorspronkelijke hydrofobesubstitutieconstante π, geïntroduceerd door Fujita et al. (f), wordt gedefinieerd als:

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

waarin P_{ow} (PhX) de verdelingscoëfficiënt van een aromatisch derivaat is, en P_{ow} (PhH) die van de oorspronkelijke verbinding,

(bijvoorbeeld $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5C1) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

Volgens zijn definitie is de Л-methode voornamelijk toepasbaar op aromatische substitutie. De Л-waarden van een groot aantal substitutiegroepen zijn in tabellen terug te vinden (b)(c)(d). Deze worden gebruikt voor de berekening van log P_{ow} van aromatische moleculen of substructuren.

Rekker-Methode

Volgens Rekker (g) wordt de log P_{ow}-waarde als volgt berekend:

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

waarin f_i de moleculaire fragmentconstante voorstelt en a_i de frequentie van het voorkomen ervan in het onderzochte molecuul. De correctietermen kunnen worden uitgedrukt als een integraal veelvoud van eén enkele constante c_m (de zogenaamde „magische" constante). De fragmentconstanten f_i en c_m werden bepaald uit een lijst van 1 054 experimentele P_{ow} waarden (825 stoffen) met behulp van meervoudige regressieanalyse (c)(h). De bepaling van de interactietermen wordt uitgevoerd volgens vaste regels beschreven in de literatuur (e)(h)(i).

Hansch-Leo-methode

Volgens Hansch en Leo (c) wordt de log P_{ow}-waarde berekend uit:

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

waarin f_i de moleculaire fragmentconstante voorstelt, F_j de correctietermen en a_i en b_j het overeenkomstige aantal keren dat ze voorkomen. Afgeleid uit experimentele P_{ow}-waarden werd door „trial and error" een lijst gemaakt van atoom- en groepsfragmentwaarden evenals een lijst van correctietermen F_j (de zogenaamde „factoren"). De correctietermen zijn geclassificeerd in verschillende categorieën (a)(c). Omdat het vrij ingewikkeld en tijdrovend is rekening te houden met alle regels en correctietermen, werden softwarepakketten ontwikkeld (b).

Gecombineerde methode

De berekening van log P_{ow} van complexe moleculen kan aanzienlijk verbeterd worden, indien het molecuul wordt opgesplitst in grotere substructuren waarvoor betrouwbare log P_{ow}-waarden beschikbaar zijn, hetzij uit tabellen (b)(c) of uit eigen metingen. Zulke fragmenten (bijvoorbeeld heterocyclische structuren, antrachinon, azobenzeen) kunnen dan worden gecombineerd met de Л-waarden volgens Hansch of met de fragmentconstanten volgens Rekker of Leo.

Opmerkingen

i) De berekeningsmethoden kunnen slechts worden toegepast op gedeeltelijk of volledig geïoniseerde stoffen wanneer de mogelijkheid bestaat om de nodige correctiefactoren in de berekening te verwerken.

▼B

ii) Als het bestaan van intramoleculaire waterstofbruggen kan worden aangenomen, moeten de overeenkomstige correctietermen (ongeveer + 0,6 tot + 1,0 log P_{ow}-eenheden) bij het resultaat worden opgeteld (a). Aanwijzingen voor de aanwezigheid van waterstofbruggen kunnen worden verkregen uit ruimtelijke modellen of spectroscopische gegevens over het molecuul.

iii) Als verschillende tautomere vormen mogelijk zijn, dient de meest waarschijnlijke vorm gebruikt te worden voor de berekening.

iv) De herzieningen van lijsten met fragmentconstanten dienen zorgvuldig gevolgd te worden.

Rapport

Bij het gebruik van berekenings-/schattingsmethoden dient het testrapport zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten:

— beschrijving van de stof (mengsel, verontreinigingen, enz.);

— aanwijzingen over mogelijke intramoleculaire waterstofbruggen, dissociatie, lading en alle andere ongewone effecten (bijvoorbeeld tautomerie);

— beschrijving van de berekeningsmethode;

— identificatie of leverancier van de database;

— bijzonderheden in de keuze van de fragmenten;

— uitgebreide documentatie van de berekening.

LITERATUUR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Aanhangsel 2

Aanbevolen referentiestoffen voor de HPLC-methode

Nr.	Referentiestof	log P_{ow}	pKa
1	2-Butanon	0,3	
2	4-Acetylpyridine	0,5	
3	Aniline	0,9	
4	Aceetanilide	1,0	
5	Benzylalcohol	1,1	
6	*p*-Methoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxyazijnzuur	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenylacetonitril	1,6	
12	4-Methylbenzylalcohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoëzuur	1,8	pKa = 3,47
16	4-Chlooraniline	1,8	pKa = 4,15
17	Nirrobenzeen	1,9	
18	Cinnamylalcohol	1,9	
19	Benzoëzuur	1,9	pKa = 4,19
20	*p*-Kresol	1,9	pKa = 10,17
21	Kaneelzuur	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisool	2,1	
23	Methylbenzoaat	2,1	
24	Benzeen	2,1	
25	3-Methylbenzoëzuur	2,4	pKa = 4,27
26	4-Chloorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trichloorethyleen	2,4	
28	Atrazine	2,6	
29	Ethylbenzoaat	2,6	
30	2,6-Dichloorbenzonitril	2,6	
31	3-Chloorbenzoëzuur	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueen	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dichlooraniline	2,8	
35	Chloorbenzeen	2,8	
36	Allylfenylether	2,9	
37	Broombenzeen	3,0	

▼B

Nr.	Referentiestof	log P_{ow}	pKa
38	Ethylbenzeen	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	*p*-Fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Thymol	3,3	
42	1,4-Dichloorbenzeen	3,4	
43	Difenylamine	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleen	3,6	
45	Fenylbenzoaat	3,6	
46	Isopropylbenzeen	3,7	
47	2,4,6-Trichloorfenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenyl	4,0	
49	Benzylbenzoaat	4,0	
50	2,4-Dinitro-6-sec-butylfenol	4,1	
51	1,2,4-Trichloorbenzeen	4,2	
52	Dodecaancarbonzuur	4,2	
53	Difenylether	4,2	
54	*n*-Burylbenzeen	4,5	
55	Fenanthreen	4,5	
56	Fluorantheen	4,7	
57	Dibenzyl	4,8	
58	2,6-Difenylpyridine	4,9	
59	Trifenylamine	5,7	
60	DDT	6,2	
	Andere referentiestoffen met lage log P_{ow}		
1	Nicotinezuur	- 0,07	

▼B

A.9. **VLAMPUNT**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Alvorens de test uit te voeren is het nuttig te beschikken over oriënterende gegevens inzake de brandbaarheid van de stof. De testprocedure is van toepassing op vloeistoffen waarvan de dampen door een ontstekingsbron tot ontbranding kunnen worden gebracht. De hier beschreven testmethoden zijn alleen betrouwbaar indien de gemeten waarde van het vlampunt binnen een bereik ligt zoals in de afzonderlijke methoden is aangegeven.

Bij het selecteren van de te gebruiken methode dient rekening te worden gehouden met mogelijke chemische reacties tussen de teststof en het monstervat.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het vlampunt is de laagste temperatuur, gecorrigeerd tot een druk van 101,325 kPa, waarbij een vloeistof onder de beschreven omstandigheden zodanig verdampt, dat in het testvat een brandbaar mengsel van lucht en damp wordt gevormd.

Eenheden: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t in ^{o}C en T in K).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om regelmatig de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof wordt in een testvat gebracht en verwarmd of gekoeld tot de testtemperatuur volgens de procedure beschreven bij de afzonderlijke testmethode. Ontstekingspogingen worden uitgevoerd om te zien of het monster al dan niet tot ontbranding kan worden gebracht bij de testtemperatuur.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

1.5.1. **Reproduceerbaarheid**

De reproduceerbaarheid varieert met de gemeten waarde van het vlampunt en met de gebruikte testmethode; maximaal 2 ^{o}C.

1.5.2. **Gevoeligheid**

De gevoeligheid is afhankelijk van de gebruikte testmethode.

1.5.3. **Toepasbaarheid**

De toepasbaarheid van een aantal testmethoden blijft beperkt tot bepaalde vlampuntsbereiken en afhankelijk van stofeigenschappen (bijvoorbeeld hoge viscositeit).

▼B

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Voorbereidingen**

Een monster van de te onderzoeken stof wordt in een testapparaat overeenkomstig 1.6.3.1, respectievelijk 1.6.3.2, gebracht.

Uit veiligheidsoverwegingen wordt aangeraden voor energetische of giftige stoffen een methode waarbij slechts een klein monstervolume (circa 2 cm^3) nodig is, toe te passen.

1.6.2. **Testomstandigheden**

Het apparaat dient, voor zover de veiligheid dit toelaat, op een tochtvrije plaats te worden opgesteld.

1.6.3. **Uitvoering van de test**

1.6.3.1. *Evenwichtsmethode*

Zie ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 en ISO 3679.

1.6.3.2. *Niet-evenwichtsmethode*

Apparatuur van Abel:

Zie BS 2000-170, NF M 07-011 en NF T 66-009.

Apparatuur van Abel-Pensky:

Zie EN 57, DIN 51755, deel 1 (voor temperaturen van 5 tot 65 °C) DIN 51755, deel 2 (voor temperaturen lager dan 5 °C), NF M 07-036.

Apparatuur van Tag:

Zie ASTM D 56.

Apparatuur van Pensky-Martens:

Zie ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 en NF M 07-019.

Opmerkingen:

Indien het vlampunt, bepaald volgens een van de niet-evenwichtsmethoden onder 1.6.3.2, de volgende waarden blijkt te hebben: 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, dient dit te worden bevestigd volgens een evenwichtsmethode met gebruik van dezelfde apparatuur.

Alleen de methoden waarmee de temperatuur van het vlampunt kan worden bepaald, komen in aanmerking voor gebruik ten behoeve van een kennisgeving.

Voor de bepaling van het vlampunt van visceuze vloeistoffen (verven, lijmen, e.d.) die oplosmiddelen bevatten, mag uitsluitend gebruik worden gemaakt van apparatuur en testmethoden die geschikt zijn voor bepaling van het vlampunt van visceuze vloeistoffen.

Zie ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 en DIN 53213, deel 1.

▼B

2. **GEGEVENS**

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— nauwkeurige beschrijving van de stof (beschrijving en verontreinigingen);

— de gebruikte testmethode alsmede eventuele wijzigingen;

— de resultaten en alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4. **LITERATUUR**

Geen.

▼B

A.10. **ONTVLAMBAARHEID (VASTE STOFFEN)**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Alvorens de test uit te voeren is het nuttig te beschikken over oriënterende gegevens inzake potentieel explosieve eigenschappen van de stof.

Deze test dient alleen te worden toegepast op stoffen in poeder-, korrel- of pastavorm.

Alleen stoffen waarvan de brandsnelheid hoger is dan een bepaalde drempelwaarde, worden als licht ontvlambaar beschouwd. Daarom worden niet alle stoffen die kunnen worden ontstoken, maar alleen die stoffen die snel branden of waarvan het brandgedrag buitengewoon gevaarlijk is, inbegrepen.

Het is buitengewoon gevaarlijk indien een smeulproces zich voortplant door een metaalpoeder, vanwege de moeilijkheid om het vuur te doven. Daarom dienen metaalpoeders als licht ontvlambaar te worden beschouwd, als de smeulhaard zich binnen een zekere tijd door de gehele massa kan voortplanten.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Brandtijd in seconden.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Niet gekozen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Van de stof wordt een ononderbroken rups of poederlijn met een lengte van ongeveer 250 mm gevormd waarop een oriënterende proef wordt uitgevoerd om te bepalen of, na ontsteken van het monster met behulp van een gasvlam, de vlam of het smeulproces zich voortplant. Als het vlamfront/smeulproces zich binnen een bepaalde tijdsduur over 200 mm van de sliert voortplant, dient een volledig testprogramma te worden uitgevoerd om de brandsnelheid vast te stellen.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

▼B

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Oriënterende proef**

Van de stof wordt een ononderbroken rups of poederlijn van ongeveer 250 mm lengte, 20 mm breedte en 10 mm hoogte gevormd op een onbrandbare, niet-poreuze en slecht warmtegeleidende grondplaat. Een hete vlam van een gasbrander (minimale diameter 5 mm) wordt gedurende maximaal 2 minuten bij één uiteinde van de rups gehouden totdat het poeder ontbrandt (5 minuten voor metaalpoeders of metaallegeringen). Men dient er op te letten of de ontbranding zich binnen 4 minuten (of 40 minuten bij metaalpoeders) voortplant over 200 mm van de poederrups. Indien de stof niet ontbrandt of indien de vlam of het smeulproces zich niet binnen 4 minuten (of 40 minuten bij metaalpoeders) voortplant over 200 mm poederrups dient de stof niet als licht ontvlambaar te worden beschouwd en behoeft geen verder onderzoek te worden uitgevoerd. Als het brandproces zich in minder dan 4 minuten, of minder dan 40 minuten bij metaalpoeders, voortplant over 200 mm van de poederrups dient de procedure zoals hieronder beschreven (punt 1.6.2. en volgende) te worden uitgevoerd.

1.6.2. **Brandsnelheidstest**

1.6.2.1. *Voorbereidingen*

Poeder of korrelvormige stoffen worden ingebracht (niet aandrukken) in een mal met een lengte van 250 mm en een driehoekige doorsnede met een inwendige hoogte van 10 mm en een inwendige breedte van 20 mm. Om de zijkanten te begrenzen zijn aan beide kanten van de mal in de lengterichting twee metalen platen gemonteerd die 2 mm uitsteken boven de rand van de driehoekige doorsnede (zie figuur). Vervolgens laat men de mal driemaal van een hoogte van 2 cm op een massief oppervlak vallen. Indien nodig wordt de mal bijgevuld. Vervolgens worden de zijplaten verwijderd en wordt de overtollige stof met een stevig blad weggeveegd. Een onbrandbare, niet-poreuze en slecht warmtegeleidende plaat wordt bovenop de mal gelegd, het apparaat wordt omgekeerd, waarna de mal wordt verwijderd.

Pastavormige stoffen worden op een onbrandbare, niet-poreuze en slecht warmtegeleidende plaat aangebracht in de vorm van een rups met een lengte van 250 mm en een doorsnede van ongeveer 1 cm^2.

1.6.2.2. *Testomstandigheden*

Bij een vochtgevoelige stof dient de test zo snel als mogelijk na het verwijderen van de verpakking te worden uitgevoerd.

1.6.2.3. *Uitvoering van de test*

De rups wordt in een zuurkast geplaatst in een richting loodrecht op de richting van de trek.

De luchtsnelheid moet voldoende zijn om te verhinderen dat verbrandingsgassen naar de laboratoriumruimte ontsnappen; de luchtsnelheid mag gedurende de test niet veranderd worden. De apparatuur moet worden omgeven door een vochtscherm.

Met de hete vlam van een gasbrander (minimale diameter 5 mm) wordt de rups aan één kant ontstoken. Nadat de rups over een lengte van 80 mm heeft gebrand, wordt de brandsnelheid over de volgende 100 mm gemeten.

▼B

De test, waarbij steeds een schone koude plaat wordt gebruikt, wordt zesmaal uitgevoerd, tenzij eerder een positief resultaat wordt verkregen.

2. **GEGEVENS**

Voor de beoordeling zijn de brandduur in de oriënterende proef (1.6.1) en de kortste brandduur uit de hoogstens zes testen (1.6.2.3) van belang.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);

— een beschrijving van de fysische toestand en het vochtgehalte van de onderzochte stof;

— de resultaten van de oriënterende test en, indien uitgevoerd, de brandsnelheidstest;

— alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Poedervormige, korrelvormige of pastavormige stoffen worden als licht ontvlambaar beschouwd indien in één van de tests uitgevoerd volgens 1.6.2 de brandduur minder dan 45 seconden bedraagt. Poeders van metalen of metaallegeringen worden als licht ontvlambaar beschouwd, indien zij kunnen worden ontstoken en indien de vlam of reactiezone zich binnen 10 minuten over het gehele monster uitbreidt.

4. **LITERATUUR**

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

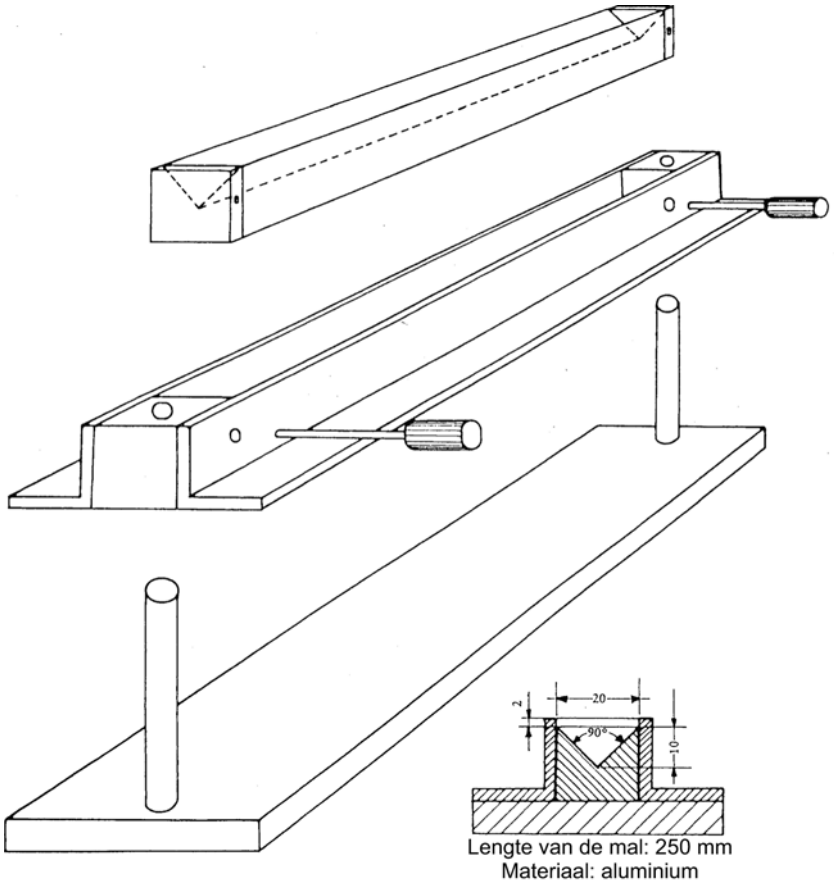
▼B

Aanhangsel

Figuur

Mal en toebehoren om een rups van de te onderzoeken stof te vormen

(Afmetingen in mm)



▼B

A.11. ONTVLAMBAARHEID (GASSEN)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Met deze methode kan worden vastgesteld of mengsels van gassen en lucht bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C) en atmosferische druk brandbaar zijn, en zo ja, binnen welk concentratiebereik. Mengsels met toenemende concentraties van het te onderzoeken gas in lucht worden blootgesteld aan een elektrische vonk, waarna wordt vastgesteld of ontbranding plaatsvindt.

1.2. DEFINITIE EN EENHEDEN

De maat voor de brandbaarheid is het bereik van de concentratiewaarden tussen de onderste en bovenste ontploffingsgrens. De onder- en bovenexplosiegrenzen worden gevormd door de uiterste concentraties van het brandbare gas in lucht waarbij een vlam zich niet voortplant.

1.3. REFERENTIESTOF

Niet gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De concentratie van het gas in de lucht wordt stap voor stap opgevoerd, waarbij het mengsel in iedere stap wordt blootgesteld aan een elektrische vonk.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Apparatuur**

Het testvat is een staande glazen cilinder met een inwendige diameter van minimaal 50 mm en een hoogte van minimaal 300 mm. De ontstekingselektroden bevinden zich op een onderlinge afstand van 3 tot 5 mm en worden 60 mm boven de cilinderbodem geplaatst. De cilinder is voorzien van een overdrukventiel. Het apparaat moet worden afgeschermd om schade bij een eventuele ontploffing te beperken.

Als ontstekingsbron wordt gebruik gemaakt van een staande inductievonk met een duur van 0,5 sec, opgewekt door een hoogspanningstransformator met een uitgangsspanning van 10 tot 15 kV (maximaal ingangsvermogen 300 W). Een voorbeeld van een geschikt apparaat wordt gegeven in referentie (2).

1.6.2. **Testomstandigheden**

De test moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

▼B

1.6.3. **Uitvoering van de test**

Met behulp van doseerpompen wordt een bekende concentratie van het gas in lucht naar de glazen cilinder geleid. Het mengsel wordt blootgesteld aan een vonk en er wordt vastgesteld of er zich vanaf de ontstekingsbron al dan niet een vlam ontwikkelt die zich zelfstandig voortplant. De gasconcentratie wordt in stappen van 1 % vol opgevoerd, totdat ontbranding zoals boven bedoeld, plaatsvindt.

Als de chemische structuur van het gas erop wijst dat het niet ontvlambaar is en de samenstelling van het stoïchiometrische mengsel met lucht berekend kan worden, dienen alleen de mengsels in het bereik van 10 % beneden tot 10 % boven de stoïchiometrische samenstelling getest te worden in stappen van 1 %.

2. **GEGEVENS**

Het enige gegeven van belang voor bepaling van deze eigenschap is het optreden van een vlam die zich zelfstandig voortplant.

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);

— een beschrijving van de gebruikte apparatuur inclusief de afmetingen;

— de temperatuur waarbij de test werd uitgevoerd;

— de onderzochte concentraties en de verkregen resultaten;

— het resultaat van de test: niet ontvlambaar of licht ontvlambaar gas. Indien geconcludeerd wordt dat het gas niet ontvlambaar is, moet het concentratiebereik waarover het gas in stappen van 1 % onderzocht werd, vermeld worden;

— alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4. **LITERATUUR**

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

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

▼B

A.12. **ONTVLAMBAARHEID (CONTACT MET WATER)**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Deze testmethode kan worden gebruikt om vast te stellen of de reactie van een stof met water of vochtige lucht leidt tot het vrijkomen van een gevaarlijke hoeveelheid van één of meer eventueel licht ontvlambare gassen.

De testmethode kan zowel op vaste als op vloeibare stoffen worden toegepast. Deze methode is niet van toepassing op stoffen die in aanraking met lucht spontaan ontbranden.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Licht ontvlambaar: Stoffen die bij aanraking met water of vochtige lucht licht ontvlambare gassen produceren met een minimum ontwikkelingshoeveelheid van 1 liter per kg stof per uur.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof wordt volgens de hieronder beschreven getrapte volgorde getest; als bij één van de stappen ontbranding optreedt, is verder onderzoek overbodig. Als bekend is dat de te onderzoeken stof niet heftig reageert met water kan worden verdergegaan met stap 4 (1.3.4).

1.3.1. **Stap 1**

De te onderzoeken stof wordt in een buis met gedistilleerd water op 20 °C gebracht en er wordt nagegaan of het vrijgekomen gas ontbrandt.

1.3.2. **Stap 2**

De te onderzoeken stof wordt gebracht op een filtreerpapier dat in een schotel met gedistilleerd water van 20 °C drijft, en er wordt nagegaan of het vrijkomende gas ontbrandt. Het filtreerpapier dient alleen om de stof op één plaats te houden, waardoor de kans op ontbranding toeneemt.

1.3.3. **Stap 3**

Van de te onderzoeken stof wordt een hoopje van ongeveer 2 cm hoog en 3 cm doorsnede gemaakt. Hierop worden een paar druppels water gebracht en er wordt nagegaan of het vrijkomende gas ontbrandt.

1.3.4. **Stap 4**

De te onderzoeken stof wordt met gedistilleerd water van 20 °C gemengd en de snelheid van gasontwikkeling wordt ieder uur gemeten gedurende een periode van 7 uur. Als de snelheid van de gasontwikkeling onregelmatig is of toeneemt tegen het eind van de periode van 7 uur, moet de duur van de meting tot maximaal 5 dagen worden verlengd. De test kan worden gestaakt zodra een snelheid hoger dan 1 liter/kg per uur wordt gemeten.

▼B

1.4. REFERENTIESTOF

Niet gegeven.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODEN

1.6.1. **Stap 1**

1.6.1.1. *Testomstandigheden*

De proef wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

1.6.1.2. *Uitvoering van de test*

Een kleine hoeveelheid (ongeveer 2 mm doorsnede) van de te onderzoeken stof wordt in een bak met gedistilleerd water gebracht. Genoteerd wordt i) of er gas ontwijkt en ii) of het gas spontaan ontbrandt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

1.6.2. **Stap 2**

1.6.2.1. *Apparatuur*

Een filtreerpapier laat men plat op het oppervlak van een hoeveelheid gedistilleerd water drijven in een geschikt vat, bijvoorbeeld een verdampingsschotel met een doorsnede van 100 mm.

1.6.2.2. *Testomstandigheden*

De proef wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

1.6.2.3. *Uitvoering van de test*

Een kleine hoeveelheid van de te onderzoeken stof (ongeveer 2 mm doorsnede) wordt midden op het filtreerpapier gebracht. Genoteerd wordt i) of er gas ontwijkt en ii) of het gas spontaan ontbrandt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

1.6.3. **Stap 3**

1.6.3.1. *Testomstandigheden*

De proef wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

1.6.3.2. *Uitvoering van de test*

Van de te onderzoeken stof wordt een hoopje van ongeveer 2 cm hoogte en 3 cm doorsnede gemaakt met een kuiltje bovenin. In het kuiltje worden een paar druppels water gebracht en genoteerd wordt i) of er gas ontwijkt en ii) of het gas spontaan ontbrandt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

▼B

1.6.4. **Stap 4**

1.6.4.1. *Apparatuur*

De apparatuur wordt opgesteld als in de figuur.

1.6.4.2. *Testomstandigheden*

Kijk of het vat van de te onderzoeken stof poeder bevat bestaande uit deeltjes van minder dan 500 μm diameter. Indien meer dan 1 gewichtsprocent van de stof poedervormig is of indien het monster brokkelig is, wordt de stof in zijn geheel vóór de test tot poeder gemalen; op deze manier wordt rekening gehouden met mogelijke verkleining van de deeltjesgrootte tijdens opslag en verwerking van de stof. In alle andere gevallen wordt de stof onderzocht zoals ze werd verkregen. De test moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 ^{o}C) en atmosferische druk.

1.6.4.3. *Uitvoering van de test*

10 tot 20 ml water wordt in de druppeltrechter van het apparaat gebracht en 10 g van de te onderzoeken stof wordt afgewogen in de erlenmeyerkolf. Het volume van het vrijkomende gas kan op elke geschikte wijze worden gemeten. De kraan van de druppeltrechter wordt geopend zodat het water in de erlenmeyerkolf komt, en een chronometer gestart. De hoeveelheid vrijkomend gas wordt ieder uur gemeten gedurende een periode van 7 uur. Als tijdens deze periode het vrijkomen van gas onregelmatig verloopt, of als aan het eind van de periode de hoeveelheid vrijkomend gas toeneemt moeten de metingen voortgezet worden tot maximaal 5 dagen. Indien de gasontwikkelingssnelheid, tijdens de metingen, op welk ogenblik dan ook, meer dan 1 liter per kg stof en per uur bedraagt, kan het onderzoek gestaakt worden. De test moet in triplo worden uitgevoerd.

Indien de chemische identiteit van het gas niet bekend is, dient het te worden geanalyseerd. Indien het gas licht ontvlambare componenten bevat en niet bekend is of het totale mengsel licht ontvlambaar is, moet een mengsel van dezelfde samenstelling worden bereid en getest volgens methode A.11.

2. **GEGEVENS**

De onderzochte stof wordt als gevaarlijk beschouwd indien:

— spontane ontbranding plaatsvindt bij één van de stappen tijdens de testprocedure;

of

— een ontvlambaar gas vrijkomt met een grotere snelheid groter dan 1 liter per kg van de te onderzoeken stof per uur.

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);

— gegevens over eventuele voorbehandeling van de onderzochte stof;

▼B

— de resultaten van de tests (stappen 1, 2, 3 en 4);

— de chemische identiteit van het vrijgekomen gas;

— de snelheid waarmee het gas vrijkomt als stap 4 (1.6.4) wordt uitgevoerd;

— alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

4. **LITERATUUR**

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

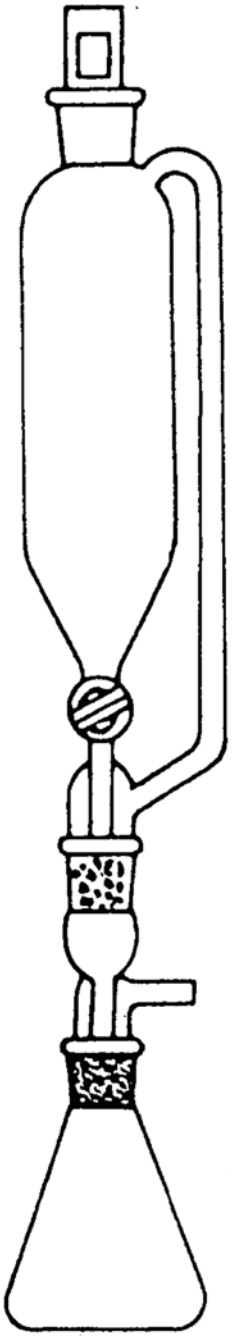
(2) NF T 20-040, (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Aanhangsel

Figuur

Apparatuur



▼B

A.13. **PYROFORE EIGENSCHAPPEN VAN VASTE STOFFEN EN VLOEISTOFFEN**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

De testprocedure is van toepassing op vaste en vloeibare stoffen, die spontaan kunnen ontbranden kort nadat ze bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C) in aanraking zijn gekomen met lucht.

Deze testprocedure is niet van toepassing op stoffen die bij kamertemperatuur eerst na uren- of dagenlange blootstelling aan lucht spontaan ontbranden of die op hogere temperatuur moeten worden gebracht om tot zelfontbranding te komen.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Stoffen worden als pyrofoor beschouwd als ze ontbranden of verkoling veroorzaken onder de omstandigheden zoals beschreven onder 1.6.

Voor de zelfontvlambaarheid van vloeistoffen kan ook een test nodig zijn volgens methode A.15: Zelfontbrandingstemperatuur (vloeistoffen en gassen).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Niet gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof, vast of vloeibaar, wordt op een inerte drager gebracht en gedurende 5 minuten bij omgevingstemperatuur in aanraking gebracht met lucht. Indien vloeistoffen niet ontbranden moeten ze geabsorbeerd worden op filterpapier en gedurende 5 minuten bij omgevingstemperatuur (ongeveer 20 °C) worden blootgesteld aan lucht. Als een vaste of vloeibare stof ontbrandt, of een vloeistof het filterpapier doet ontbranden of verkolen, wordt de stof beschouwd als pyrofoor.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Reproduceerbaarheid: gezien het belang met betrekking tot veiligheid is één enkel positief resultaat voldoende om de stof als pyrofoor te beschouwen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Apparatuur**

Een porseleinen bakje van ongeveer 10 cm doorsnede wordt bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C) tot een hoogte van ongeveer 5 mm gevuld met diatomeeënaarde.

Opmerking:

Diatomeeënaarde of een vergelijkbare en gangbare inerte stof wordt representatief geacht voor aarde waarmee gemorste stoffen in geval van een ongeluk in aanraking kunnen komen.

Droog filterpapier is vereist om vloeistoffen te onderzoeken die niet ontbranden na aanraking met lucht wanneer ze in aanraking zijn met een inerte drager.

▼B

1.6.2. **Uitvoering van de test**

a) *Poedervormige vaste stoffen*

1 tot 2 cm^3 van de te onderzoeken, poedervormige stof wordt vanaf ongeveer 1 m hoogte op een niet-brandbaar oppervlak gestrooid; nagegaan wordt of de stof tijdens het vallen, of binnen 5 minuten na het neerkomen, ontbrandt.

De proef wordt 6 keer uitgevoerd tenzij ontbranding optreedt.

b) *Vloeistoffen*

Ongeveer 5 cm^3 van de te onderzoeken vloeistof wordt in het porseleinen bakje gegoten en nagegaan wordt of de stof binnen 5 minuten ontbrandt.

Als geen ontbranding optreedt tijdens de zes proeven, voer dan de volgende tests uit:

Een hoeveelheid van 0,5 ml van de te onderzoeken stof wordt met behulp van een injectiespuit op een gekarteld filterpapiertje gebracht en er wordt nagegaan of ontbranding of verkoling van het filterpapier optreedt binnen vijf minuten nadat de vloeistof werd aangebracht. De test wordt driemaal uitgevoerd, tenzij ontbranding of verkoling optreedt.

2. **GEGEVENS**

2.1. BEWERKING VAN DE RESULTATEN

Het onderzoek mag worden gestaakt zodra een positief resultaat optreedt in één van de tests.

2.2. BEOORDELING

Indien de stof ontbrandt binnen vijf minuten na opbrengen op een inerte drager en blootstelling aan de lucht, of indien een vloeistof een filterpapiertje verkoolt of doet ontbranden binnen vijf minuten na opbrengen en blootstelling aan de lucht, wordt de stof beschouwd als zijnde pyrofoor.

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);

— de resultaten van de tests;

— iedere bijkomende opmerking betreffende de interpretatie van de resultaten.

4. **LITERATUUR**

(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, Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14. **EXPLOSIEGEVAAR**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

De methode omvat een testschema om vast te stellen of een pasta explosiegevaar oplevert wanneer de stof aan een vlam (thermische gevoeligheid) of aan een schok of wrijving (mechanische gevoeligheid) wordt blootgesteld, alsmede of een vloeistof explosiegevaar oplevert wanneer de stof aan een vlam of aan een schok wordt blootgesteld.

De methode bestaat uit drie delen:

a) een test voor de thermische gevoeligheid (1);

b) een test voor de mechanische gevoeligheid bij schokken (1);

c) een test voor de mechanische gevoeligheid bij wrijving (1).

De methode levert gegevens op waarmee de kans op ontstaan van een explosie door bepaalde veel voorkomende stimuli kan worden beoordeeld. De methode is niet bedoeld om vast te stellen of een stof onder om het even welke omstandigheden kan exploderen.

De methode is geschikt om te bepalen of een stof explosiegevaar oplevert (thermische en mechanische gevoeligheid) onder omstandigheden zoals beschreven in de richtlijn. De methode is gebaseerd op een aantal soorten apparaten die internationaal op grote schaal worden gebruikt (1) en die doorgaans zinvolle resultaten geven. Erkend wordt dat de methode geen definitief uitsluitsel geeft. Andere apparatuur dan beschreven, mag worden gebruikt op voorwaarde dat deze internationaal erkend is en dat de resultaten afdoende getoetst kunnen worden aan de resultaten met de beschreven apparatuur.

De proeven hoeven niet te worden uitgevoerd indien uit de beschikbare thermodynamische gegevens (vormingswarmte, ontledingswarmte) en/of afwezigheid van bepaalde reactieve groepen (2) in de structuurformule met afdoende zekerheid kan worden vastgesteld dat de stof niet snel kan ontleden onder productie van gassen of warmte (dat wil zeggen: het materiaal vertegenwoordigt geen enkel explosiegevaar). Een test op mechanische gevoeligheid voor wrijving is niet vereist voor vloeistoffen.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Als explosief worden gedefinieerd: stoffen die door de werking van een vlam kunnen ontploffen of die gevoelig zijn voor schokken en wrijving in de beschreven apparatuur (of die mechanisch gevoeliger zijn dan 1,3-dinitrobenzeen in andere apparatuur).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Technisch, kristallijn 1,3-dinitrobenzeen gezeefd door 0,5 mm maaswijdte, voor de wrijvings- en schok-methode.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX, hexogeen, cycloniet — CAS 121-82-4), geherkristalliseerd uit waterig cyclohexanon, nat gezeefd door een 250 μm zeef en op een 150 μm zeef en gedroogd bij 103 ± 2 °C (gedurende 4 uur) voor de tweede reeks wrijvings- en schoktests.

▼B

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Tot vaststelling van veilige omstandigheden voor het uitvoeren van de drie gevoeligheidstests zijn oriënterende proeven noodzakelijk.

1.4.1. **Oriënterende proef (3)**

Om veiligheidsredenen worden voor het uitvoeren van de gevoeligheidsbeproevingen zeer kleine monsters (ongeveer 10 mg) van de stof zonder afsluiting verwarmd in een gasvlam, blootgesteld aan schokken in een geschikt apparaat, en aan wrijving door middel van een hamer tegen een aambeeld of door middel van elk ander wrijvingstoestel. Het doel is vast te stellen of de stof zo gevoelig en explosiegevaarlijk is dat de voorgeschreven gevoeligheidstests, vooral die van thermische gevoeligheid, moeten worden uitgevoerd met speciale voorzorgen om aldus te voorkomen dat de onderzoeker gewond kan raken.

1.4.2. **Thermische gevoeligheid**

Bij deze methode wordt de stof verwarmd in een stalen buis, afgesloten door afsluitplaten met openingen van verschillende doorsnede, om vast te stellen of de stof bij thermische belasting en goed gedefinieerde opsluiting kan ontploffen.

1.4.3. **Mechanische gevoeligheid (schok)**

Bij deze methode wordt de stof aan een schok, veroorzaakt door een bepaalde massa vallend vanaf een bepaalde hoogte, onderworpen.

1.4.4. **Mechanische gevoeligheid (wrijving)**

Bij deze methode wordt de vaste stof of pasta onder bepaalde omstandigheden van belasting en relatieve beweging onderworpen aan wrijving russen standaardoppervlakken.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

1.6.1. **Thermische gevoeligheid (werking van een vlam)**

1.6.1.1. *Apparatuur*

Het apparaat bestaat uit een stalen buis, bestemd voor éénmalig gebruik, voorzien van een herbruikbare afsluitinrichting (figuur 1), die in een verwarmings- en beschermingstoestel wordt geplaatst. Elke buis is diep getrokken uit plaatstaal (zie aanhangsel) en heeft een inwendige doorsnede van 24 mm, een lengte van 75 mm en een wanddikte van 0,5 mm. Aan het open einde is de buis van een flens voorzien om afsluiting met de afsluitinrichting mogelijk te maken. De afsluitinrichting bestaat uit een drukbestendige ronde afsluitplaat met een gat in het midden, die met behulp van een tweedelige schroefverbinding (moer en kraag met schroefdraad) stevig op de buis wordt bevestigd. De moer en de kraag zijn gemaakt van chroommangaanstaal (zie aanhangsel) dat tot 800 ^{o}C vonkvrij is. De afsluitplaten zijn 6 mm dik en gemaakt van hittebestendig staal (zie aanhangsel), en zijn verkrijgbaar in een reeks verschillende openingsmaten.

▼B

1.6.1.2. *Testomstandigheden*

Normaal wordt de stof getest zoals hij verkregen werd, alhoewel het in sommige gevallen noodzakelijk kan zijn om de stof te testen na verpulvering, bijvoorbeeld indien hij geperst, gegoten of op andere wijze verdicht is.

Voor vaste stoffen wordt de hoeveelheid voor elke test te gebruiken materiaal bepaald met behulp van een twee-staps vulprocedure. Een gewogen buis wordt gevuld met 9 cm^3 van de stof, waarna deze wordt aangedrukt met een kracht van 80 N verdeeld over de hele doorsnede van de buis. Om veiligheidsredenen of in gevallen waar de fysische vorm van het monster kan veranderen onder druk, mogen andere vulmethoden worden gebruikt; aandrukken is bijvoorbeeld niet geschikt als de stof zeer wrijvingsgevoelig is. Als de stof samendrukbaar is wordt meer materiaal bijgevoegd en aangeperst met 80 N totdat de buis gevuld is tot op 55 mm van de bovenkant. De massa van de stof die gebruikt wordt om de buis te vullen tot op het niveau van 55 mm wordt bepaald, vervolgens worden nog twee porties met deze massa, en elk aangedrukt met een kracht van 80 N, ingebracht. Daarna wordt het materiaal of wel bijgevuld of wel verwijderd en aangedrukt totdat de buis gevuld is tot op een hoogte van 15 mm van de bovenkant. Een tweede stap in de vulprocedure wordt uitgevoerd met een aangedrukte massa die een derde bedraagt van de totale hoeveelheid die in de eerste poging werd bepaald. Er worden nog twee van deze hoeveelheden toegevoegd en elk onder 80 N aangedrukt, waarna het niveau van de stof wordt aangepast tot op 15 mm van de bovenkant door materiaal naar behoefte toe te voegen of weg te halen. Voor elke beproeving wordt nu de hoeveelheid vaste stof gebruikt, die in de tweede vulprocedure is vastgesteld, waarbij het vullen wordt uitgevoerd met drie gelijke porties die achtereenvolgens worden samengeperst tot 9 cm^3 met de daartoe benodigde kracht (het samenpersen kan worden vereenvoudigd met behulp van tussenringen).

Vloeistoffen en gels worden in de buis gebracht tot op een hoogte van 60 mm, waarbij zorg dient te worden gedragen dat bij het vullen met gel geen luchtbellen ontstaan. De buis wordt in de kraag geschoven, de juiste afsluitplaat wordt opgelegd en de moer wordt op de kraag geschroefd na het aanbrengen van een beetje smeermiddel op basis van molybdeendisulfide. Het is van essentieel belang te controleren dat er geen materiaal achterblijft tussen de moer, de plaat, en de schroefdraad.

De verwarming geschiedt met behulp van propaan uit een industriële cilinder voorzien van een drukregelaar (60 tot 70 mbar), dat via een meter door een verdeelstuk evenredig verdeeld wordt over vier branders (hetgeen visueel te controleren is aan de vlammen uit de branders). De branders worden rond de beproevingsruimte geplaatst zoals aangegeven in figuur 1. De vier branders hebben een gezamenlijk verbruik van ongeveer 3,2 liter propaan per minuut. Andere stookgassen of branders mogen gebruikt worden, maar de opwarmsnelheid moet verlopen zoals in figuur 3 aangegeven. Voor alle apparatuur dient de opwarmsnelheid periodiek gecontroleerd te worden met behulp van met diburylftalaat gevulde buizen zoals in figuur 3 is aangeduid.

1.6.1.3. *Uitvoering van de proeven*

Elke test wordt uitgevoerd totdat ofwel de buis gefragmenteerd is of de buis gedurende vijf minuten is verhit. Als de test resulteert in fragmentatie van de buis in drie of meer stukken, die soms nog aan elkaar zijn verbonden door smalle metaalstrookjes zoals geïllustreerd in figuur 2, wordt het resultaat beoordeeld als een opgetreden explosie. Een testresultaat, waarbij minder of geen fragmenten ontstaan, wordt beschouwd als niet explosief.

▼B

Een reeks van drie proeven met een afsluitplaat met een opening van 6,0 mm doorsnede wordt uitgevoerd en, als geen explosies optreden, een tweede reeks van drie proeven met een afsluitplaat met een opening van 2,0 mm. Indien een explosie plaatsvindt in een van de twee proefreeksen, kunnen verdere tests achterwege blijven.

1.6.1.4. *Beoordeling*

Het testresultaat wordt als positief beschouwd als er een explosie plaatsvindt in een van bovenstaande testreeksen.

1.6.2. **Mechanische gevoeligheid (schok)**

1.6.2.1. *Apparatuur (figuur 4)*

De belangrijkste onderdelen van een doorsnee valhamerapparaat zijn een gietstalen blok met voet, aambeeld, kolom, geleiders, valgewichten, een ontkoppelinrichting en een monsterhouder. Op het stalen blok van 230 mm lengte × 250 mm breedte × 200 mm hoogte met een gegoten voet van 450 mm lengte × 450 mm breedte × 60 mm hoogte, zit het stalen aambeeld van 100 mm doorsnede × 70 mm hoogte vastgeschroefd. Aan de achterkant van het stalen blok is de houder geschroefd waarin de kolom, bestaande uit een naadloze getrokken stalen buis, is bevestigd. Vier schroeven verankeren het apparaat aan een massief betonnen blok van 60 × 60 × 60 cm in een zodanige positie dat de geleiderbalken volkomen verticaal staan en het valgewicht vrij kan vallen. Gewichten van 5 en 10 kg massief staal kunnen worden gebruikt. Het slagoppervlak van de gewichten bestaat uit getemperd staal, HRC 60 tot 63, met een minimumdoorsnede van 25 mm.

Het te onderzoeken monster wordt gevat in een schokbeproevingsvat dat bestaat uit twee massieve, in het verlengde boven elkaar liggende stalen cilinders omhuld door een holle stalen geleidecilinder. De massief stalen cilinders hebben een doorsnede van 10 (- 0,003; - 0,005) mm en een hoogte van 10 mm, gepolijste oppervlakken, afgeronde zijvlakken (rondingsstraal 0,5 mm) en een hardheid van HRC 58 tot 65. De holle cilinder heeft een uitwendige diameter van 16 mm, een gepolijste binnenkant met een doorsnede van 10 (+ 0,005; + 0,010) mm en een hoogte van 13 mm. Het beproevingsvat wordt vastgezet op een stalen tussenaambeeld (26 mm doorsnede en 26 mm hoogte) en wordt gecentreerd door een ring met perforaties via welke de explosiegassen kunnen worden afgevoerd.

1.6.2.2. *Testomstandigheden*

Het monstervolume dient 40 mm^3 te bedragen of overeen te komen met het vulvolume in een alternatief apparaat. Vaste stoffen dienen in droge toestand te worden onderzocht en worden als volgt voorbewerkt:

a) poedervormige stoffen worden gezeefd (maaswijdte 0,5 mm); alles wat de zeef doorlaat, wordt voor de test gebruikt;

b) samengeperste, gegoten of op andere wijze verdichte stoffen worden in stukken gebroken en gezeefd; de zeeffractie van 0,5 tot 1 mm doorsnede wordt gebruikt voor de test en dient representatief te zijn voor de oorspronkelijke stof.

Stoffen die normaal gezien geleverd worden als pasta's zouden, in de mate van het mogelijke, moeten worden getest in droge staat of, in ieder geval, na het zoveel mogelijk verwijderd hebben van vloeistof. Vloeistoffen worden onderzocht met een spleet van 1 mm tussen de bovenste en de onderste stalen cilinder.

▼B

1.6.2.3. *Uitvoering van de proeven*

Een reeks van zes proeven wordt uitgevoerd waarbij men het gewicht van 10 kg van een hoogte van 0,40 m (40 J) laat vallen. Indien een explosie wordt verkregen in de reeks met 40 J moet een extra reeks van zes proeven worden uitgevoerd waarbij men 5 kg van 0,15 m (7,5 J) laat vallen. In andere apparaten wordt het monster vergeleken met de gekozen referentiestof via een vastgestelde procedure (bijvoorbeeld op-en-neer techniek, enz.).

1.6.2.4. *Beoordeling*

Het testresultaat wordt als positief beschouwd als ten minste éénmaal in een van de proeven een explosie (ontbranden en/of een knal staan hiermee gelijk) plaatsvindt met het beschreven slagapparaat of als het monster in een alternatieve slagproef gevoeliger is dan 1,3-dinitrobenzeen of RDX.

1.6.3. **Mechanische gevoeligheid (wrijving)**

1.6.3.1. *Apparatuur (figuur 5)*

Het wrijvingsapparaat bestaat uit een gietstalen grondplaat waarop het eigenlijke wrijvingstoestel gemonteerd is. Het wrijvingstoestel bestaat uit een vaste porseleinen pen en een bewegende porseleinen plaat. De porseleinen plaat zit vast in een slede welke tussen twee geleiders beweegt. De slede wordt via een aandrijfstang, een excentrische nok en een geschikt drijfwerk op zodanige wijze met een elektromotor verbonden, dat de porseleinen plaat slechts éénmaal onder de porseleinen pen heen en weer wordt bewogen over een afstand van 10 mm. De porseleinen pen kan belast worden met bijvoorbeeld 120 of 360 newton.

De vlakke porseleinen platen worden van wit technisch porselein (oppervlakteruwheid tussen 9 en 32 μm) gemaakt en zijn 25 mm lang, 25 mm breed en 5 mm hoog. De cylindrische porseleinen pen wordt eveneens van wit technisch porselein gemaakt, is 15 mm lang, heeft een doorsnede van 10 mm en bolvormige uiteinden met een rondingsstraal van 10 mm, en geruwd oppervlak.

1.6.3.2. *Testomstandigheden*

Het monstervolume dient 10 mm^3 te bedragen of overeen te komen met het vulvolume in een alternatief apparaat.

Vaste stoffen dienen in droge toestand te worden onderzocht en worden als volgt voorbewerkt:

a) poedervormige stoffen worden gezeefd (maaswijdte 0,5 mm); alles wat de zeef doorlaat, wordt voor de test gebruikt;

b) samengeperste, gegoten of op andere wijze verdichte stoffen worden in stukken gebroken en gezeefd; de zeeffractie kleiner dan 0,5 mm wordt gebruikt voor de test.

Stoffen die gewoonlijk als pasta's geleverd zouden worden, moeten, in de mate van het mogelijke, in droge staat worden getest. Wanneer de stoffen niet in droge staat kunnen worden bereid, wordt de pasta (na het zoveel mogelijk verwijderen van vloeistof) getest als een 0,5 mm dikke, 2 mm brede en 10 mm lange plak, bereid met behulp van een mal.

▼B

1.6.3.3. *Uitvoering van de proeven*

De porseleinen pen wordt op het te onderzoeken monster geplaatst en de belasting wordt aangebracht. Tijdens de test moeten de groeven van de porseleinen plaat loodrecht op de bewegingsrichting liggen. Er moet goed op worden gelet dat de pen op het monster rust, dat voldoende van de te onderzoeken stof onder de pen ligt en dat de plaat op de juiste wijze onder de pen doorbeweegt. Voor pasta's wordt een 0,5 mm dikke mal met een gleuf van 2 bij 10 mm gebruikt om de pasta op de plaat aan te brengen. De porseleinen plaat moet in 0,44 seconden onder de porseleinen pen heen en weer bewegen over een afstand van 10 mm. De pen en elk gedeelte van het oppervlak mogen slechts voor één test worden gebruikt; de twee uiteinden van de pen kunnen dus dienen voor twee proeven en de twee oppervlakken van de plaat elk voor drie proeven.

Een reeks van zes proeven wordt uitgevoerd met 360 N belasting. Als een positief resultaat wordt verkregen tijdens deze zes proeven, moet een tweede reeks van zes proeven worden uitgevoerd met 120 N belasting. Bij gebruik van andere apparatuur wordt het monster vergeleken met de gekozen referentiestof via een vastgestelde procedure (bijvoorbeeld op-en-neer-techniek, enz.).

1.6.3.4. *Beoordeling*

Het testresultaat wordt als positief beschouwd als ten minste in één van de proeven een explosie (knetteren en/of een knal of ontbranden staan hiermee gelijk) plaatsvindt met het beschreven wrijvingsapparaat of als aan gelijkwaardige eisen voldaan wordt in andere wrijvingsapparatuur.

2. **GEGEVENS**

In beginsel wordt in de zin van deze richtlijn aan een stof of preparaat explosiegevaar toegeschreven indien een positief resultaat wordt verkregen in de thermische-, schok- of wrijvingsgevoeligheidstest.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTRAPPORT

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— de identiteit, samenstelling, zuiverheid, vochtgehalte, enz. van de onderzochte stof;

— de fysische vorm van het monster, en of het al dan niet werd verpulverd, gebroken en/of gezeefd;

— waarnemingen tijdens de thermische-gevoeligheidstests (bijvoorbeeld de monstermassa, aantal fragmenten, enz.);

— waarnemingen tijdens de mechanische-gevoeligheidstests (bijvoorbeeld de vorming van grote hoeveelheden rook of complete ontleding zonder knal, vlammen, vonken, knallen, knetteren, enz.);

— de resultaten van elke soort test;

— indien afwijkende apparatuur is gebruikt, moet dit op wetenschappelijke gronden worden gerechtvaardigd; bovendien moet de correlatie tussen meetresultaten met de afwijkende apparatuur en de hierboven beschreven apparatuur bewezen worden;

▼B

— eventueel nuttige opmerkingen, zoals verwijzing naar proeven met soortgelijke producten, die van belang kunnen zijn voor een correcte interpretatie van de resultaten;

— alle aanvullende opmerkingen die van belang kunnen zijn voor een goede interpretatie van de resultaten.

3.2. INTERPRETATIE EN BEOORDELING VAN DE RESULTATEN

In het testrapport moet worden vermeld welke resultaten als onjuist, afwijkend of niet-representatief worden beschouwd. Indien een van de resultaten moet worden verworpen, dient een toelichting én de resultaten van alle alternatieve of aanvullende proeven te worden gegeven. Indien een afwijkend resultaat niet kan worden verklaard, moet het worden aanvaard en gebruikt om de stof overeenkomstig in te delen.

4. **LITERATUUR**

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

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

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

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

▼B

Aanhangsel

Voorbeeld van materiaalspecificatie voor thermische-gevoeligheidstest (zie DIN 1623)

(1) Buis: Materiaalspecificatie nr. 1.0336.505 g

(2) Afsluitplaat: Materiaalspecificatie nr. 1.4873

(3) Getapte kraag en moer: Materiaalspecificatie nr. 1.3817

Figuur 1

Apparatuur voor de thermische-gevoeligheidstest

(Alle afmetingen in mm)

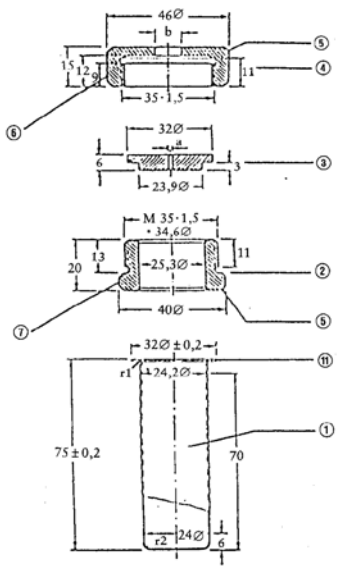


Fig. 1a Stalen buis en toebehoren

(1) Buis
(1a) Buitenflens
(2) Kraag met schroefdraad lage-wrijvingsdraad
(3) Afsluitplaat (a = 2,0 of 6,0 mm)
(4) Moer (b = 10 mm)
(5) Afgeschuind vlak
(6) 2 vlakken voor sleutel maat 41

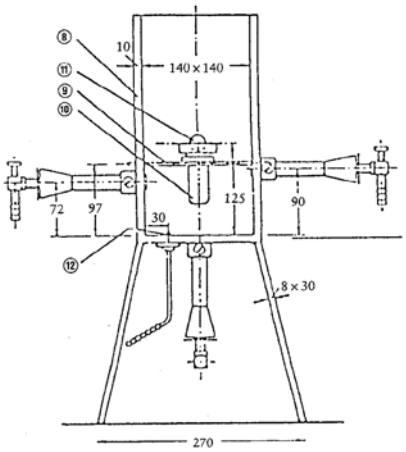


Fig. 1b Verwarmings- en beschermingstoestel

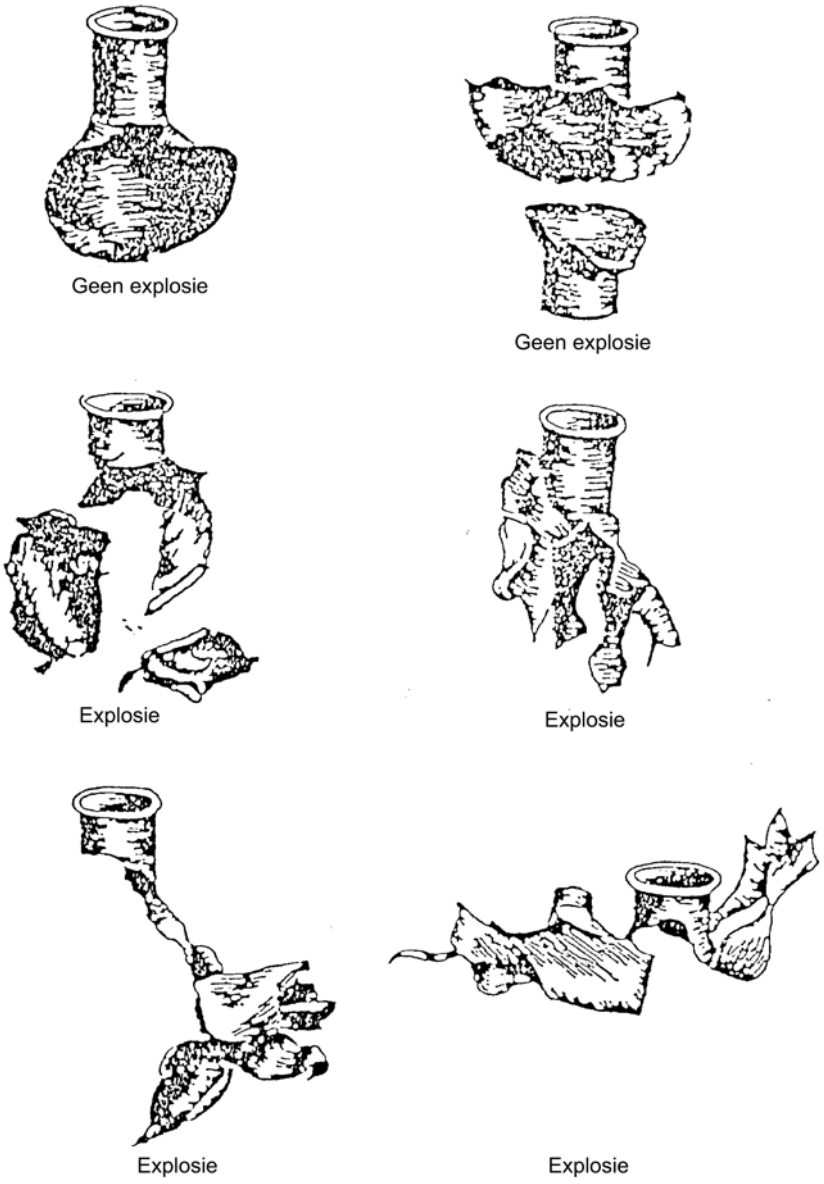
(7) 2 vlakken voor sleutel maat 36
(8) Scherfvrije doos
(9) 2 Steunstaafjes voor buis
(10) Gemonteerde buis
(11) Positie van de achterste brander; de andere branders zijn zichtbaar
(12) Spaarbrander

▼B

Figuur 2

Thermische-gevoeligheidstest

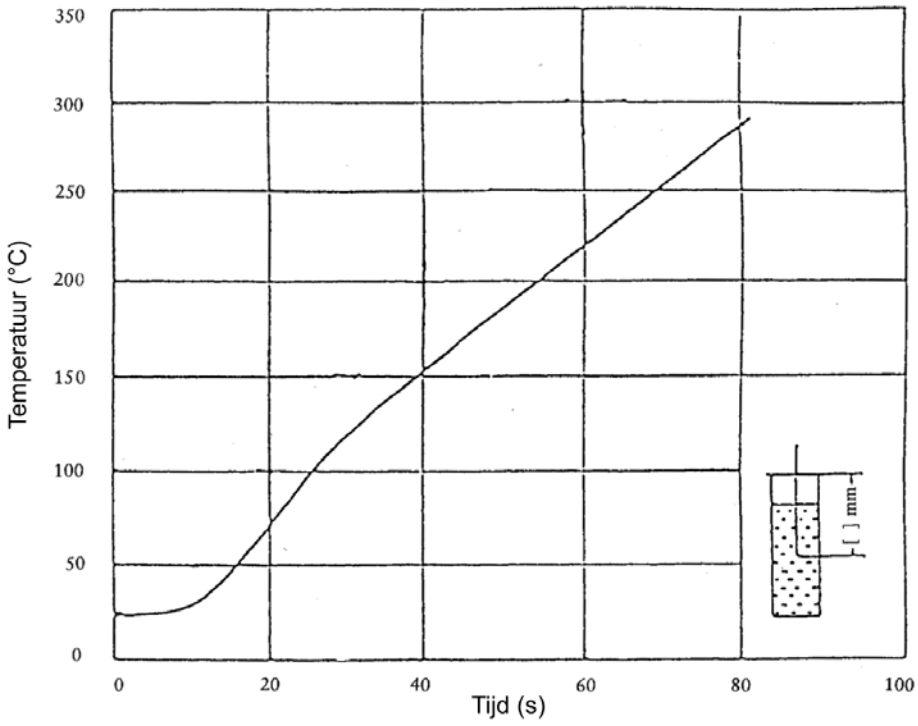
(Voorbeelden van fragmentatie)



▼B

Figuur 3

IJking voor opwarmsnelheid in de thermische-gevoeligheidstest



Temperatuur/tijd-curve verkregen door verhitting van dibutylftalaat (27 cm^3) in een gesloten (1,5 mm afsluitplaat) buis met behulp van een propaandebiet van circa 3,2 liter/minuut. De temperatuur wordt gemeten met een chromel/alumel thermokoppel, roestvrijstalen omhulsel van 1 mm doorsnede, in het midden van de buis geplaatst op 43 mm onder de rand. De opwarmsnelheid in het bereik van 135 °C tot 285 °C moet tussen 185 en 215 K/minuut liggen.

▼B

Figuur 4

Schokgevoeligheidstest

(Afmetingen in mm)

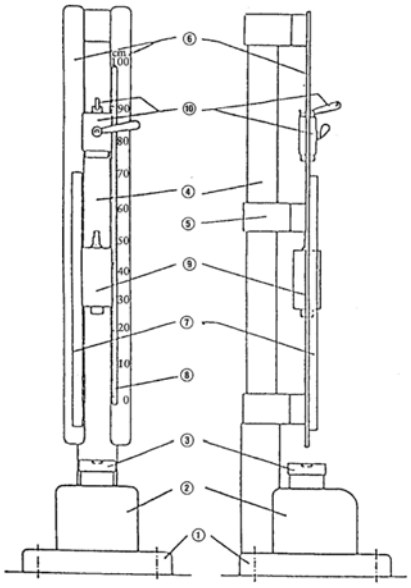


Fig. 4a Valhamer, voor- en zijaanzicht, overzicht

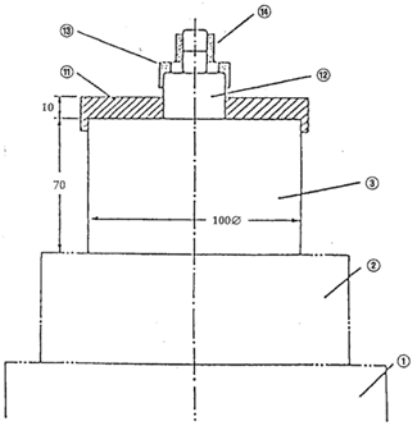


Fig. 4b Valhamer, onderste deel

(1) Voetstuk, 450 x 450 x 60
(2) Stalen blok, 230 x 250 x 200
(3) Aambeeld, 100 doorsnede x 70
(4) Kolom
(5) Middelste ophangsteun
(6) 2 Geleiders
(7) Getand rek
(8) Meetschaal
(9) Valhamer
(10) Ontkoppelinrichting
(11) Centreerplaat
(12) Tussenaambeeld (verwisselbaar), 26 doorsnede x 26
(13) Centreerring met openingen
(14) Schoktoestel

▼B

Figuur 4

Vervolg

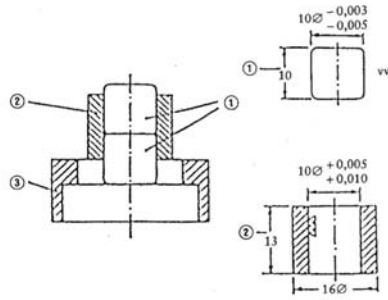


Fig. 4c Schoktoestel voor stoffen in poeder- of pasta-achtige vorm

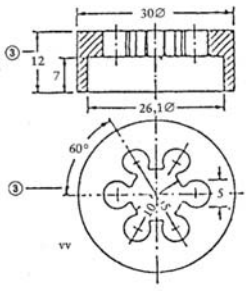
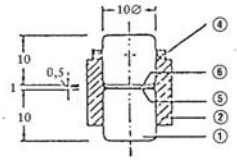


Fig. 4d Schoktoestel voor vloeistoffen

(1) Stalen cilinders
(2) Geleidingsring voor stalen cilinders
(3) Centreerring met openingen
(a) verticale snede
(b) bovenaanzicht
(4) Rubber ring
(5) Vloeistof (40 mm^3)
(6) Vloeistofloze ruimte



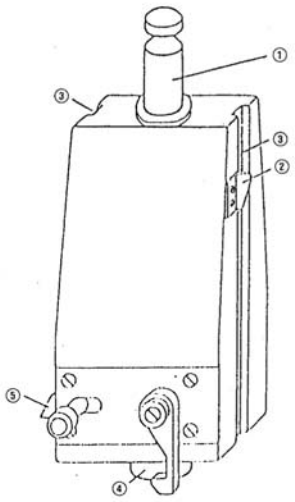


Fig. 4e Hamer (valgewicht van 5 kg)

(1) Insteekeinde
(2) Wijzertje voor de hoogte
(3) Positioneergroef
(4) Cilindrische slagkop
(5) Terugslaghaak

▼B

Figuur 5

Wrijvingsgevoeligheidstest

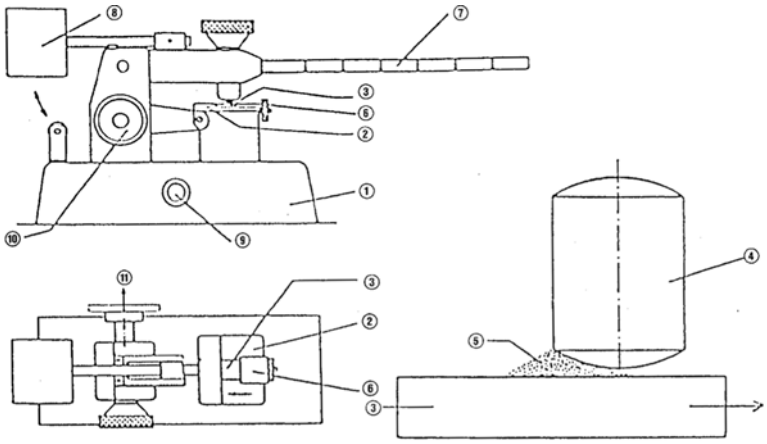


Fig. 5a Wrijvingstoestel; verticaal- en bovenaanzicht

Fig. 5b Beginpositie van de pen op het monster

(1) Stalen voetstuk
(2) Beweegbare slede
(3) Porseleinen plaat, 25 x 25 x 5 mm, vast op slede
(4) Vaste porseleinen pen, 10 doorsnede x 15 mm
(5) Monster tijdens de proef, ongeveer 10 mm^3
(6) Penhouder
(7) Belastingarm
(8) Tegengewicht
(9) Schakelaar
(10) Wiel om slede naar startpositie te bewegen
(11) Overbrenging naar elektromotor

▼B

A.15. ZELFONTBRANDINGSTEMPERATUUR (VLOEISTOFFEN EN GASSEN)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Explosieve stoffen en stoffen die spontaan ontbranden in aanraking met lucht bij kamertemperatuur moeten niet onderworpen worden aan dit onderzoek. De testprocedure is van toepassing op gassen, vloeistoffen en dampen die in aanwezigheid van lucht door een heet oppervlak tot ontbranding kunnen worden gebracht.

De temperatuur waarbij zelfontbranding optreedt, kan aanzienlijk worden verlaagd door de aanwezigheid van katalytische verontreinigingen, door het oppervlakmateriaal, of door een groter volume van het proefvat.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De mate van zelfontbranding wordt uitgedrukt in de zelfontbrandingstemperatuur. De zelfontbrandingstemperatuur is de laagste temperatuur waarbij de te onderzoeken stof gemengd met lucht tot ontbranding komt onder omstandigheden zoals beschreven in deze testmethode.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

De referentiestoffen worden beschreven in de normen (zie 1.6.3). Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om de werking van de methode regelmatig te controleren en om vergelijking met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De methode bepaalt de laagste temperatuur van het binnenoppervlak van een vat, die leidt tot ontbranding van een in het vat geïnjecteerd(e) gas, damp, of vloeistof.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De reproduceerbaarheid is afhankelijk van het temperatuurgebied waarin de zelfontbranding optreedt, en van de gebruikte testmethode.

De gevoeligheid en specificiteit zijn afhankelijk van de gebruikte testmethode.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Apparatuur**

De apparatuur wordt beschreven in de onder 1.6.3 genoemde methode.

1.6.2. **Testomstandigheden**

De te onderzoeken stof wordt onderzocht volgens de methode beschreven onder 1.6.3.

1.6.3. **Uitvoering van de test**

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

▼B

2. **GEGEVENS**

Registreer de testtemperatuur, de atmosferische druk, de gebruikte hoeveelheid stof en de tijdsduur tot ontbranding.

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen);

— de gebruikte hoeveelheid stof en de atmosferische druk;

— de gebruikte apparatuur;

— de resultaten van metingen (testtemperaturen, resultaten met betrekking tot ontbranding en bijbehorende tijdsduur);

— alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

4. **LITERATUUR**

Geen.

▼B

A.16. **RELATIEVE ZELFONTBRANDINGSTEMPERATUUR VAN VASTE STOFFEN**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Explosiegevaarlijke stoffen en stoffen die in contact met lucht bij kamertemperatuur spontaan ontbranden, moeten niet aan deze test worden onderworpen.

Deze test geeft oriënterende informatie over de zelfontbrandbaarheid van vaste stoffen bij verhoogde temperatuur.

Indien de warmte, die vrijkomt bij reactie van de stof met zuurstof of bij exotherme ontleding, niet snel genoeg aan de omgeving wordt afgegeven, vindt zelfopwarming en uiteindelijk zelfontbranding plaats. Zelfontbranding kan dus slechts optreden als de snelheid van de warmteproductie groter is dan die van het warmteverlies.

De testprocedure is bruikbaar als een oriënterende proef voor vaste stoffen. Omdat de ontsteking en verbranding van vaste stoffen ingewikkelde processen zijn, mag de volgens deze testmethode bepaalde zelfontbrandingstemperatuur alleen voor vergelijkingsdoeleinden worden gebruikt.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De zelfontbrandingstemperatuur, die met deze methode verkregen wordt, is de laagste omgevingstemperatuur in ^{o}C waarbij een bepaald volume van een stof onder welbepaalde omstandigheden ontbrandt.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Niet gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een bepaald volume van de te onderzoeken stof wordt bij kamertemperatuur in een oven geplaatst; het temperatuurverloop in het midden van het monster wordt als functie van de tijd geregistreerd, terwijl de temperatuur van de oven met een snelheid van 0,5 ^{o}C/minuut wordt opgevoerd tot 400 ^{o}C of tot de smelttemperatuur indien deze lager is. Voor het doel van deze test wordt de temperatuur van de oven, waarbij de temperatuur van het monster door zelfopwarming 400 ^{o}C bereikt, de zelfontbrandingstemperatuur genoemd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Apparatuur**

1.6.1.1. *Oven*

Een laboratoriumoven van ongeveer 2 liter, waarvan het temperatuurverloop lineair geregeld kan worden, en voorzien van natuurlijke luchtcirculatie en explosieontlasting. Teneinde eventueel explosiegevaar te vermijden, moet voorkomen worden dat ontledingsgassen in contact kunnen komen met de elektrische verwarmingselementen.

▼B

1.6.1.2. *Gazen kubus*

Een stuk roestvrij staalgaas met openingen van 0,045 mm moet worden uitgeknipt volgens het patroon van figuur 1. Het gaas wordt gevouwen en met draad vastgemaakt in de vorm van een kubus met open bovenkant.

1.6.1.3. *Thermokoppels*

Geschikte thermokoppels.

1.6.1.4. *Recorder*

Tweekanaalsrecorder, gecalibreerd van 0 tot 600 °C of hiermee overeenkomstige spanning.

1.6.2. Testomstandigheden

De stoffen worden getest zoals ontvangen.

1.6.3. Uitvoering van de test

De kubus wordt gevuld met de te onderzoeken stof waarbij onder zachtjes tikken zoveel stof toegevoegd wordt dat de kubus volledig gevuld is. Vervolgens wordt de kubus bij kamertemperatuur midden in de oven gehangen. Het ene thermokoppel wordt in het middelpunt van de kubus gebracht en het tweede tussen de kubus en de ovenwand om de oventemperatuur te registreren.

De temperaturen van de oven en van het monster worden continu geregistreerd terwijl de temperatuur van de oven met een snelheid van 0,5 °C/min wordt opgevoerd tot 400 °C of tot de smelttemperatuur indien deze lager is dan 400 °C.

Wanneer de stof reageert, zal het thermokoppel in het monster een scherpe temperatuursstijging boven de oventemperatuur te zien geven.

2. **GEGEVENS**

De oventemperatuur, waarbij de temperatuur van het monster door zelfopwarming 400 °C bereikt, is van belang voor de beoordeling (zie figuur 2).

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— een beschrijving van de onderzochte stof;

— de meetresultaten inclusief de temperatuur/tijd-grafiek;

— alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

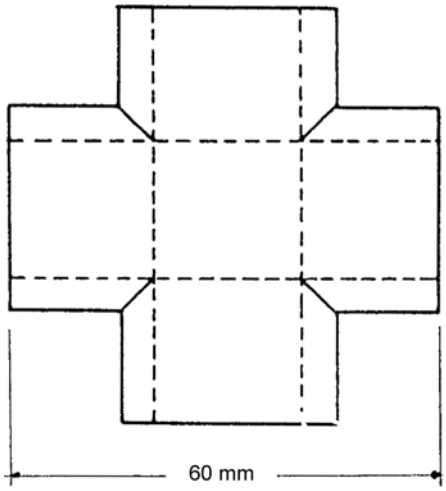
4. **LITERATUUR**

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

▼B

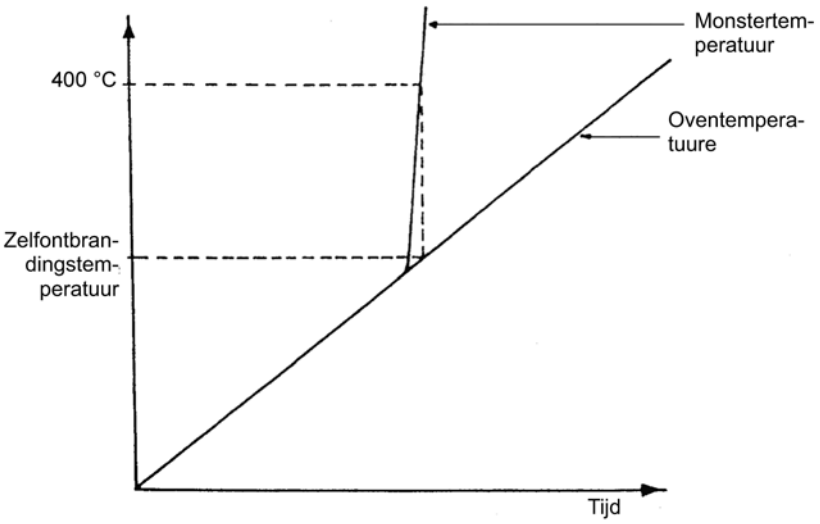
Figuur 1

Patroon van de testkubus met ribben van 20 mm



Figuur 2

Karakteristieke temperatuur/tijd-curve



▼B

A.17. **OXIDERENDE EIGENSCHAPPEN (VASTE STOFFEN)**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Het is nuttig om, voordat deze test wordt uitgevoerd, te beschikken over gegevens over de mogelijke explosieve eigenschappen van de te onderzoeken stof.

Deze test is niet toepasbaar op vloeistoffen en gassen, explosieve of licht ontvlambare vaste stoffen of organische peroxiden.

Deze test hoeft niet uitgevoerd te worden als op grond van de structuurformule met afdoende zekerheid kan worden vastgesteld dat de stof niet exotherm kan reageren met een brandbare stof.

Teneinde vast te stellen of voor deze test speciale voorzorgsmaatregelen nodig zijn, moet een oriënterende proef worden uitgevoerd.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Brandduur: de tijd in seconden die de reactiezone nodig heeft om zich langs een rups stof te verplaatsen, volgens de werkwijze van 1.6.

Brandsnelheid: de bijbehorende snelheid in mm/s.

Maximale brandsnelheid: de hoogste waarde van de brandsnelheden van mengsels die 10 tot 90 gewichtsprocent oxiderende stof bevatten.

1.3. REFERENTIESTOF

Als referentiestof voor de test en de oriënterende proef wordt bariumnitraat (analytisch zuiver) gebruikt.

Het referentiemengsel is het volgens 1.6 bereide mengsel van bariumnitraat en poedervormige cellulose, dat de grootst mogelijke brandsnelheid heeft (doorgaans een mengsel met 60 gewichtsprocent bariumnitraat).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Met het oog op de veiligheid wordt een oriënterende proef uitgevoerd. Verdere onderzoeken zijn onnodig wanneer uit de oriënterende proef overduidelijk blijkt dat de te onderzoeken stof oxiderende eigenschappen heeft. In andere gevallen wordt de stof aan het volledige onderzoek onderworpen.

In het volledige onderzoek wordt de te onderzoeken stof in verschillende verhoudingen gemengd met een bepaalde brandbare stof. Van ieder mengsel wordt een rups gevormd en deze wordt aan één uiteinde aangestoken. De maximale brandsnelheid wordt bepaald en vergeleken met de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Indien nodig kunnen de stoffen op willekeurige wijze worden gemalen en gemengd, mits de maximale brandsnelheden uit de zes verschillende bepalingen niet meer dan 10 % verschillen van hun rekenkundige gemiddelde.

▼B

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.6.1. **Voorbereiding**

1.6.1.1. *Teststof*

De deeltjesgrootte van het te onderzoeken monster wordt als volgt tot minder dan 0,125 mm verkleind: de stof wordt gezeefd en de overblijvende fractie gemalen; deze handelingen worden herhaald totdat de gehele portie door de zeef is gegaan.

Iedere methode voor malen en zeven kan worden gebruikt, zolang aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Vóór het bereiden van het mengsel wordt de stof eerst tot constant gewicht gedroogd bij 105 °C. Indien de ontledingstemperatuur van de te onderzoeken stof beneden 105 °C ligt, wordt de stof bij een lagere temperatuur gedroogd.

1.6.1.2. *Brandbare stof*

Poedervormige cellulose wordt gebruikt als brandbare stof. De cellulose moet het soort zijn dat wordt gebruikt bij dunne-laagchromatografie of kolomchromatografie. Een type waarbij meer dan 85 % van de vezels een lengte hebben tussen 0,020 en 0,075 mm is geschikt gebleken. Het cellulosepoeder wordt gezeefd door een zeef met openingen van 0,125 mm. Eén en dezelfde voorbewerkte batch cellulose wordt gebruikt gedurende de hele proef.

Vóór het bereiden van het mengsel wordt de poedervormige cellulose bij 105 °C tot constant gewicht gedroogd.

Indien in de oriënterende proef houtmeel wordt gebruikt, wordt het houtmeel van naaldhout gebruikt dat door een zeef met openingen van 1,6 mm valt; het gezeefde houtmeel wordt grondig gemengd en vervolgens vier uur bij 105 °C gedroogd in een laag van maximaal 25 mm dikte. Na afkoelen wordt het houtmeel in een luchtdicht vat dat zover mogelijk gevuld is, bewaard tot het ogenblik waarop het wordt gebruikt, zo mogelijk binnen 24 uur na het drogen.

1.6.1.3. *Ontstekingsbron*

Als ontstekingsbron dient de hete vlam van een gasbrander (minimale diameter 5 mm). Indien een andere ontstekingsbron wordt gebruikt (bijvoorbeeld bij proeven in een inerte atmosfeer), moeten beschrijving, redenen en geschiktheid worden gerapporteerd.

1.6.2. **Uitvoering van de test**

Opmerking:

In verband met mogelijk explosiegevaar moeten mengsels van oxiderende stoffen en cellulose of houtmeel met de nodige voorzichtigheid worden behandeld.

1.6.2.1. *Oriënterende proef*

Twee gewichtsdelen gedroogde stof worden grondig gemengd met één gewichtsdeel cellulose of houtmeel. Van het mengsel wordt, bijvoorbeeld met behulp van een glazen trechter waarvan de steel is dichtgestopt, zonder aandrukken een kegelvormig hoopje gemaakt met een basisdiameter van 3,5 cm en een hoogte van 2,5 cm.

▼B

Het hoopje wordt op een koude onbrandbare, niet poreuze en slecht warmtegeleidende grondplaat geplaatst. De oriënterende proef moet worden uitgevoerd in een zuurkast zoals beschreven in 1.6.2.2.

De ontstekingsbron wordt in contact gebracht met het hoopje stof. De heftigheid en de duur van de reactie worden geobserveerd en geregistreerd.

De stof kan worden aangemerkt als oxiderend als de reactie heftig verloopt.

Zodra het resultaat aanleiding geeft tot enige twijfel, dient de hieronder beschreven volledige test te worden uitgevoerd.

1.6.2.2. *Volledig onderzoek*

Er worden mengsels van de oxiderende stof en de brandbare stof gemaakt, waarbij het gehalte oxiderende stof in stappen van 10 gewichtsprocenten oploopt van 10 tot 90 gewichtsprocenten. In grensgevallen moeten tussenliggende mengverhoudingen worden bereid, zodat de maximale brandsnelheid nauwkeuriger kan worden bepaald.

Er wordt een rupsstof gevormd met behulp van een mal. Deze mal is van metaal, heeft een lengte van 250 mm en een driehoekige doorsnede met een hoogte van 10 mm en een basis van 20 mm. Aan weerszijden van de mal worden in de lengterichting twee metalen platen aangebracht die 2 mm boven de driehoekige doorsnede uitsteken (zie figuur). De mal wordt zonder aandrukken gevuld met een kleine overmaat van het mengsel. Na de mal eenmaal van een hoogte van 2 cm op een vast oppervlak te hebben laten vallen, wordt de overmaat mengsel met een schuingehouden blad weggeveegd. De zijstroken worden verwijderd en het overblijvende poeder wordt met een rol glad gestreken. Ten slotte wordt bovenop de mal een vuurvaste, niet poreuze en slecht warmtegeleidende plaat gelegd, het geheel wordt omgekeerd en de mal verwijderd.

De rups wordt in de zuurkast geplaatst in een richting loodrecht op de richting van de trek.

De luchtsnelheid moet voldoende zijn om te verhinderen dat verbrandingsgassen naar de laboratoriumruimte ontsnappen; de luchtsnelheid mag gedurende de test niet veranderd worden. De apparatuur moet worden omgeven door een tochtscherm.

In verband met de hygroscopische eigenschappen van cellulose en sommige te onderzoeken stoffen moet de test zo snel mogelijk worden uitgevoerd.

Eén uiteinde van de rups wordt aangestoken door aanraking met de vlam.

De brandduur wordt gemeten over een lengte van 200 mm, nadat de reactiezone reeds een beginafstand van 30 mm heeft afgelegd.

De test wordt uitgevoerd met de referentiestof en vervolgens ten minste éénmaal met elk mengsel uit de reeks van de te onderzoeken stof en cellulose.

Indien een maximale brandsnelheid wordt waargenomen die aanzienlijk hoger is dan de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel, kan de test worden gestaakt; zo niet, dan moet de test vijfmaal worden herhaald met de drie mengsels die de hoogste brandsnelheid opleverden.

▼B

Indien men vermoedt dat het resultaat vals positief is, moet de test herhaald worden met een inerte stof met een zelfde deeltjesgrootte, zoals kiezelgoer, in plaats van cellulose. Ook kan het mengsel te onderzoeken stof/cellulose, dat de grootste verbrandingssnelheid heeft, opnieuw getest worden in een inerte atmosfeer (< 2 % v/v zuurstofgehalte).

2. **GEGEVENS**

Om veiligheidsredenen moet de hoogste brandsnelheid — en niet de gemiddelde waarde — worden beschouwd als kenmerk voor de oxiderende eigenschappen van de stof.

De hoogste waarde van de brandsnelheid binnen een serie van zes metingen voor één bepaald mengsel geldt voor de beoordeling.

Maak een grafiek waarin de hoogste waarde van de brandsnelheid van ieder mengsel wordt uitgezet tegen de concentratie van de oxiderende stof in ieder mengsel; bepaal uit deze grafiek de maximale brandsnelheid.

De zes waarden van de brandsnelheid, in een serie van zes metingen op het mengsel met de hoogste brandsnelheid, mogen niet meer dan 10 % afwijken van hun rekenkundig gemiddelde; anders moeten de gebruikte methoden voor malen en mengen verbeterd worden.

Vergelijk de verkregen maximale brandsnelheid met de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel (zie 1.3).

Als tests worden uitgevoerd in een inerte atmosfeer, moet de maximale reactiesnelheid worden vergeleken met die van het referentiemengsel in een inerte atmosfeer.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— beschrijving, samenstelling, zuiverheid, vochtgehalte, enz. van de onderzochte stof;

— eventuele voorbehandeling van de onderzochte stof (bijvoorbeeld malen, drogen enz.)

— de in de onderzoeken gebruikte ontstekingsbron;

— de resultaten van de metingen;

— de wijze van reactie (bijvoorbeeld een „flashverbranding” aan het oppervlak of een verbranding door de gehele massa, eventuele informatie met betrekking tot de verbrandingsproducten enz.);

— alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, inclusief een beschrijving van de heftigheid (vlammen, vonken, rook, smeulen, en dergelijke) en een schatting van de brandduur van de oriënterende proef, zowel voor de teststof als voor de referentiestof;

— de resultaten van proeven met een inerte stof, indien van toepassing;

— de resultaten van proeven in een inerte atmosfeer, indien van toepassing.

▼B

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Een stof wordt aangemerkt als een oxiderende stof wanneer:

a) er in de oriënterende proef een heftige reactie optreedt;

b) in de volledige test de maximale brandsnelheid van de onderzochte mengsels groter is dan of gelijk is aan de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel van cellulose en bariumnitraat.

Om vals positieve resultaten te vermijden, dient bij het verwerken van de resultaten ook rekening gehouden te worden met de resultaten verkregen bij het testen van stof gemengd met inert materiaal en/of in een inerte atmosfeer.

4. **LITERATUUR**

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

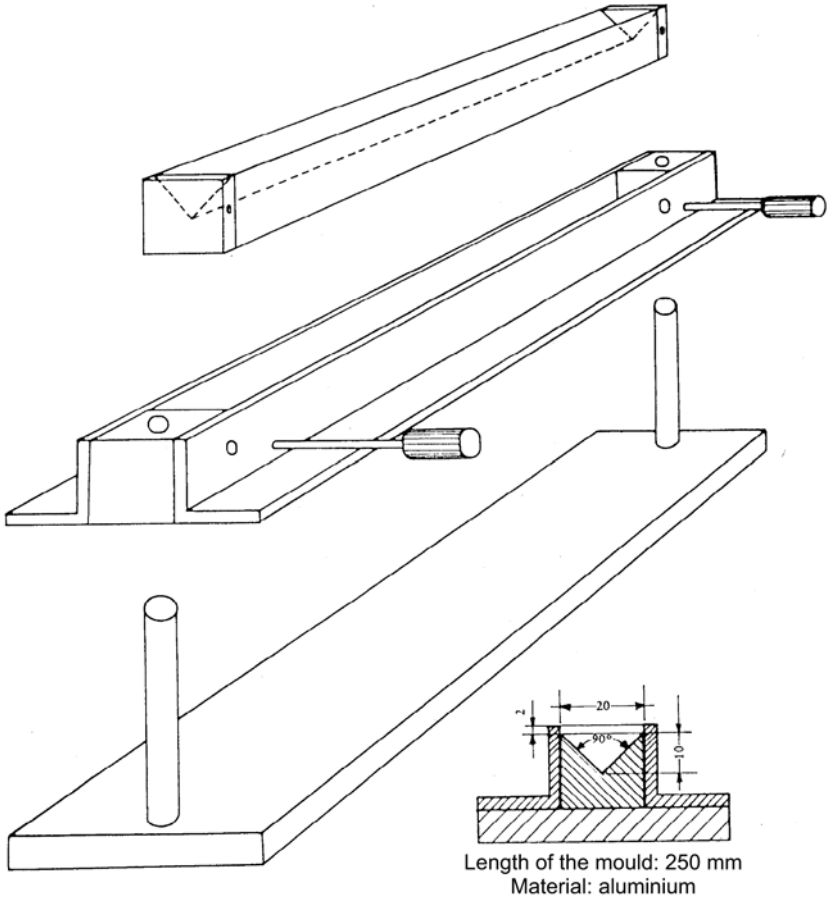
▼B

Aanhangsel

Figuur

Mal en toebehoren voor de bereiding van de rups

(Afmetingen in mm)



▼B

A.18. **AANTALGEMIDDELD MOLECUULGEWICHT EN MOLECUULGEWICHTSVERDELING VAN POLYMEREN**

1. **METHODE**

Deze methode voor gelpermeatiechromatografie is overgenomen van TG 118 van de OESO (1996). Voor de fundamentele beginselen en nadere technische informatie wordt verwezen naar de referenties.

1.1. INLEIDING

Aangezien de eigenschappen van polymeren zo sterk uiteenlopen, is het onmogelijk een enkele methode te beschrijven waarin voor alle mogelijkheden en specifieke gevallen bij de scheiding van polymeren exact de omstandigheden voor scheiding en evaluatie worden aangegeven. Met name complexe polymeersystemen komen vaak niet in aanmerking voor gelpermeatiechromatografie (GPC). Wanneer GPC niet uitvoerbaar is, kan het molecuulgewicht met behulp van andere methoden worden bepaald (zie bijlage). In dat geval moet een gedetailleerde beschrijving van en een volledige motivering voor de gebruikte methode worden gegeven.

De hier beschreven methode is gebaseerd op de norm DIN 55672 (1). Deze norm bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop de experimenten moeten worden uitgevoerd en de gegevens moeten worden geëvalueerd. Wanneer veranderingen in de wijze van uitvoering nodig zijn, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Ook andere normen kunnen worden gebruikt, mits de referenties volledig worden vermeld. In de beschreven methode worden voor de kalibratie polystyreenmonsters met een bekende polydispersiteit gebruikt en wijzigingen kunnen nodig zijn om de methode geschikt te maken voor bepaalde polymeren zoals in water oplosbare polymeren en vertakte polymeren met een lange keten.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het aantalgemiddeld molecuulgewicht (M_n) en het gewichtgemiddeld molecuulgewicht (M_w) worden bepaald met behulp van de volgende vergelijkingen:

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

waarbij

H_i = de hoogte van het detectorsignaal vanaf de basislijn bij het retentievolume V_i;

M_i = het molecuulgewicht van de polymeerfractie bij het retentievolume V_i;

N = het aantal meetpunten.

De verhouding M_w/M_n is de breedte van de molecuulgewichtsverdeling, die een maat is voor de dispersiteit van het systeem.

▼B

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Aangezien GPC een relatieve methode is, moet het systeem worden gekalibreerd. Als standaard worden normaal gesproken fijn verdeelde lineair opgebouwde polystyreenmonsters gebruikt met bekende gemiddelde molecuulgewichten (M_n en M_w) en een bekende molecuulgewichtsverdeling. De kalibratiecurve kan alleen voor de bepaling van het molecuulgewicht van het onbekende monster worden gebruikt als de omstandigheden voor de scheiding van het monster en de standaards op identieke wijze zijn gekozen.

Een tijdens een bepaald experiment vastgesteld verband tussen het molecuulgewicht en het elutievolume is alleen onder de specifieke omstandigheden van dat experiment geldig. Daarbij gaat het vooral om de temperatuur, het oplosmiddel (of het oplosmiddelenmengsel), de omstandigheden tijdens chromatografie en de kolom of het kolomsysteem waarop de scheiding is uitgevoerd.

Een op deze manier bepaald molecuulgewicht van het monster is relatief en wordt beschreven als een „polystyreenequivalent molecuulgewicht". Dit houdt in dat het molecuulgewicht afhankelijk van de structurele en chemische verschillen tussen het monster en de standaard in meer of mindere mate van de absolute waarde kan afwijken. Als een andere standaard wordt gebruikt, zoals polyethyleenglycol, polyethyleenoxide, polymethylmethacrylaat of polyacrylzuur, moet de reden daarvan worden vermeld.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Zowel de molecuulgewichtsverdeling van het monster als het gemiddelde molecuulgewicht (M_n of M_w) kan met behulp van GPC worden bepaald. GPC is een speciaal soort vloeistofchromatografie waarbij het monster aan de hand van het hydrodynamische volume van de verschillende bestanddelen wordt gescheiden (2).

De scheiding voltrekt zich tijdens de passage van het monster door een kolom die met een poreus materiaal, meestal een organische gel, is gevuld. Kleine moleculen kunnen de poriën binnendringen, terwijl grote moleculen dit niet kunnen. Grote moleculen volgen dan ook een kortere weg en worden het eerste geëlueerd. Middelgrote moleculen kunnen sommige poriën binnendringen en worden later geëlueerd. De kleinste moleculen, waarvan de gemiddelde hydrodynamische straal kleiner is dan de poriën van de gel, kunnen alle poriën binnendringen. Deze worden het laatst geëlueerd.

In het ideale geval wordt de scheiding uitsluitend door de grootte van het molecuul bepaald, maar enige storing door absorptie-effecten is in de praktijk vrijwel niet te voorkomen. Een ongelijkmatige pakking van de kolom en dode ruimten kunnen de situatie nog ongunstiger maken (2).

Detectie gebeurt aan de hand van bijvoorbeeld de brekingsindex of uv-absorptie en levert een eenvoudige verdelingskromme op. Om echte waarden voor het molecuulgewicht aan de kromme te kunnen toekennen, moet de kolom echter worden gekalibreerd met behulp van polymeren met een bekend molecuulgewicht en liefst een in grote lijnen vergelijkbare structuur, bijvoorbeeld een aantal polystyreenstandaards. Meestal levert dit een gausscurve op, soms met een kleine staart aan de kant van de lage molecuulgewichten, waarbij op de verticale as de geëlueerde hoeveelheid in gewicht wordt uitgezet en op de horizontale as de logaritme van het molecuulgewicht.

▼B

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking) van het elutievolume moet beter zijn dan 0,3 %. Indien een chromatogram tijdafhankelijk wordt geëvalueerd en niet aan dit criterium voldoet, moet door correctie met behulp van een interne standaard de vereiste herhaalbaarheid van de analyse worden gewaarborgd (1). De polydispersiteit is afhankelijk van het molecuulgewicht van de standaard. Normale waarden voor polystyreenstandaards zijn:

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

(M_p is het molecuulgewicht van de standaard bij de top van de piek).

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Bereiding van de polystyreenstandaardoplossingen**

De polystyreenstandaard wordt opgelost door deze zorgvuldig te mengen in de gekozen elutievloeistof. Bij de bereiding van de oplossingen moet rekening worden gehouden met de aanbevelingen van de fabrikant.

De concentratie van de standaardoplossingen wordt bepaald aan de hand van verschillende factoren, zoals het geïnjecteerde volume, de viscositeit van de oplossing en de gevoeligheid van de detector. Het maximale geïnjecteerde volume moet aan de lengte van de kolom worden aangepast om overlading te voorkomen. Voor een scheiding met behulp van GPC over een kolom van 30 cm × 7,8 mm wordt meestal een volume van 40 tot 100 µl geïnjecteerd. Grotere volumes zijn mogelijk, maar niet groter dan 250 µl. De optimale verhouding tussen het geïnjecteerde volume en de concentratie moet vóór de kalibratie van de kolom worden bepaald.

1.6.2. **Bereiding van de monsteroplossing**

In beginsel gelden voor de bereiding van de monsteroplossingen dezelfde eisen. Het monster wordt door zorgvuldig schudden opgelost in een geschikt oplosmiddel, bijvoorbeeld tetrahydrofuraan (THF). Het mag in geen geval met behulp van een ultrasoon bad worden opgelost. Indien nodig, wordt de monsteroplossing gezuiverd over een membraanfilter met een poriegrootte tussen 0,2 en 2 µm.

Indien de oplossing onopgeloste deeltjes bevat, moet dit in het eindverslag worden vermeld, aangezien deze door hoogmoleculaire bestanddelen kunnen ontstaan. Er moet aan adequate methode worden gebruikt om het gewichtspercentage van de onopgeloste deeltjes te bepalen. De oplossingen moeten binnen 24 uur worden gebruikt.

1.6.3. **Apparatuur**

— oplosmiddelreservoir

— ontgasser (indien van toepassing)

— pomp

▼B

— pulsdemper (indien van toepassing)

— injectiesysteem

— chromatografiekolommen

— detector

— stromingsmeter (indien van toepassing)

— gegevensrecorder/verwerker

— afvalreservoir

Er moet voor worden gezorgd dat het GPC-systeem niet met de gebruikte oplosmiddelen reageert (bijvoorbeeld door stalen capillairen te gebruiken voor THF-oplossingen).

1.6.4. **Injectie- en oplosmiddeltoevoersysteem**

Een bekend volume van de monsteroplossing wordt met behulp van een autosampler of manueel in een scherp begrensde zone op de kolom gebracht. Wanneer bij manueel opbrengen de plunjer van de injectiespuit te snel wordt ingedrukt of teruggetrokken, kan dit tot veranderingen in de waargenomen molecuulgewichtsverdeling leiden. Het oplosmiddeltoevoersysteem moet voorzover mogelijk pulsatievrij zijn en liefst een pulsdemper bevatten. De stroomsnelheid moet ongeveer 1 ml/min zijn.

1.6.5. **Kolom**

Afhankelijk van het monster wordt het polymeer gekarakteriseerd met behulp van één kolom of een aantal in serie gekoppelde kolommen. In de handel zijn verschillende poreuze pakkingsmaterialen met bekende eigenschappen (bijvoorbeeld poriegrootte en exclusiegrens) verkrijgbaar. De keuze van de gel en de lengte van de kolom wordt bepaald door zowel de eigenschappen van het monster (hydrodynamisch volume, molecuulgewichtsverdeling) als de specifieke omstandigheden voor de scheiding zoals oplosmiddel, temperatuur en stroomsnelheid (1)(2)(3).

1.6.6. **Theoretische schotels**

De voor de scheiding gebruikte kolom of combinatie van kolommen moet worden gekarakteriseerd met behulp van het aantal theoretische schotels. Daartoe moet, indien THF als elutievloeistof wordt gebruikt, een oplossing van ethylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof op een kolom met een bekende lengte worden gebracht. Het aantal theoretische schotels wordt berekend met de volgende vergelijking:

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

waarbij:

N = het aantal theoretische schotels;

V_c = het elutievolume bij de top van de piek;

▼B

W = de piekbreedte aan de basis;

$W_{1/2}$ = de piekbreedte op halve hoogte.

1.6.7. **Scheidend vermogen**

Naast het aantal theoretische schotels, een grootheid die bepalend is voor de bandbreedte, speelt ook het scheidend vermogen, dat wordt bepaald door de helling van de kalibratiecurve, een rol. Het scheidend vermogen van een kolom kan als volgt worden bepaald:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{oppervlak doorsnede van de kolom}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

waarbij:

$V_{e,\ M_x}$ = het elutievolume voor polystyreen met molecuulgewicht M_x;

$V_{e,(10M_x)}$ = het elutievolume voor polystyreen met een tien keer zo hoog molecuulgewicht.

De resolutie van het systeem wordt meestal als volgt gedefinieerd:

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

waarbij:

V_{el}, V_{e2} = het elutievolume van de twee polystyreenstandaards bij de top van de piek;

$W_{l'}$ W_2 = die piekbreedte aan de basis;

M_1, M_2 = het molecuulgewicht bij de top van de pieken (deze moeten een factor 10 van elkaar verschillen).

De R-waarde voor het kolomsysteem moet groter zijn dan 1,7 (4).

1.6.8. **Oplosmiddelen**

Alle oplosmiddelen moeten zeer zuiver zijn (THF wordt gebruikt met een zuiverheid van 99,5 %). Het oplosmiddelreservoir (indien nodig onder inert gas) moet groot genoeg zijn voor de kalibratie van de kolom en de analyse van verschillende monsters. Het oplosmiddel moet worden ontgast voordat het via de pomp naar de kolom wordt getransporteerd.

1.6.9. **Temperatuurbewaking**

De temperatuur van de kritische interne onderdelen (injectieblok, kolommen, detector en leidingen) moet constant zijn en in overeenstemming zijn met het gekozen oplosmiddel.

▼B

1.6.10. **Detector**

De detector is bedoeld om de concentratie van het monster in het eluaat uit de kolom kwantitatief te registreren. Om een onnodige verbreding van de pieken te voorkomen, moet het volume van de meetcel van de detector zo klein mogelijk worden gehouden. Het volume mag niet groter zijn dan 10 µl, behalve voor lichtverstrooiings- en viscositeitsdetectoren. Meestal wordt voor de detectie differentiële refractometrie gebruikt. Indien dit in verband met de specifieke eigenschappen van het monster of de elutievloeistof nodig is, kunnen echter ook andere soorten detectors worden gebruikt, zoals UV/VIS, IR of viscositeitsdetectoren.

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. GEGEVENS

Voor de gedetailleerde beoordelingscriteria en voor de eisen ten aanzien van het verzamelen en bewerken van de gegevens wordt verwezen naar de DIN-norm (1).

Voor elk monster moeten twee onafhankelijke experimenten worden uitgevoerd die los van elkaar moeten worden geanalyseerd.

Voor elke meting moet de waarde van M_n, M_R, M_w/M_n en M worden vermeld. Daarbij moet expliciet worden vermeld dat de gemeten waarden relatief zijn en worden uitgedrukt in equivalentmolecuulgewicht van de gebruikte standaard.

Na de bepaling van de retentievolumes of de retentietijden (eventueel gecorrigeerd met behulp van een interne standaard) wordt de logaritmische waarde van M (waarbij M de top van de piek van de kalibratiestandaard is) tegen een van deze grootheden uitgezet. Per log-interval zijn minimaal twee kalibratiepunten nodig en voor de curve als geheel minimaal vijf meetpunten. Het geraamde molecuulgewicht van het monster moet tussen het eerste en het laatste meetpunt liggen. Voor de bepaling van het laagste molecuulgewicht van de kalibratiecurve wordt een oplossing van n-hexylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof gebruikt. Het aantalgemiddelde en het gewichtgemiddelde molecuulgewicht worden meestal aan de hand van de bij punt 1.2 vermelde vergelijkingen met behulp van een computer bepaald. Wanneer de digitalisering met de hand gebeurt, kan ASTM D 3536-91 (3) worden geraadpleegd.

De verdelingskromme moet in de vorm van een tabel of als figuur (al dan niet cumulatieve frequentieverdeling tegen log M) worden verstrekt. Bij de grafische weergave moet één log-interval van het molecuulgewicht normaal gesproken ongeveer 4 cm breed zijn en moet de top van de piek ongeveer 8 cm hoog zijn. Bij een cumulatieve frequentieverdeling moet het verschil op de y-as tussen 0 en 100 % ongeveer 10 cm zijn.

2.2. TESTVERSLAG

Het testverslag moet de volgende informatie bevatten:

2.2.1. **Onderzochte stof:**

— beschikbare informatie over de onderzochte stof (identiteit, additieven, verontreinigingen);

▼B

— beschrijving van de behandeling van het monster, opmerkingen, problemen.

2.2.2. **Apparatuur:**

— elutievloeistofreservoir, inert gas, ontgassing van de elutievloeistof, samenstelling van de elutievloeistof, verontreinigingen;

— pomp, pulsdemper, injectiesysteem;

— scheidingskolommen (fabrikant, alle informatie over de kenmerken van de kolommen zoals poriegrootte en aard van het pakkingsmateriaal, aantal, lengte en volgorde van de gebruikte kolommen);

— aantal theoretische schotels van de kolom (of de combinatie), scheidend vermogen (resolutie van het systeem);

— informatie over de symmetrie van de pieken;

— kolomtemperatuur, aard van de temperatuurregeling;

— detector (meetprincipe, type, volume van de meetcel);

— stromingsmeter, indien gebruikt (fabrikant, meetprincipe);

— systeem voor gegevensregistratie en -verwerking (hardware en software).

2.2.3. **Kalibratie van het systeem:**

— gedetailleerde beschrijving van de methode die wordt gebruikt om de kalibratiecurve samen te stellen;

— informatie over de kwaliteitscriteria voor deze methode (bijvoorbeeld correlatiecoëfficiënt of som van de kwadraten).

— informatie over alle extrapolaties, veronderstellingen en benaderingen tijdens de experimentele procedure en de beoordeling en verwerking van gegevens.

— alle metingen die voor de samenstelling van de kalibratiecurve worden gebruik, moeten in een tabel worden opgenomen waarbij voor elk kalibratiepunt de volgende informatie moet worden vermeld:

  — naam van het monster;

  — fabrikant van het monster;

  — normale waarden van M_p, M_n, M_w en M_w/M_n, zoals deze door de fabrikant zijn verstrekt of door latere metingen zijn bepaald, alsmede gedetailleerde informatie over de bepalingsmethode;

  — geïnjecteerd volume en concentratie daarin;

▼B

— voor kalibratie gebruikte waarde van M_p;

— bij de top van de piek gemeten elutievolume of gecorrigeerde retentietijd;

— bij de top van de piek berekende M_p;

— procentuele fout van berekende M_p en de kalibratiewaarde.

2.2.4. **Evaluatie:**

— evaluatie op basis van tijd: methoden die worden gebruikt om de vereiste reproduceerbaarheid te waarborgen (correctiemethode, interne standaard enz.);

— informatie over de keuze voor elutievolume of retentietijd als basis voor de evaluatie;

— informatie over de grenzen van de evaluatie als een piek niet volledig wordt geanalyseerd;

— beschrijving van afvlakmethoden indien deze zijn gebruikt;

— procedures voor de bereiding en voorbehandeling van het monster;

— eventuele aanwezigheid van onopgeloste deeltjes;

— geïnjecteerd volume (µl) en concentratie daarin (mg/ml);

— bespreking van effecten die tot afwijkingen van het ideale GPC-profiel leiden;

— gedetailleerde beschrijving van alle wijzigingen in de testprocedures;

— gedetailleerde informatie over de foutintervallen;

— alle andere informatie en opmerkingen die relevant zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3. **REFERENTIES**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

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

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Aanhangsel

Voorbeelden van andere methoden voor de bepaling van het aantalgemiddelde molecuulgewicht (M_n) van polymeren

Gelpermeatiechromatografie (GPC) geniet de voorkeur als methode voor de bepaling van M_n, vooral wanneer er verschillende standaards beschikbaar zijn waarvan de structuur vergelijkbaar is met die van het polymeer. Wanneer het gebruik van GPC praktische problemen oplevert of reeds wordt vermoed dat de stof niet aan een criterium voor M_n in de regelgeving zal voldoen (en dit vermoeden moet worden bevestigd), zijn echter andere methoden beschikbaar:

1. **Gebruik van colligatieve eigenschappen**

1.1. *Ebullioscopie/Cryoscopie:*

Hierbij wordt de kookpuntverhoging (ebullioscopie) of vriespuntverlaging (cryoscopie) van een oplosmiddel na toevoeging van het polymeer gemeten. Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van het feit dat het effect van het opgeloste polymeer op het kookpunt/vriespunt van de vloeistof afhankelijk is van het molecuulgewicht van het polymeer (1)(2).

Toepasbaarheid: $M_n < 20\,000$.

1.2. *Dampspanningsverlaging:*

Hierbij wordt de dampspanning van een gekozen referentievloeistof voor en na toevoeging van bekende hoeveelheden polymeer gemeten (1)(2).

Toepasbaarheid: $M_n < 20\,000$ (theoretisch; in de praktijk is de bruikbaarheid van deze methode beperkt).

1.3. *Membraan-osmometrie:*

Berust op osmose, d.w.z. de natuurlijke neiging van moleculen van oplosmiddelen om zich via een semipermeabel membraan van een verdunde naar een geconcentreerde oplossing te verplaatsen om een evenwicht te bereiken. In dit geval bevat de verdunde oplossing geen polymeer en de geconcentreerde oplossing wel. Doordat het oplosmiddel door het membraan wordt getrokken, ontstaat een drukverschil dat afhankelijk is van de concentratie en het molecuulgewicht van het polymeer (1)(3)(4).

Toepasbaarheid: $20\,000 < M_n < 200\,000$.

1.4. *Dampfase-osmometrie:*

Hierbij wordt de verdampingssnelheid van een zuivere oplosmiddellaërosol vergeleken met die van ten minste drie aerosolen die verschillende concentraties polymeer bevatten (1)(5)(6).

Toepasbaarheid: M_n <20 000.

▼B

2. **Eindgroepanalyse**

Om deze methode te kunnen gebruiken is kennis nodig omtrent zowel de algehele structuur van het polymeer als de aard van de eindgroepen die de ketens afsluiten (deze moeten met behulp van bijvoorbeeld NMR of titratie/derivatisering van de hoofdketen kunnen worden onderscheiden). Wanneer de concentratie van de eindgroepen in het polymeermolecuul wordt bepaald, kan op grond daarvan een waarde voor het molecuulgewicht worden afgeleid (7)(8)(9).

Toepasbaarheid: M_n tot 50 000 (met afnemende betrouwbaarheid).

Referenties

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn, John Wiley, New York.

(2) Glover, CA, (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr.ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

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

(7) Schröder, E., Muller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **GEHALTE VAN POLYMEREN AAN LAAGMOLECULAIRE BESTANDDELEN**

1. **METHODE**

Deze methode voor gelpermeatiechromatografie is overgenomen van TG 119 van de OESO (1996). Voor de fundamentele beginselen en nadere technische informatie wordt verwezen naar de referenties.

1.1. INLEIDING

Aangezien de eigenschappen van polymeren zo sterk uiteenlopen, is het onmogelijk een enkele methode te beschrijven waarin voor alle mogelijkheden en specifieke gevallen bij de scheiding van polymeren exact de omstandigheden voor scheiding en evaluatie worden aangegeven. Met name complexe polymeersystemen komen vaak niet in aanmerking voor gelpermeatiechromatografie (GPC). Wanneer GPC niet uitvoerbaar is, kan het molecuulgewicht met behulp van andere methoden worden bepaald (zie bijlage). In dat geval moet een gedetailleerde beschrijving van en een volledige motivering voor de gebruikte methode worden gegeven.

De hier beschreven methode is gebaseerd op de norm DIN 55672 (1). Deze norm bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop de experimenten moeten worden uitgevoerd en de gegevens moeten worden geëvalueerd. Wanneer veranderingen in de wijze van uitvoering nodig zijn, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Ook andere normen kunnen worden gebruikt, mits de referenties volledig worden vermeld. In de beschreven methode worden voor de kalibratie polystyreenmonsters met een bekende polydispersiteit gebruikt en wijzigingen kunnen nodig zijn om de methode geschikt te maken voor bepaalde polymeren zoals in water oplosbare polymeren en vertakte polymeren met een lange keten.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Een laag molecuulgewicht wordt hier willekeurig gedefinieerd als een molecuulgewicht beneden 1 000 dalton.

Het aantalgemiddelde molecuulgewicht (M_n) en het gewichtgemiddelde molecuulgewicht (M_w) worden bepaald met behulp van de volgende vergelijkingen:

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

waarbij:

H_i = de hoogte van het detectorsignaal vanaf de basislijn bij het retentievolume V_i;

M_i = het molecuulgewicht van de polymeerfractie bij het retentievolume V_i;

n = het aantal meetpunten.

De verhouding M_w/M_n is de breedte van de molecuulgewichtsverdeling, die een maat is voor de dispersiteit van het systeem.

▼B

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Aangezien GPC een relatieve methode is, moet het systeem worden gekalibreerd. Als standaard worden normaal gesproken fijn verdeelde lineair opgebouwde polystyreenmonsters gebruikt met bekende gemiddelde molecuulgewichten (M_n en M_w) en een bekende molecuulgewichtsverdeling. De kalibratiecurve kan alleen voor de bepaling van het molecuulgewicht van het onbekende monster worden gebruikt als de omstandigheden voor de scheiding van het monster en de standaards op identieke wijze zijn gekozen.

Een tijdens een bepaald experiment vastgesteld verband tussen het molecuulgewicht en het elutievolume is alleen onder de specifieke omstandigheden van dat experiment geldig. Daarbij gaat het vooral om de temperatuur, het oplosmiddel (of het oplosmiddelenmengsel), de omstandigheden tijdens chromatografie en de kolom of het kolomsysteem waarop de scheiding is uitgevoerd.

Een op deze manier bepaald molecuulgewicht van het monster is relatief en wordt beschreven als een „polystyreen-equivalent molecuulgewicht". Dit houdt in dat het molecuulgewicht afhankelijk van de structurele en chemische verschillen tussen het monster en de standaard in meer of mindere mate van de absolute waarde kan afwijken. Als een andere standaard wordt gebruikt, zoals polyethyleenglycol, polyethyleenoxide, polymethylmethacrylaat of polyacrylzuur, moet de reden daarvan worden vermeld.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Zowel de molecuulgewichtsverdeling van het monster als het gemiddelde molecuulgewicht (M_n of M_w) kan met behulp van GPC worden bepaald. GPC is een speciaal soort vloeistofchromatografie waarbij het monster aan de hand van het hydrodynamische volume van de verschillende bestanddelen wordt gescheiden (2).

De scheiding voltrekt zich tijdens de passage van het monster door een kolom die met een poreus materiaal, meestal een organische gel, is gevuld. Kleine moleculen kunnen de poriën binnendringen, terwijl grote moleculen dit niet kunnen. Grote moleculen volgen dan ook een kortere weg en worden het eerste geëlueerd. Middelgrote moleculen kunnen sommige poriën binnendringen en worden later geëlueerd. De kleinste moleculen, waarvan de gemiddelde hydrodynamische straal kleiner is dan de poriën van de gel, kunnen alle poriën binnendringen. Deze worden het laatst geëlueerd.

In het ideale geval wordt de scheiding uitsluitend door de grootte van het molecuul bepaald, maar enige storing door absorptie-effecten is in de praktijk vrijwel niet te voorkomen. Een ongelijkmatige pakking van de kolom en dode ruimten kunnen de situatie nog ongunstiger maken (2).

Detectie gebeurt aan de hand van bijvoorbeeld de brekingsindex of uv-absorptie en levert een eenvoudige verdelingskromme op. Om echte waarden voor het molecuulgewicht aan de kromme te kunnen toekennen, moet de kolom echter worden gekalibreerd met behulp van polymeren met een bekend molecuulgewicht en liefst een in grote lijnen vergelijkbare structuur, bijvoorbeeld een aantal polystyreenstandaards. Meestal levert dit een gausscurve op, soms met een kleine staart aan de kant van de lage molecuulgewichten, waarbij op de verticale as de geëlueerde hoeveelheid in gewicht wordt uitgezet en op de horizontale as de logaritme van het molecuulgewicht.

▼B

Het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen wordt uit deze kromme afgeleid. De kalibratie kan alleen nauwkeurig zijn als de respons van de laagmoleculaire bestanddelen per massa-eenheid equivalent is met die van het polymeer als geheel.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking) van het elutievolume moet beter zijn dan 0,3 %. Indien een chromatogram tijdafhankelijk wordt geëvalueerd en niet aan dit criterium voldoet, moet door correctie met behulp van een interne standaard de vereiste herhaalbaarheid van de analyse worden gewaarborgd (1). De polydispersiteit is afhankelijk van het molecuulgewicht van de standaard. Normale waarden voor polystyreenstandaards zijn:

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

(M_p is het molecuulewicht van de standaard bij de top van de piek.)

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Bereiding van de polystyreenstandaardoplossingen**

De polystyreenstandaard wordt opgelost door deze zorgvuldig te mengen in de gekozen elutievloeistof. Bij de bereiding van de oplossingen moet rekening worden gehouden met de aanbevelingen van de fabrikant.

De concentratie van de standaardoplossingen wordt bepaald aan de hand van verschillende factoren, zoals het geïnjecteerde volume, de viscositeit van de oplossing en de gevoeligheid van de detector. Het maximale geïnjecteerde volume moet aan de lengte van de kolom worden aangepast om overlading te voorkomen. Voor een scheiding met behulp van GPC over een kolom van 30 cm × 7,8 mm wordt meestal een volume van 40 tot 100 µl geïnjecteerd. Grotere volumes zijn mogelijk, maar niet groter dan 250 µl. De optimale verhouding tussen het geïnjecteerde volume en de concentratie moet vóór de kalibratie van de kolom worden bepaald.

1.6.2. **Bereiding van de monsteroplossing**

In beginsel gelden voor de bereiding van de monsteroplossingen dezelfde eisen. Het monster wordt door zorgvuldig schudden opgelost in een geschikt oplosmiddel, bijvoorbeeld tetrahydrofuraan (THF). Het mag in geen geval met behulp van een ultrasoon bad worden opgelost. Indien nodig wordt de monsteroplossing gezuiverd over een membraanfilter met een poriegrootte tussen 0,2 en 2 µm.

Indien de oplossing onopgeloste deeltjes bevat, moet dit in het eindverslag worden vermeld aangezien deze door hoogmoleculaire bestanddelen kunnen ontstaan. Er moet een adequate methode worden gebruikt om het gewichtspercentage van de onopgeloste deeltjes te bepalen. De oplossingen moeten binnen 24 uur worden gebruikt.

▼B

1.6.3. **Correctie voor het gehalte aan verontreinigingen en additieven**

Meestal moet het gehalte aan bestanddelen met M < 1 000 worden gecorrigeerd voor de bijdrage van niet polymeerspecifieke componenten (zoals verontreinigingen en/of additieven), tenzij het gemeten gehalte al lager is dan 1 %. Dit gebeurt door een directe analyse van de polymeeroplossing of van het GPC-eluaat.

Wanneer het eluaat na de passage door de kolom te verdund is om nog te worden geanalyseerd, moet het worden geconcentreerd. Daarbij kan het nodig zijn het eluaat droog te dampen en vervolgens weer op te lossen. Het concentreren van het eluaat moet onder zodanige omstandigheden gebeuren dat wordt gewaarborgd dat er geen veranderingen in het eluaat optreden. De behandeling van het eluaat na GPC is afhankelijk van de analysemethode die voor de kwantitatieve bepaling wordt gebruikt.

1.6.4. **Apparatuur**

De GPC-apparatuur bestaat uit de volgende onderdelen:

— oplosmiddelreservoir

— ontgasser (indien van toepassing)

— pomp

— pulsdemper (indien van toepassing)

— injectiesysteem

— chromatografiekolommen

— detector

— stromingsmeter (indien van toepassing)

— gegevensrecorder/verwerker

— afvalreservoir

Er moet voor worden gezorgd dat het GPC-systeem niet met de gebruikte oplosmiddelen reageert (bijvoorbeeld door stalen capillairen te gebruiken voor THF-opIossingen).

1.6.5. **Injectie- en oplosmiddeltoevoersysteem**

Een bekend volume van de monsteroplossing wordt met behulp van een autosampler of manueel in een scherp begrensde zone op de kolom gebracht. Wanneer bij manueel opbrengen de plunjer van de injectiespuit te snel wordt ingedrukt of teruggetrokken, kan dit tot veranderingen in de waargenomen molecuulgewichtsverdeling leiden. Het oplosmiddeltoevoersysteem moet voor zover mogelijk pulsatievrij zijn en liefst een pulsdemper bevatten. De stroomsnelheid moet ongeveer 1 ml/min zijn.

1.6.6. **Kolom**

Afhankelijk van het monster wordt het polymeer gekarakteriseerd met behulp van één kolom of een aantal in serie gekoppelde kolommen. In de handel zijn verschillende poreuze pakkingsmaterialen met bekende eigenschappen (bijvoorbeeld poriegrootte en exclusiegrens) verkrijgbaar. De keuze van de gel en de lengte van de kolom wordt bepaald door zowel de eigenschappen van het monster (hydrodynamisch volume, molecuulgewichtsverdeling) als de specifieke omstandigheden voor de scheiding zoals oplosmiddel, temperatuur en stroomsnelheid (1)(2)(3).

▼B

1.6.7. **Theoretische schotels**

De voor de scheiding gebruikte kolom of combinatie van kolommen moet worden gekarakteriseerd met behulp van het aantal theoretische schotels. Daartoe moet, indien THF als elutievloeistof wordt gebruikt, een oplossing van ethylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof op een kolom met een bekende lengte worden gebracht. Het aantal theoretische schotels wordt berekend met de volgende vergelijking:

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

waarbij:

N = het aantal theoretische schotels;

V_e = het elutievolume bij de top van de piek;

W = de piekbreedte aan de basis;

$W_{1/2}$ = de piekbreedte op halve hoogte.

1.6.8. **Scheidend vermogen**

Naast het aantal theoretische schotels, een grootheid die bepalend is voor de bandbreedte, speelt ook het scheidend vermogen, dat wordt bepaald door de helling van de kalibratiecurve, een rol. Het scheidend vermogen van een kolom kan als volgt worden bepaald:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{oppervlak doorsnede van de kolom}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

waarbij:

$V_{e,\ Mr}$ = het elutievolume voor polystyreen met molecuulgewicht M_x;

$V_{e,(10.Mr)}$ = het elutievolume voor polystyreen met een tien keer zo hoog molecuulgewicht.

De resolutie van het systeem wordt meestal als volgt gedefinieerd:

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

waarbij:

V_{e1}, V_{e2} = het elutievolume van de twee polystyreenstandaards bij de top van de piek;

W_1, W_2 = de piekbreedte aan de basis;

M_1, M_2 = het molecuulgewicht bij de top van de pieken (deze moeten een factor 10 van elkaar verschillen).

De R-waarde voor het kolomsysteem moet groter zijn dan 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Oplosmiddelen**

Alle oplosmiddelen moeten zeer zuiver zijn (THF wordt gebruikt met een zuiverheid van 99,5 %). Het oplosmiddelreservoir (indien nodig onder inert gas) moet groot genoeg zijn voor de kalibratie van de kolom en de analyse van verschillende monsters. Het oplosmiddel moet worden ontgast voordat het via de pomp naar de kolom wordt getransporteerd.

1.6.10. **Temperatuurbewaking**

De temperatuur van de kritische interne onderdelen (injectieblok, kolommen, detector en leidingen) moet constant zijn en in overeenstemming zijn met het gekozen oplosmiddel.

1.6.11. **Detector**

De detector is bedoeld om de concentratie van het monster in het eluaat uit de kolom kwantitatief te registreren. Om een onnodige verbreding van de pieken te voorkomen, moet het volume van de meetcel van de detector zo klein mogelijk worden gehouden. Het volume mag niet groter zijn dan 10 µl, behalve voor lichtverstrooiings- en viscositeitsdetectoren. Meestal wordt voor de detectie differentiële refractometrie gebruikt. Indien dit in verband met de specifieke eigenschappen van het monster of de elutievloeistof nodig is, kunnen echter ook andere soorten detectors worden gebruikt, zoals UV/VIS, IR of viscositeitsdetectoren.

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. GEGEVENS

Voor de gedetailleerde beoordelingscriteria en voor de eisen ten aanzien van het verzamelen en bewerken van de gegevens wordt verwezen naar de DIN-norm (1).

Voor elk monster moeten twee onafhankelijke experimenten worden uitgevoerd die los van elkaar moeten worden geanalyseerd. Het is van essentieel belang dat in alle gevallen onder dezelfde omstandigheden als de bepaling bij het monster ook een blancobepaling wordt uitgevoerd.

Er moet expliciet worden vermeld dat de gemeten waarden relatief zijn en worden uitgedrukt in equivalent-molecuulgewicht van de gebruikte standaard.

Na de bepaling van de retentievolumes of de retentietijden (eventueel gecorrigeerd met behulp van een interne standaard) wordt de logaritmische waarde van M (waarbij M de top van de piek van de kalibratiestandaard is) tegen een van deze grootheden uitgezet. Per log-interval zijn minimaal twee kalibratiepunten nodig en voor de curve als geheel minimaal vijf meetpunten. Het geraamde molecuulgewicht van het monster moet tussen het eerste en het laatste meetpunt liggen. Voor de bepaling van het laagste molecuulgewicht van de kalibratiecurve wordt een oplossing van n-hexylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof gebruikt. Het gedeelte van de curve dat overeenkomt met molecuul-gewichten lager dan 1 000 wordt indien nodig gecorrigeerd voor verontreinigingen en additieven. De evaluatie van de elutiecurves gebeurt meestal met behulp van elektronische gegevensverwerking. Wanneer de digitalisering met de hand gebeurt, kan ASTM D 3536-91 (3) worden geraadpleegd.

▼B

Als er onoplosbaar polymeer op de kolom achterblijft, zal dit waarschijnlijk een hoger molecuulgewicht hebben dan de opgeloste fractie en als daar geen rekening mee wordt gehouden, zou het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen waarschijnlijk te hoog uitvallen. In de bijlage worden richtsnoeren gegeven om het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen te corrigeren voor de aanwezigheid van onoplosbaar polymeer.

De verdelingskromme moet in de vorm van een tabel of als figuur (al dan niet cumulatieve frequentieverdeling tegen log M) worden verstrekt. Bij de grafische weergave moet één log-interval van het molecuulgewicht normaal gesproken ongeveer 4 cm breed zijn en moet de top van de piek ongeveer 8 cm hoog zijn. Bij een cumulatieve frequentieverdeling moet het verschil op de y-as tussen 0 en 100 % ongeveer 10 cm zijn.

2.2. TESTVERSLAG

Het testverslag moet de volgende informatie bevatten:

2.2.1. **Onderzochte stof:**

— beschikbare informatie over de onderzochte stof (identiteit, additieven, verontreinigingen);

— beschrijving van de behandeling van het monster, opmerkingen, problemen.

2.2.2. **Apparatuur:**

— elutievloeistofreservoir, inert gas, ontgassing van de elutievloeistof, samenstelling van de elutievloeistof, verontreinigingen;

— pomp, pulsdemper, injectiesysteem;

— scheidingskolommen (fabrikant, alle informatie over de kenmerken van de kolommen zoals poriegrootte en aard van het pakkingsmateriaal, aantal, lengte en volgorde van de gebruikte kolommen);

— aantal theoretische schotels van de kolom (of de combinatie), scheidend vermogen (resolutie van het systeem);

— informatie over de symmetrie van de pieken;

— kolomtemperatuur, aard van de temperatuurregeling;

— detector (meetprincipe, type, volume van de meetcel);

— stromingsmeter, indien gebruikt (fabrikant, meetprincipe);

— systeem voor gegevensregistratie en -verwerking (hardware en software).

2.2.3. **Kalibratie van het systeem:**

— gedetailleerde beschrijving van de methode die wordt gebruikt om de kalibratiecurve samen te stellen;

▼B

— informatie over de kwaliteitscriteria voor deze methode (bijvoorbeeld correlatiecoëfficiënt of som van de kwadraten);

— informatie over alle extrapolaties, veronderstellingen en benaderingen tijdens de experimentele procedure en de beoordeling en verwerking van gegevens;

— alle metingen die voor de samenstelling van de kalibratiecurve worden gebruikt, moeten in een tabel worden opgenomen waarbij voor elk kalibratiepunt de volgende informatie moet worden vermeld:

  — naam van het monster;

  — fabrikant van het monster;

  — normale waarden van M_p, M_n, M_w en M_w/M_n, zoals deze door de fabrikant zijn verstrekt of door latere metingen zijn bepaald, alsmede gedetailleerde informatie over de bepalingsmethode;

  — geïnjecteerd volume en concentratie daarin;

  — voor kalibratie gebruikte waarde van M;

  — bij de top van de piek gemeten elutievolume of gecorrigeerde retentietijd;

  — bij de top van de piek berekende M_p;

  — procentuele fout van berekende M en de kalibratiewaarde.

2.2.4. **Informatie over het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen:**

— beschrijving van de bij de analyse gebruikte methoden en de wijze waarop de experimenten zijn uitgevoerd;

— informatie over het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen (als gewichtspercentage van het totale monster);

— informatie over het gehalte aan verontreinigingen, additieven en andere niet-polymeerbestanddelen (als gewichtspercentage van het totale monster).

2.2.5. **Evaluatie:**

— evaluatie op basis van tijd: alle methoden die worden gebruikt om de vereiste reproduceerbaarheid te waarborgen (correctiemethode, interne standaard enz.);

— informatie over de keuze voor elutievolume of retentietijd als basis voor de evaluatie;

— informatie over de grenzen van de evaluatie als een piek niet volledig wordt geanalyseerd;

— beschrijving van afvlakmethoden indien deze zijn gebruikt;

— procedures voor de bereiding en voorbehandeling van het monster;

— eventuele aanwezigheid van onopgeloste deeltjes;

▼B

— geïnjecteerd volume (µl) en concentratie daarin (mg/ml);

— bespreking van effecten die tot afwijkingen van het ideale GPC-profiel leiden;

— gedetailleerde beschrijving van alle wijzigingen in de testprocedures;

— gedetailleerde informatie over de foutintervallen;

— alle andere informatie en opmerkingen die relevant zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3. **REFERENTIES**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

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

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography — GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polysryrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Aanhangsel

Richtsnoeren om het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen te corrigeren voor de aanwezigheid van onoplosbaar polymeer

Wanneer een monster onoplosbaar polymeer bevat, gaat tijdens de GPC-analyse massa verloren. Het onoplosbare polymeer blijft irreversibel op de kolom of het monsterfilter achter, terwijl het oplosbare gedeelte van het monster door de kolom loopt. Wanneer de stijging van de brekingsindex (dn/dc) van het polymeer kan worden geschat of gemeten, kan de massa van de hoeveelheid monster die op de kolom verloren is gegaan, worden geschat. In dat geval wordt de correctie bepaald met behulp van een externe kalibratie met standaardmaterialen met een bekende concentratie en dn/dc om de respons van de refractometer te kalibreren. In het hier gegeven voorbeeld wordt een PMM-standaard (polymethylmethacrylaat) gebruikt.

Bij de externe kalibratie voor de analyse van acrylpolymeren wordt een PMM-standaard met een bekende concentratie in tetrahydrofuraan met behulp van GPC geanalyseerd en worden de resultaten gebruikt voor de bepaling van de refractometerconstante volgens de volgende vergelijking:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

waarbij

K = de refractometerconstante (in microvoltseconde/ml);

R = de respons van de PMM-standaard (in microvoltseconde);

C = de concentratie van de PMM-standaard (in mg/ml);

V = het geïnjecteerde volume (in ml);

dn/dc = de stijging van de brekingsindex voor PMM in tetrahydrofuraan (in ml/mg).

Normale waarden voor een PMM-standaard zijn:

R = 2 937 891;

C = 1,07 mg/ml;

V = 0,1 ml;

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Met de aldus berekende waarde van K ($3{,}05 \times 10^{11}$) wordt vervolgens de theoretische respons van de detector berekend als het geïnjecteerde polymeer voor 100 % via de detector zou zijn geëlueerd.

▼B

A.20. **OPLOS/EXTRACTIEGEDRAG VAN POLYMEREN IN WATER**

1. **METHODE**

De hier beschreven methode is overgenomen van de herziene versie van TG 120 van de OESO (1997). Voor nadere technische informatie wordt verwezen naar referentie (1).

1.1. INLEIDING

Voor bepaalde polymeren (bijvoorbeeld emulsiepolymeren) moeten eerst voorbereidende werkzaamheden worden uitgevoerd voordat de hier beschreven methode kan worden toegepast. De methode kan niet worden gebruikt voor vloeibare polymeren en voor polymeren die onder de testomstandigheden met water reageren.

Wanneer de methode niet geschikt of niet bruikbaar is, kan het oplos/extractiegedrag met behulp van andere methoden worden onderzocht. In dat geval moet een gedetailleerde beschrijving van en een volledige motivering voor de gebruikte methode worden gegeven.

1.2. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Het oplos/extractiegedrag van polymeren in waterig milieu wordt bepaald met behulp van de kolfmethode (zie methode A.6: Oplosbaarheid in water, methode met de kolf) waarin onderstaande wijzigingen worden aangebracht.

1.4. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Apparatuur**

Voor deze methode is de volgende apparatuur nodig:

— een vergruizer, bijvoorbeeld een maalapparaat, om deeltjes met een bekende grootte te vervaardigen;

— een schudapparaat met regelbare temperatuur;

— een membraanfiltersysteem;

— adequate analyseapparatuur;

— gestandaardiseerde zeven.

1.5.2. **Monstervoorbereiding**

Een representatief monster moet eerst worden vergruisd tot deeltjes met een grootte van 0,125 tot 0,25 mm (gebruik hierbij geschikte zeven). Voor de stabiliteit van het monster of voor het maalprocedé kan koeling nodig zijn. Rubberachtige materialen kunnen bij de temperatuur van vloeibare stikstof worden vergruisd (1).

Als het niet mogelijk is een fractie met de vereiste deeltjesgrootte te verkrijgen, moet worden getracht de deeltjesgrootte zoveel mogelijk te verlagen en moet het resultaat in het verslag worden vermeld. Tevens moet in het verslag worden vermeld hoe het vergruisde monster voor de test is bewaard.

▼B

1.5.3. **Procedure**

In drie kolven met een glazenstop wordt telkens 10 g van de te onderzoeken stof afgewogen. Vervolgens wordt aan elke kolf 1 000 ml water toegevoegd. Indien het niet mogelijk blijkt met een hoeveelheid van 10 g polymeer te werken, moet de eerst hogere hoeveelheid worden gebruikt waarmee wel kan worden gewerkt en moet de hoeveelheid water dienovereenkomstig worden aangepast.

De kolven worden goed afgesloten en vervolgens bij 20 °C geschud. Hiervoor wordt een schuld- of roermachine gebruikt waarmee bij constante temperatuur kan worden gewerkt. Na 24 uur wordt de inhoud van elke kolf gecentrifugeerd of gefiltreerd en wordt de polymeerconcentratie in de heldere waterige fase met behulp van een geschikte analysemethode bepaald. Indien er geen geschikte analysemethoden voor de waterige fase beschikbaar zijn, kan de totale oplosbaarheid/extraheerbaarheid op basis van het drooggewicht van het residu op het filter of het gecentrifugeerde neerslag worden bepaald.

Meestal moet bij de kwantitatieve bepaling onderscheid worden gemaakt tussen de verontreinigingen en additieven enerzijds en het polymeer met een laag molecuulgewicht anderzijds. Bij een gravimetrische bepaling is het ook belangrijk dat er een blancobepaling zonder te onderzoeken stof wordt uitgevoerd om rekening te kunnen houden met residuen ten gevolge van de experimentele procedure.

Het oplos/extractiegedrag van polymeren in water bij 37 °C bij pH 2 en pH 9 kan op dezelfde wijze worden bepaald zoals beschreven voor de uitvoering van het experiment bij 20 °C. De pH kan worden aangepast door de toevoeging van geschikte bufferoplossingen of zuren of basen als zoutzuur, azijnzuur, natrium- of kahumhydroxide (p.a.) of NH_3.

Afhankelijk van de gebruikte analysemethode moet de test een- of tweemaal worden uitgevoerd. Wanneer voldoende specifieke methoden beschikbaar zijn voor een directe analyse van de polymeercomponent in de waterige fase, moet één in het voorgaande beschreven test voldoende zijn. Wanneer dergelijke methoden echter niet beschikbaar zijn en het oplos/extractiegedrag van de polymeer uitsluitend wordt bepaald via een indirecte analyse waarbij alleen het totale gehalte aan organische koolstof (TOC) van het waterig extract wordt bepaald, moet de test tweemaal worden uitgevoerd. Deze tweede test moet ook in triplo gebeuren met polymeermonsters die tien keer zo klein zijn als bij de eerste test en dezelfde hoeveelheden water.

1.5.4. **Analyse**

1.5.4.1. *Met één monsterhoeveelheid uitgevoerde test*

Het is mogelijk dat er methoden beschikbaar zijn voor een directe analyse van de polymeercomponent in de waterige fase. Als dit niet het geval is, kan worden overwogen een indirecte analyse van opgeloste/geëxtraheerde polymeercomponenten uit te voeren, waarbij het totale gehalte aan oplosbaar materiaal wordt bepaald en wordt gecorrigeerd voor componenten die niet polymeerspecifiek zijn.

Een analyse van de totale hoeveelheid polymeer in de waterige fase is mogelijk:

met behulp van een voldoende gevoelige methode zoals:

— TOC met ontleding door persulfaat of dichromaat tot CO_2, gevolgd door bepaling met behulp van IR of chemische analyse;

▼B

— atoomabsorptiespectrometrie (AAS) of emissiespectrometrie met inductief gekoppeld plasma (ICP) voor polymeren die silicium of metaal bevatten;

— Uv-absorptie of spectrofluorimetrie voor arylpolymeren,

— LC/MS voor monsters met een laag molecuulgewicht;

door vacuümverdampmg van het waterig extract en analyse van het droge residu met behulp van spectroscopie (bijvoorbeeld IR of uv) of AAS/ICP.

Als een analyse van de waterige fase als zodanig niet uitvoerbaar is, moet het waterige extract worden geëxtraheerd met een niet met water mengbaar organisch oplosmiddel, bijvoorbeeld een gechloreerde koolwaterstof. Vervolgens wordt het oplosmiddel verdampt en wordt het polymeergehalte van het residu volgens een van bovenstaande analysemethoden bepaald. Om de mate van oplossing/extractie van het polymeer zelf te bepalen, moeten componenten van dit residu waarvan wordt vastgesteld dat ze verontreinigingen of additieven zijn, in mindering worden gebracht.

Wanneer betrekkelijk grote hoeveelheden van dergelijke materialen aanwezig zijn, kan het nodig zijn het residu met behulp van bijvoorbeeld HPLC of GC te analyseren om onderscheid te maken tussen de verontreinigingen en het monomeer en van het monomeer afgeleide stoffen zodat het werkelijke gehalte aan laatstgenoemde stoffen kan worden bepaald.

In sommige gevallen kan het voldoende zijn het organische oplosmiddel te verdampen en het droge residu te wegen.

1.5.4.2. *Met twee verschillende monsterhoeveelheden uitgevoerde test*

Alle waterige extracten worden op TOC geanalyseerd.

Bij het niet-opgeloste/niet-geëxtraheerde deel van het monster wordt een gravimetrische bepaling uitgevoerd. Als na centrifugeren of filtreren van de inhoud van de kolf polymeerresten op de rand van de kolf zijn achtergebleven, moet de kolf met het filtraat worden gespoeld totdat alle zichtbare resten zijn verdwenen. Vervolgens wordt het filtraat opnieuw gecentrifugeerd of gefiltreerd. De op de filter of in de centrifugebuis achtergebleven residuen worden bij 40 ^{o}C onder vacuüm gedroogd tot constant gewicht en vervolgens gewogen.

2. **GEGEVENS**

2.1. MET ÉÉN MONSTERHOEVEELHEID UITGEVOERDE TEST

De aparte resultaten voor de drie kolven en de gemiddelde waarden moeten worden vermeld, uitgedrukt in massa-eenheden per volume oplossing (meestal mg/l) of massa-eenheden per massa polymeermonster (meestal mg/g). Daarnaast moet het gewichtsverlies van het monster worden vermeld (berekend als het gewicht van de opgeloste stof gedeeld door het gewicht van het oorspronkelijke monster). Bovendien moet de relatieve standaardafwijking worden berekend. Deze gegevens moeten worden vermeld voor de stof als geheel (polymeer + essentiële additieven enz.) en voor het zuivere polymeer (d.w.z. nadat de bijdrage van dergelijke additieven is afgetrokken).

▼B

2.2. MET TWEE VERSCHILLENDE MONSTERHOEVEELHEDEN UITGEVOERDE TEST

Voor elk waterig extract van de twee in triplo uitgevoerde experimenten dient de TOC-waarde te worden vermeld en daarnaast de gemiddelde waarde voor elk experiment. Deze gegevens dienen te worden uitgedrukt in massa-eenheden per volume oplossing (meestal mg C/l) en massa-eenheden per gewicht van het oorspronkelijke monster (meestal mgC/g).

Als er geen verschil is tussen de resultaten met de hoge en de lage monster/waterverhouding, kan dit erop wijzen dat alle extraheerbare componenten inderdaad zijn geëxtraheerd. In dat geval zou een directe analyse normaal gesproken niet nodig zijn.

Voor elk residu moet het gewicht worden vermeld en worden uitgedrukt als percentage van het oorspronkelijke gewicht van het monster. Per experiment dient het gemiddelde te worden berekend. Het percentage oplosbaar en extraheerbaar materiaal in het oorspronkelijke monster wordt berekend door het gevonden percentage van 100 % af te trekken.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

3.1.1. **Onderzochte stof:**

— beschikbare informatie over de onderzochte stof (identiteit, additieven, verontreinigingen, gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen).

3.1.2. **Testomstandigheden:**

— beschrijving van de gevolgde procedures en de testomstandigheden;

— beschrijving van de analyse- en detectiemethoden.

3.1.3. **Resultaten**

— de oplosbaarheid/extraheerbaarheid in mg/l; aparte resultaten bij de verschillende oplossingen en gemiddelde waarden, gesplitst in polymeergehalte en verontreinigingen, additieven enz.;

— oplosbaarheid/extraheerbaarheid in mg/g polymeer;

— TOC-waarden van de waterige extracten, gewicht van de opgeloste stof en berekende percentages, indien gemeten;

— de pH van elk monster;

— informatie over de blancobepalingen;

— indien nodig gegevens over de chemische instabiliteit van de onderzochte stof, zowel tijdens de testprocedure als tijdens de analyse;

— alle informatie die voor de interpretatie van de resultaten van belang is.

4. **REFERENTIE**

(1) DIN 53733 (1976), Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **OXIDERENDE EIGENSCHAPPEN (VLOEISTOFFEN)**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Deze testmethode is bedoeld om te meten in hoeverre een vloeistof de verbrandingssnelheid of verbrandingsintensiteit van een brandbare stof kan verhogen of met een brandbare stof een mengsel kan vormen dat spontaan ontbrandt wanneer beide stoffen grondig worden gemengd. De test is gebaseerd op de test voor oxiderende vloeistoffen van de VN (1) en is hieraan gelijkwaardig. Aangezien deze methode A.21 echter in de eerste plaats is bedoeld om te voldoen aan de vereisten van Verordening (EG) nr. 1907/2006, is slechts een vergelijking met één referentiestof vereist. Testen en vergelijken met bijkomende referentiestoffen kan nodig zijn wanneer het waarschijnlijk is dat de testresultaten voor andere doeleinden worden gebruikt ([1]).

Deze test hoeft niet te worden uitgevoerd wanneer op grond van de structuurformule met afdoende zekerheid kan worden vastgesteld dat de stof niet exotherm kan reageren met een brandbare stof.

Het is nuttig om, voordat deze test wordt uitgevoerd, te beschikken over gegevens over de mogelijke explosieve eigenschappen van de te onderzoeken stof.

Deze test is niet toepasbaar op vaste stoffen, gassen, explosieve of licht ontvlambare stoffen of organische peroxiden.

Deze test hoeft eventueel niet te worden uitgevoerd wanneer voor de te onderzoeken stof al resultaten beschikbaar zijn van de test voor oxiderende vloeistoffen van de VN (1).

1.2. DEFINITIES EN EEN HEDEN

Gemiddelde stijgtijd van de druk: het gemiddelde van de gemeten tijden waarin een mengsel tijdens de test een drukstijging veroorzaakt van 690 kPa tot 2 070 kPa boven de atmosferische druk.

1.3. REFERENTIESTOF

Als referentiestof wordt een waterige oplossing van 65 gewichtsprocent salpeterzuur (analytisch zuiver) gebruikt ([2]).

([1]) Bijvoorbeeld in het kader van de vervoersvoorschriften van de VN.
([2]) Het zuur moet vóór de test worden getitreerd om de concentratie ervan te bevestigen.

▼B

Wanneer de experimentator verwacht dat de testresultaten wellicht voor andere doeleinden worden gebruikt ([1]), kan het wenselijk zijn de test met bijkomende referentiestoffen uit te voeren ([2]).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De testvloeistof wordt in een massaverhouding van 1:1 met cellulosevezel gemengd en in een drukvat gebracht. Indien tijdens het mengen of vullen spontane ontbranding optreedt, is verder testen niet nodig.

Indien geen spontane ontbranding optreedt, wordt de volledige test uitgevoerd. Het mengsel wordt in een drukvat verwarmd en de gemiddelde tijd waarin de druk stijgt van 690 kPa tot 2 070 kPa boven de atmosferische druk, wordt gemeten. Deze tijd wordt vergeleken met de gemiddelde stijgtijd voor de druk voor het 1:1-mengsel van de referentiestof(fen) en cellulose.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

In een reeks van vijf proeven met dezelfde stof mag geen van de resultaten meer dan 30 % afwijken van het rekenkundige gemiddelde. Resultaten die meer dan 30 % van het gemiddelde afwijken, moeten worden verworpen, de meng- en vulprocedure moet worden verbeterd en de test moet worden herhaald.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.6.1. **Voorbereiding**

1.6.1.1. *Brandbare stof*

Als brandbare stof wordt droge cellulose met een vezellengte tussen 50 en 250 µm en een gemiddelde diameter van 25 µm gebruikt ([3]). Dit wordt gedurende 4 uur in een laag van ten hoogste 25 mm dik bij 105 °C gedroogd tot constant gewicht en in een exsiccator met droogmiddel bewaard totdat de vezel is afgekoeld en wordt gebruikt. Het watergehalte van de gedroogde cellulose moet minder zijn dan 0,5 % van de droge massa ([4]). Zo nodig dient de droogtijd te worden verlengd tot deze waarde is bereikt ([4]). Gedurende de hele test wordt een en dezelfde batch cellulose gebruikt ([5]).

([1]) Bijvoorbeeld in het kader van de vervoersvoorschriften van de VN.
([2]) In referentie 1 wordt bijvoorbeeld gebruikgemaakt van 50 gewichtprocent perchloorzuur en 40 gewichtprocent natriumchloraat.
([3]) Bijvoorbeeld Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, catalogue no 4021 050.
([4]) Bevestigd met (bijvoorbeeld) Karl-Fisher titratie.
([5]) Een andere mogelijkheid om dit watergehalte te bereiken is (bijv.) verhitting bij 105 °C onder vacuüm gedurende 24 uur.

▼B

1.6.1.2. *Apparatuur*

1.6.1.2.1. Drukvat

Voor de test wordt gebruik gemaakt van een drukvat. Dit is een cilindrisch stalen drukvat met een lengte van 89 mm en een uitwendige diameter van 60 mm (zie figuur 1). De cilinder wordt zo bewerkt dat aan de buitenkant recht tegenover elkaar twee vlakke zijden ontstaan (waardoor de doorsnede van het vat wordt gereduceerd tot 50 mm) zodat de cilinder gemakkelijker kan worden gemanipuleerd wanneer de ontstekingsplug en ontluchtingsplug worden aangebracht. Het vat, dat een inwendige diameter van 20 mm heeft, wordt aan beide uiteinden tot een diepte van 19 mm opgeruimd en voorzien van een schroefdraad voor 1 „British Standard Pipe (BSP) of het metrische equivalent daarvan. Op 35 mm van een van de uiteinden wordt op 90° van de vlakke oppervlakken in het gebogen oppervlak van het vat een zijbuis geschroefd om de druk op te nemen. Daarvoor wordt een 12 mm diep gat geboord dat wordt voorzien van schroefdraad voor de ½" BSP (of metrisch equivalent) schroefdraad op het uiteinde van de zijbuis. Zo nodig wordt een inerte pakking aangebracht om een gasdichte verbinding te bekomen. De zijbuis steekt 55 mm buiten het drukvat uit en heeft een inwendige diameter van 6 mm. Het uiteinde van de zijbuis wordt opgeruimd en voorzien van een schroefdraad voor een membraanmanometer. Elk type manometer mag worden gebruikt, op voorwaarde dat de manometer bestand is tegen de hete gassen of ontledingsproducten en kan reageren op een drukstijging van 690-2 070 kPa in maximaal 5 ms.

Het uiteinde van het drukvat dat het verst verwijderd is van de zijbuis, wordt afgesloten met een ontstekingsplug met twee elektrodes, de ene geïsoleerd van de plug, de andere via de plug met de massa verbonden. Het andere uiteinde van het drukvat wordt afgesloten met een breekplaat (barstdruk ongeveer 2 200 kPa) die op zijn plaats wordt gehouden met een bevestigingsplug met een inwendige diameter van 20 mm. Zo nodig wordt voor de ontstekingsplug een inerte pakking gebruikt om een gasdichte verbinding te bekomen. Het drukvat wordt tijdens het gebruik in de juiste positie gehouden met een statief (figuur 2). Dit bestaat doorgaans uit een zachtstalen grondplaat van 235 mm × 184 mm × 6 mm en een 185 mm lange vierkante buis van 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Van twee tegenover elkaar gelegen zijkanten van de vierkante buis wordt een deel verwijderd zodat een buis van 86 mm lengte overblijft die uitloopt in twee vlakke benen. De uiteinden van deze vlakke benen worden onder een hoek van 60° ten opzichte van de as van de buis afgekort en op de grondplaat gelast. Aan de bovenkant van de vierkante buis wordt in één zijkant een gleuf van 22 mm breed × 46 mm diep uitgefreesd, zodat de zijbuis in de gleuf valt wanneer het drukvat met de ontstekingsplug naar beneden in de vierkante buis wordt geplaatst. Op de onderste binnenzijde van de vierkante buis wordt een stuk staal van 30 mm breed en 6 mm dik gelast als afstandstuk. In de tegenoverliggende zijde worden twee 7 mm vleugelschroeven gedraaid om het drukvat stevig op zijn plaats te houden. Om het drukvat van onderen te steunen worden op de zijkanten die doorlopen naar de basis van het statief, twee stroken van 12 mm breed en 6 mm dik staal gelast.

▼B

1.6.1.2.2. Ontstekingssysteem

Het ontstekingssysteem bestaat uit een 25 cm lange Ni/Cr-draad met een diameter van 0,6 mm en een weerstand van 3,85 ohm/m. De draad wordt om een staaf met een diamater van 5 mm tot een spoel gewikkeld en met de elektrodes van de ontstekingsplug verbonden. De spoel moet een van de in figuur 3 afgebeelde configuraties hebben. De afstand tussen de bodem van het vat en de onderzijde van de ontstekingsspoel moet 20 mm bedragen. Wanneer de elektroden niet instelbaar zijn, moeten de einden van de ontstekingsdraad tussen de spoel en de bodem van het vat met een keramische mantel worden geïsoleerd. De draad wordt verhit met een voeding die een constante stroom van ten minste 10 A kan leveren.

1.6.2. **Uitvoering van de test** ([1])

Het toestel wordt met manometer en verhittingssysteem, maar zonder de breekplaat, met de ontstekingsplug naar beneden neergezet. In een glazen beker worden met een glazen roerstaaf 2,5 g testvloeistof en 2,5 g gedroogde cellulose gemengd ([2]). Om veiligheidsredenen moet tijdens het mengen een veiligheidsschild tussen de experimentator en het mengsel zijn geplaatst. Indien het mengsel tot ontbranding komt tijdens het mengen of vullen, zijn geen verdere tests nodig. Het mengsel wordt in kleine hoeveelheden tegelijk in het drukvat gegoten, terwijl tegen het drukvat wordt geklopt om ervoor te zorgen dat het mengsel de ruimte rond de ontstekingsspoel vult en daarmee goed contact maakt. Het is belangrijk dat de spoel tijdens het vullen niet verbuigt, aangezien dit tot foutieve resultaten kan leiden ([3]). De breekplaat wordt op zijn plaats gebracht en de bevestigingsplug wordt stevig vastgeschroefd. Het gevulde drukvat wordt met de breekplaat naar boven in het statief geplaatst. De gehele opstelling moet zich in een geschikte gewapende afzuigkast of ontstekingskast bevinden. De voeding wordt aangesloten op de uitwendige aansluitingen van de ontstekingsplug. De stroomsterkte bedraagt 10 A. De tijd tussen het begin van het mengen en het inschakelen van de voeding mag niet langer zijn dan tien minuten.

Het signaal van de manometer wordt geregistreerd met een systeem waarmee het drukverloop kan worden geanalyseerd en continu kan worden geregistreerd (bijv. een transiëntrecorder gekoppeld aan een papierschrijver). Het mengsel wordt verwarmd tot de breekplaat breekt of totdat ten minste 60 seconden zijn verstreken. Als de breekplaat niet breekt, moet het mengsel afkoelen voordat het toestel voorzichtig wordt geopend, waarbij de nodige voorzorgen worden getroffen voor het geval een plotselinge drukstijging optreedt. Er worden vijf proeven uitgevoerd met de teststof en de referentiestof(fen). De tijd waarin de druk stijgt van 690 kPa tot 2 070 kPa boven de atmosferische druk, wordt genoteerd. Vervolgens wordt de gemiddelde stijgtijd van de druk berekend.

In sommige gevallen kunnen stoffen een (te hoge of te lage) drukstijging veroorzaken als gevolg van chemische reacties die niet relevant zijn voor de oxiderende eigenschappen van de stof. In die gevallen kan het nodig zijn de test te herhalen met een inerte stof, bijvoorbeeld diatomiet (kieselgoehr), in plaats van cellulose, om het karakter van de reactie te bepalen.

([1]) Mengsels van oxiderende stoffen en cellulose kunnen explosief zijn en moeten met de nodige voorzichtigheid worden behandeld.

([2]) In de praktijk kan dit worden gedaan door een grotere hoeveelheid testvloeistof en cellulose te mengen in een verhouding 1:1 en vervolgens 5 ± 0,1 g van het mengsel in het drukvat te brengen. Het mengsel moet voor elke proef vers worden bereid.

([3]) Met name moet contact tussen opeenvolgende wikkelingen van de spoel worden vermeden.

▼B

2. **GEGEVENS**

Stijgtijd voor de teststof en voor de referentiestof(fen). Stijgtijd voor de tests met een inerte stof, indien uitgevoerd.

2.1. VERWERKING VAN DE RESULTATEN

De gemiddelde stijgtijden van de druk voor de teststof en de referentiestof(fen) worden berekend.

De gemiddelde stijgtijd voor de tests met een inerte stof (indien uitgevoerd) wordt berekend.

Tabel 1 bevat enkele voorbeelden van resultaten

Tabel 1

Voorbeelden van resultaten [a]

Stof [b]	Gemiddelde stijgtijd voor een 1:1 mengsel met cellulose (ms)
Ammoniumdichromaat, verzadigde waterige oplossing	20 800
Calciumnitraat, verzadigde waterige oplossing	6 700
IJzer(III)nitraat, verzadigde waterige oplossing	4 133
Lithiumperchloraat, verzadigde waterige oplossing	1 686
Magnesiumperchloraat, verzadigde waterige oplossing	777
Nikkelnitraat, verzadigde waterige oplossing	6 250
Salpeterzuur, 65 %	4 767 [c]
Perchloorzuur, 50 %	121 [a] [c]
Perchloorzuur, 55 %	59
Kaliumnitraat, 30 % waterige oplossing	26 690
Zilvernitraat, verzadigde waterige oplossing	[d]
Natriumchloraat, 40 % waterige oplossing	2 555 [c]
Natriumnitraat, 45 % waterige oplossing	4 133
Inerte stof	
Water:cellulose	[d]

[a] Zie referentie (1) voor indeling volgens de vervoersvoorschriften van de VN.
[b] Verzadigde oplossingen worden bij 20 °C bereid.
[c] Gemiddelde waarde van vergelijkende interlaboratoriumproeven.
[d] Maximumdruk van 2 070 kPa niet bereikt.

▼B

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

— identiteit, samenstelling, zuiverheid enz. van de teststof;

— concentratie van de teststof;

— procedure voor het drogen van de cellulose;

— watergehalte van de gebruikte cellulose;

— de meetresultaten;

— eventuele resultaten van tests met een inerte stof;

— berekende gemiddelde stijgtijden van de druk;

— eventuele afwijkingen van deze methoden en redenen daarvoor;

— alle verdere informatie of opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN ([1])

De testresultaten worden beoordeeld op grond van:

a) de vraag of het mengsel van teststof en cellulose spontaan ontbrand; en

b) een vergelijking van de gemiddelde stijgtijd voor de druk van 690 KPa naar 2 070 kPa met die voor de referentiestof(fen).

Een vloeistof wordt aangemerkt als een oxiderende stof wanneer:

a) een mengsel in een 1:1 massaverhouding van de stof en cellulose spontaan ontbrand, of

b) een mengsel in een massaverhouding van 1:1 van de stof en cellulose een gemiddelde stijgtijd oplevert kleiner dan of gelijk aan de gemiddelde stijgtijd van de druk van een mengsel in een 1:1 massaverhouding van een waterige oplossing van 65 gewichtsprocent salpeterzuur en cellulose.

Om vals-positieve resultaten te vermijden, moet bij de interpretatie van de resultaten zo nodig ook rekening worden gehouden met resultaten verkregen bij het testen van de stof gemengd met inert materiaal.

([1]) Zie referentie 1 voor de interpretatie van de resultaten onder de vervoersvoorschriften van de VN met verschillende referentiestoffen.

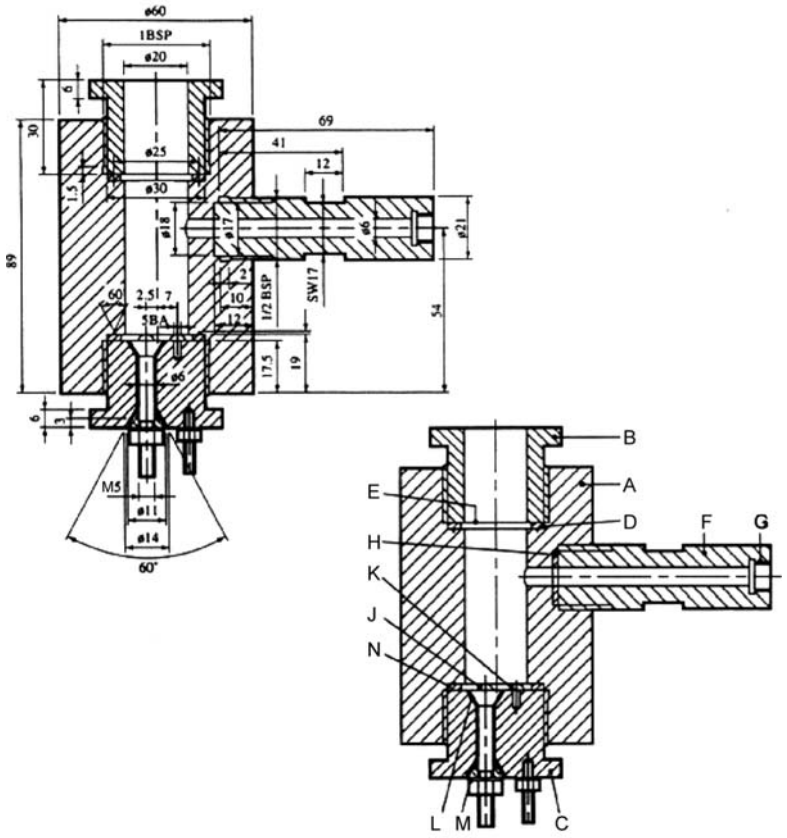
▼B

4. **REFERENTIES**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Figuur 1

Drukvat

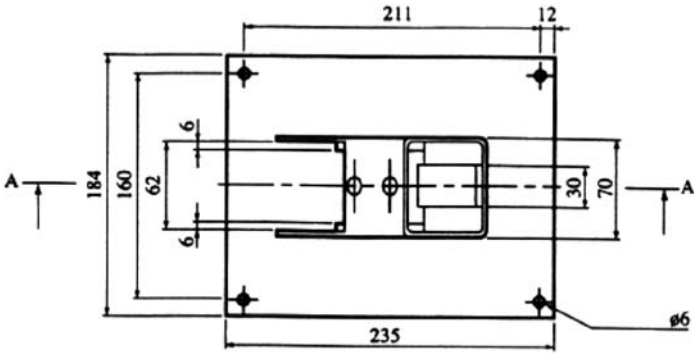


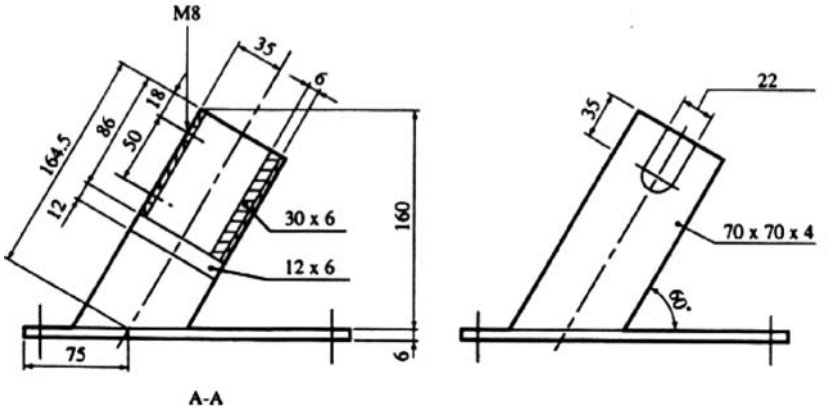
(A) Drukvat	(B) Bevestigingsplug breekplaat	(C) Ontstekingsplug
(D) Zachtloden pakking	(E) Breekplaat	(F) Zijbuis
(G) Manometerkop	(H) Pakking	(J) Geïsoleerde elektrode
(K) Geaarde elektrode	(L) Isolatie	(M) Stalen conus
(N) Groef voor pakking		

▼B

Figuur 2

Statief

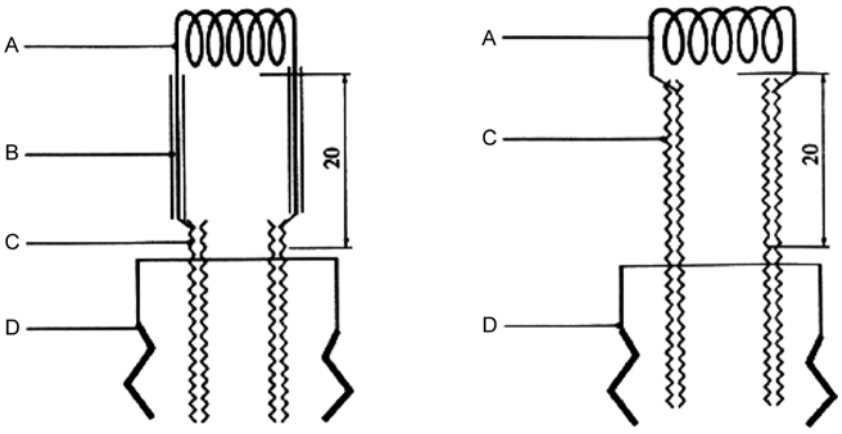




Figuur 3

Ontstekingssysteem

(A) Ontstekingsspoel (B) Isolatie (C) Elektroden (D) Ontstekingsplug



Opmerking: Beide ontstekingssystemen kunnen worden gebruikt.

▼M1

A.22. NAAR LENGTE GEWOGEN MEETKUNDIG GEMIDDELDE VAN DE DIAMETER VAN VEZELS

1. METHODE

1.1. INLEIDING

In deze methode wordt een procedure beschreven voor de bepaling van het naar lengte gewogen meetkundig gemiddelde van de diameter (Length Weighted Geometric Mean Diameter — LWGMD) van in bulk geproduceerde synthetische anorganische vezels (Man Made Mineral Fibres — MMMF). Aangezien er een waarschijnlijkheid van 95 % is dat de LWGMD van de populatie tussen de 95 %-betrouwbaarheidsniveaus (LWGMD ± twee keer de standaardfout) van het monster ligt, zal als testwaarde de onderste 95 %-betrouwbaarheidsgrens van het monster worden gerapporteerd (d.w.z. LWGMD minus twee keer de standaardfout). De methode is gebaseerd op een bijwerking (juni 1994) van een ontwerp-bedrijfsprocedure van de HSE, die is overeengekomen tijdens een bijeenkomst van de ECFIA en de HSE in Chester op 26 september 1993 en voor en op basis van een tweede interlaboratoriumproef is ontwikkeld (1, 2). Deze meetmethode kan worden gebruikt voor de karakterisering van de vezeldiameter van bulkstoffen of producten die MMMF bevatten, zoals refractaire keramische vezels (RKV), synthetische glasvezels (Man Made Vitreous Fibres — MMVF) of kristallijne en polykristallijne vezels.

Weging naar lengte is een methode om te compenseren voor het effect op de diameterdistributie ten gevolge van het breken van lange vezels bij de bemonstering of behandeling van het materiaal. Voor de meting van de grootteverdeling van MMMF-diameters worden meetkundige statistische methoden (meetkundig gemiddelde) gebruikt, omdat deze diameters meestal een grootteverdeling hebben die een lognormaalverdeling benadert.

Meting van de lengte èn de diameter is zowel saai als tijdrovend, maar als alleen de vezels worden gemeten die een oneindig dunne lijn in een REM-gezichtsveld raken, is de waarschijnlijkheid dat een bepaalde vezel wordt geselecteerd evenredig met de lengte daarvan. Aangezien daarmee de lengte in de berekening van de weging naar lengte wordt verdisconteerd, behoeft alleen nog de diameter te worden gemeten en kan de LWGMD-2SE volgens de beschrijving worden berekend.

1.2. DEFINITIES

Deeltje: Een object met een lengte/breedte-verhouding van minder dan 3:1.

Vezel: Een object met een lengte/breedte-verhouding (aspectverhouding) van ten minste 3:1.

1.3. TOEPASSINGSGEBIED EN BEPERKINGEN

De methode is bedoeld voor diameterdistributies met een mediane diameter van 0,5 μm tot 6 μm. Grotere diameters kunnen met een lagere REM-vergrotingsfactor worden gemeten, maar de methode krijgt steeds meer beperkingen voor kleinere vezels en als de mediane diameter kleiner is dan 0,5 μm, wordt een TEM-meting (transmissie-elektronenmicroscoop) aanbevolen.

▼M1

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Uit de vezelmat of uit losse bulkvezels wordt een aantal representatieve boormonsters genomen. De lengte van de bulkvezels wordt met behulp van een vergruisprocedure verkleind en een representatief deelmonster wordt gedispergeerd in water. Er worden meetmonsters geëxtraheerd, gefiltreerd over een polycarbonaatfilter met een poriegrootte van 0,2 μm en geprepareerd voor onderzoek met een rasterelektronenmicroscoop (REM). De vezeldiameters worden gemeten bij een vergrotingsfactor van 10 000 × of meer ([1]) met behulp van een steekproefname langs een lijn om een zuivere raming van de mediane diameter te krijgen. Het onderste 95 %-betrouwbaarheidsinterval (op basis van een eenzijdige toets) wordt berekend om een raming te krijgen van de laagste waarde van het meetkundig gemiddelde van de vezeldiameter van het materiaal.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Veiligheids/voorzorgmaatregelen**

De blootstelling van personen aan vezels in de lucht moet tot een minimum worden beperkt en voor het hanteren van de droge vezels moet een zuurkast of een handschoenenkast worden gebruikt. Om de effectiviteit van de beperkende maatregelen te bepalen moet periodiek monitoring van de blootstelling van personen worden uitgevoerd. Bij het hanteren van MMMF moeten wegwerphandschoenen worden gebruikt om huidirritatie te beperken en kruisbesmetting te voorkomen.

1.5.2. **Apparatuur**

— Pers en matrijzen (voor 10 MPa).

— Polycarbonaatfilter met capillaire poriën met een poriegrootte van 0,2 μm (diameter 25 mm).

— Cellulose-ester membraanfilter met een poriegrootte van 5 μm dat als secundair filter kan worden gebruikt.

— Glazen filtreerapparaat (of wegwerp-filtratiesystemen) voor filters met een diameter van 25 mm (bv. glazen microanalysekit van Millipore, typenr. XX10 025 00).

— Vers gedestilleerd water dat is gefiltreerd over een filter met een poriegrootte van 0,2 μm om micro-organismen te verwijderen.

— Sputter coater met een goud- of goud/palladiumtarget.

— Rasterelektronenmicroscoop met een resolutie tot 10 nm en een vergrotingsfactor van 10 000 ×.

— Diversen: spatels, scalpelmesje type 24, pincet, REM-buisjes, koolstoflijm of koolstofkleefband, zilverpasta.

— Ultrasone sonde of ultrasoon bad (tafelmodel).

— Monsterboor of kurkboor om boormonsters van een MMMF-mat te nemen.

([1]) Deze vergrotingsfactor is geschikt voor vezels van 3 μm; voor vezels van 6 μm zal een vergrotingsfactor van 5 000 × wellicht geschikter zijn.

▼**M1**

1.5.3. **Testprocedure**

1.5.3.1. *Monstername*

Voor matten en platen wordt een 25 mm monsterboor of kurkboor gebruikt om monsters van de doorsnede te nemen. Deze moeten gelijkmatig gespreid over de breedte van een klein stuk van de mat worden genomen of, als een langer stuk van de mat beschikbaar is, uit aselect gekozen plaatsen. Dezelfde apparatuur kan worden gebruikt om aselecte monsters uit losse vezels te nemen. Indien mogelijk moeten er zes monsters worden genomen om de ruimtelijke variatie in het bulkmateriaal te verdisconteren.

De zes boormonsters worden in een matrijs met een diameter van 50 mm bij 10 Mpa verbrijzeld. Het materiaal wordt met een spatel gemengd en opnieuw aan 10 Mpa blootgesteld. Vervolgens wordt het materiaal uit de matrijs verwijderd en in een gesloten glazen fles bewaard.

1.5.3.2. *Monstervoorbereiding*

Indien nodig kan organisch bindmiddel worden verwijderd door de vezels gedurende ongeveer één uur bij 450 °C in een oven te leggen.

Verdeel het monster in vieren door een kegelvormig hoopje te maken en dit in vieren te verdelen („cone and quarter”-techniek) (dit moet in een zuurkast gebeuren).

Voeg met een spatel een kleine hoeveelheid (< 0,5 g) monster toe aan 100 ml vers gedestilleerd water dat over een membraanfilter van 0,2 μm is gefiltreerd (ook andere bronnen van ultrazuiver water mogen worden gebruikt, als is aangetoond dat deze aan de eisen voldoen). Dispergeer grondig met een ultrasone sonde die bij een vermogen van 100 W zodanig is ingesteld dat cavitatie optreedt (als er geen sonde beschikbaar is, wordt de volgende methode gebruikt: gedurende 30 seconden herhaaldelijk schudden en omkeren; gedurende vijf minuten ultrasoneren in een tafelmodel ultrasoon bad; vervolgens nog eens gedurende 30 seconden herhaaldelijk schudden en omkeren).

Onmiddellijk na het dispergeren van de vezels wordt met een pipet met brede opening (inhoud 2-5 ml) een aantal analysemonsters genomen (bv. drie monsters van 3, 6 en 10 ml).

Elk analysemonster wordt onder vacuüm gefiltreerd over een polycarbonaatfilter van 0,2 μm op een secundair MEC-filter met een poriegrootte van 5 μm, waarbij een glazen filterkroes van 25 mm met een cilindrisch reservoir wordt gebruikt. In de filterkroes wordt ongeveer 5 ml gefiltreerd gedestilleerd water gebracht en het analysemonster wordt langzaam in het water gepipetteerd, waarbij de pipetpunt onder de meniscus wordt gehouden. De pipet en het reservoir moeten na het pipetteren grondig worden gespoeld, aangezien dunne vezels de neiging hebben aan het oppervlak te blijven.

Verwijder het filter voorzichtig, maak het los van het secundaire filter en leg het in een houder om te laten drogen.

▼M1

Snij met een type 24 scalpelmes met een schokkende beweging een kwart of halve filterschijf met het filterresidu af. Plak de doorsnede met een stukje koolstofkleefband of koolstoflijm zorgvuldig op een REM-stub. Op ten minste drie plaatsen wordt zilverpasta aangebracht om het elektrisch contact aan de randen van het filter en de stub te verbeteren. Als de lijm/zilverpasta droog is, wordt met een sputter coater ongeveer 50 nm goud of goud/palladium op het oppervlak van het neerslag aangebracht.

1.5.3.3. *REM: kalibratie en uitvoering*

1.5.3.3.1. Kalibratie

De kalibratie van de REM moet ten minste één keer per week worden gecontroleerd (liefst één keer per dag) met een gecertificeerd kalibratierooster. De kalibratie moet aan de hand van een gecertificeerde standaard worden gecontroleerd en als de gemeten waarde (REM) niet binnen ± 2 % van de gecertificeerde waarde ligt, moet de REM-kalibratie worden aangepast en opnieuw worden gecontroleerd.

De REM moet met een reële monstermatrix bij een vergrotingsfactor van 2 000 × in staat zijn tot een resolutie van ten minste een minimale zichtbare diameter van 0,2 μm.

1.5.3.3.2. Uitvoering

De REM moet worden gebruikt met een vergrotingsfactor van 10 000 × ([1]) onder omstandigheden die een goede resolutie met een aanvaardbaar beeld geven bij een lage aftastsnelheid van bijvoorbeeld 5 seconden per opname. Hoewel de operationele vereisten van verschillende REM's kunnen uiteenlopen, wordt bij materialen met een betrekkelijk laag atoomgewicht in het algemeen de beste zichtbaarheid en resolutie verkregen bij gebruik van een versnellingsspanning van 5-10 keV met een kleine stipafmeting en een korte werkafstand. Aangezien er een lineair traject wordt afgelegd, moet er een helling van 0° worden gebruikt om opnieuw scherpstellen tot een minimum te beperken of als de REM een eucentrische objecttafel heeft, moet de eucentrische werkafstand worden gebruikt. Er kan een lagere vergrotingsfactor worden gebruikt als het materiaal geen kleine vezels (kleine diameter) bevat en de vezeldiameter groot is (> 5 μm).

1.5.3.4. *Groottebepaling*

1.5.3.4.1. Onderzoek bij lage vergrotingsfactor om het monster te evalueren

In eerste instantie wordt het monster bij een lage vergrotingsfactor onderzocht om na te gaan of grote vezels aan elkaar klitten en om de dichtheid van de vezels te bepalen. Als er te veel klitten zijn, wordt aanbevolen een nieuw monster te maken.

Met het oog op de statistische nauwkeurigheid moet er een minimaal aantal vezels worden gemeten en een hoge vezeldichtheid zal wellicht wenselijk lijken, aangezien het bestuderen van lege velden tijdrovend is en niet tot de analyse bijdraagt. Als het filter echter te veel materiaal bevat, wordt het moeilijk alle meetbare vezels te meten en omdat kleine vezels achter grotere vezels verborgen kunnen liggen, worden deze dan wellicht gemist.

([1]) Zie voor vezels van 3 μm de vorige voetnoot.

▼M1

Bij een vezeldichtheid van meer dan 150 vezels per millimeter van het lineaire traject kan een systematische fout tot een te hoge LWGMD leiden. Anderzijds leidt een lage vezelconcentratie tot een langere analysetijd en het is vaak kosteneffectief om een monster te maken met een vezeldichtheid die dichter bij het optimum ligt in plaats van tellingen te blijven uitvoeren bij filters met een lage concentratie. Een optimale vezeldichtheid moet gemiddeld ongeveer één of twee telbare vezels per gezichtsveld bij een vergrotingsfactor 5 000 opleveren. De optimale dichtheid is echter wel afhankelijk van de grootte (diameter) van de vezels, dus de experimentator moet zijn kennis en ervaring gebruiken om te beoordelen of de vezeldichtheid in de buurt van de optimale dichtheid ligt of niet.

1.5.3.4.2. Weging van de vezeldiameters naar lengte

Alleen de vezels die een op het scherm van de REM getrokken (oneindig) dunne lijn raken (of kruisen), worden geteld. Daartoe wordt over het centrum van het scherm een horizontale (of verticale) lijn getrokken.

Er kan ook één punt in het centrum van het scherm worden aangebracht, waarna een continue scan in één richting over het filter wordt gestart. Van elke vezel met een aspectverhouding van meer dan 3:1 die dit punt raakt of kruist, wordt de diameter gemeten en geregistreerd.

1.5.3.4.3. Groottebepaling van de vezels

Aanbevolen wordt ten minste 300 vezels te meten. Elke vezel wordt slechts eenmaal gemeten op het snijpunt met de lijn of het punt op het scherm (of vlakbij het snijpunt als de randen van de vezels niet goed te zien zijn). Als er vezels met een niet-uniforme doorsnede worden aangetroffen, wordt er een meting gebruikt van de gemiddelde diameter van de vezel. Bij de bepaling van de rand en het meten van de kortste afstand tussen de randen van de vezel moet zorgvuldig worden gewerkt. De groottebepaling kan on-line gebeuren of off-line met opgeslagen beelden of foto's. Halfautomatische beeldmeetsystemen die de gegevens direct downloaden naar een spreadsheet worden aanbevolen, aangezien ze tijd besparen en fouten bij het overschrijven elimineren en de berekeningen kunnen worden geautomatiseerd.

Voor lange vezels moet bij een lage vergrotingsfactor worden gecontroleerd of de uiteinden niet naar het gezichtsveld van de meting terugkrullen, zodat vaststaat dat deze vezels slechts één keer worden gemeten.

2. **GEGEVENS**

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Vezeldiameters hebben meestal geen normaalverdeling. Door een logtransformatie uit te voeren kan er echter een verdeling worden verkregen die de normaalverdeling benadert.

Bereken het rekenkundig gemiddelde (gemiddelde lnD) en de standaarddeviatie (SD_{lnD}) van de natuurlijke logaritmen (lnD) van de n vezeldiameters (D):

$$\text{gemiddelde } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

▼M1

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{gemiddelde } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Om de standaardfout (SE_{lnD}) te krijgen wordt de standaarddeviatie gedeeld door de vierkantswortel van het aantal metingen:

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Van het gemiddelde wordt twee keer de standaardfout afgetrokken en van deze waarde (gemiddelde minus twee keer de standaardfout) wordt de e-macht berekend; dit levert het meetkundig gemiddelde minus twee keer de standaardfout van het meetkundig gemiddelde:

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{gemiddelde } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPPORTAGE**

TESTVERSLAG

In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

— de waarde van LWGMD-2SE;

— eventuele afwijkingen van de procedure, met name degene die gevolgen kunnen hebben voor de precisie of de nauwkeurigheid van de resultaten, met een afdoende motivering.

4. **REFERENTIES**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 1-OCTANOL/WATER-VERDELINGSCOËFFICIËNT: LANGZAAM-ROERENMETHODE

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 123 (2006) van de OESO (TG 123). De langzaam-roerenmethode („slow-stirring”-methode) heeft accurate waarden opgeleverd voor de 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt (P_{OW}) tot een log P_{OW} van 8,2 (1). Het is dan ook een geschikte experimentele benadering voor de directe bepaling van de P_{OW} van zeer hydrofobe stoffen.

2. Andere methoden voor de bepaling van de 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt (P_{OW}) zijn de „schudfles”-methode (2) en de bepaling van de P_{OW} aan de hand van het retentiegedrag bij omgekeerde-fase-HPLC (3). De „schudfles”-methode is gevoelig voor artefacten als gevolg van de overgang van microdruppeltjes octanol naar de waterfase. Hoe hoger de P_{OW}-waarde, hoe meer de aanwezigheid van deze druppeltjes in de waterfase leidt tot overschatting van de teststofconcentratie in het water. Daarom is het gebruik van deze methode beperkt tot stoffen met log $P_{OW} < 4$. De tweede methode berust op betrouwbare gegevens van rechtstreeks bepaalde P_{OW}-waarden voor de kalibratie van het verband tussen het HPLC-retentiegedrag en de gemeten P_{OW}-waarden. Er was een voorlopige OESO-testrichtlijn beschikbaar voor de bepaling van 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënten van ioniseerbare stoffen (4), maar deze wordt niet langer gebruikt.

3. Deze testmethode is ontwikkeld in Nederland. De nauwkeurigheid van de hier beschreven methoden is gevalideerd en geoptimaliseerd in een ringtest met medewerking van vijftien laboratoria (5).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

Significantie en gebruik

4. Voor inerte organische stoffen zijn zeer significante verbanden gevonden tussen hun 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt (P_{OW}) en hun bioaccumulatie in vissen. Bovendien is een verband aangetoond tussen de P_{OW} en de toxiciteit voor vissen en de sorptie van chemicaliën aan vaste stoffen zoals bodems en sedimenten. Referentie (6) biedt een uitvoerig overzicht van deze verbanden.

5. Er is een grote verscheidenheid aan verbanden vastgesteld tussen de 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt en andere stofeigenschappen die van belang zijn voor milieutoxicologie en milieuchemie. Daardoor is de 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt uitgegroeid tot een centrale parameter bij het beoordelen van het milieurisico van chemicaliën, alsmede bij het voorspellen van de levensloop van chemicaliën in het milieu.

Toepassingsgebied

6. De langzaam-roerenmethode wordt verondersteld de vorming van microdruppeltjes uit druppeltjes 1-octanol in de waterfase te beperken. Hierdoor wordt overschatting van de concentratie in het water als gevolg van teststofmoleculen in dergelijke druppeltjes vermeden. De langzaam-roerenmethode is dan ook bij uitstek geschikt voor de bepaling van de P_{OW} voor stoffen met een verwachte log P_{OW}-waarde van 5 of hoger, waarvoor de schudflesmethode (2) geneigd is foutieve resultaten te geven.

▼M4

DEFINITIE EN EENHEDEN

7. De verdelingscoëfficiënt van een stof tussen water en een lipofiel oplosmiddel (1-octanol) is een maat voor de evenwichtsverdeling van de stof tussen de twee fasen. De verdelingscoëfficiënt tussen water en 1-octanol (P_{OW}) wordt gedefinieerd als de verhouding tussen de evenwichtsconcentraties van de teststof in met water verzadigde 1-octanol (C_O) en met 1-octanol verzadigd water (C_W).

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

Aangezien het om een verhouding van concentraties gaat, is de P_{OW} dimensieloos. Meestal wordt de 10-logaritme van P_{OW} gegeven (log P_{OW}). Vanwege de temperatuurafhankelijkheid van de P_{OW} moet bij gerapporteerde gegevens de meettemperatuur worden vermeld.

PRINCIPE VAN DE METHODE

8. Om de verdelingscoëfficiënt vast te stellen worden water, 1-octanol en de teststof bij constante temperatuur met elkaar in evenwicht gebracht, waarna de concentraties van de teststof in de beide fasen worden bepaald.

9. De problemen bij de schudflesmethode, in verband met de vorming van microdruppeltjes tijdens het experiment, kunnen met de hier voorgestelde langzaam-roerenmethode worden verminderd. In het langzaam-roerenexperiment worden water, 1-octanol en de teststof in een thermostatisch geregelde geroerde reactor gebracht. Het roeren versnelt de uitwisseling tussen de fasen. De turbulentie als gevolg van het roeren blijft beperkt, waardoor de uitwisseling tussen 1-octanol en water wordt bevorderd zonder dat daarbij microdruppeltjes worden gevormd.

TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

10. Omdat de aanwezigheid van andere stoffen dan de teststof van invloed zou kunnen zijn op de activiteitscoëfficiënt van de teststof, moet deze als zuivere stof worden onderzocht. Voor de 1-octanol/water-verdelingstest moet de hoogste in de handel verkrijgbare zuiverheid worden gebruikt.

11. Deze methode is van toepassing op zuivere stoffen die niet dissociëren of verbindingen vormen en die geen significante grensvlakactiviteit vertonen. Zij is toepasbaar voor het bepalen van de verdelingscoëfficiënt tussen 1-octanol en water van dergelijke stoffen en van mengsels. Indien de methode voor mengsels wordt gebruikt, zijn de vastgestelde verdelingscoëfficiënten tussen 1-octanol en water voorwaardelijk en afhankelijk van de chemische samenstelling van het onderzochte mengsel en de elektrolytsamenstelling van de gebruikte waterfase. Mits aanvullende stappen worden genomen, is de methode ook toepasbaar voor verbindingen die dissociëren of verbindingen vormen (punt 12).

12. Wegens het voorkomen van meervoudige evenwichtstoestanden in water en 1-octanol bij de 1-octanol/water-verdeling van dissociërende stoffen als organische zuren en fenolen, organische basen en organometaalverbindingen, is de verdelingscoëfficiënt een voorwaardelijke constante die sterk afhangt van de elektrolytsamenstelling (7)(8). Bij het bepalen van de 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt moeten de pH en de elektrolytsamenstelling in het experiment dan ook worden gecontroleerd en gerapporteerd. De waardering van dergelijke verdelingscoëfficiënten vereist een deskundig oordeel. Op grond van de dissociatieconstanten moeten geschikte pH-waarden worden geselecteerd, zodat voor elke ionisatietoestand een verdelingscoëfficiënt wordt bepaald. Voor het onderzoeken van organometaalverbindingen zijn buffers nodig die geen complex vormen (8). Rekening houdend met bestaande kennis over het gedrag in water (complexconstanten, dissociatieconstanten), moeten de testomstandigheden zodanig worden gekozen dat een schatting kan worden gemaakt van de speciatie van de teststof in de waterfase. Ten behoeve van een gelijke ionsterkte in alle experimenten moet een achtergrondelektrolyt worden gebruikt.

▼M4

13. Bij het uitvoeren van de test op stoffen met een lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{OW} kunnen problemen optreden doordat de concentraties in water zo laag kunnen worden dat het moeilijk wordt deze nog nauwkeurig te bepalen. Deze testmethode biedt aanwijzingen om met dit probleem om te gaan.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

14. De zuiverheid van de chemische reagentia moet ten minste pro analysi zijn. Aanbevolen wordt om ongemerkte teststoffen te gebruiken met bekende chemische samenstelling en bij voorkeur een zuiverheid van 99 %, dan wel met radioactieve koolstof gemerkte teststoffen met bekende chemische samenstelling en radiochemische zuiverheid. Bij merkstoffen met een korte halfwaardetijd moet voor het radioactief verval worden gecorrigeerd. Bij radioactief gemerkte teststoffen moet een analytische methode worden toegepast die specifiek is voor de verbinding, opdat de gemeten radioactiviteit rechtstreeks verband houdt met de teststof.

15. Een schatting van log P_{OW} kan worden verkregen met behulp van speciaal hiervoor in de handel verkrijgbare software of aan de hand van de verhouding van de oplosbaarheidswaarden in beide oplosmiddelen.

16. Alvorens met een langzaam-roerenexperiment een P_{OW}-waarde te bepalen moet de volgende informatie over een teststof beschikbaar zijn:

a) structuurformule;

b) geschikte analytische methoden voor de bepaling van de concentratie van de stof in water en 1-octanol;

c) dissociatieconstante(n) van ioniseerbare stoffen (OESO-richtlijn 112 (9));

d) oplosbaarheid in water (10);

e) niet-biologische hydrolyse (11);

f) gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (12);

g) dampspanning (13).

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Uitrusting en apparatuur

17. Een standaard-laboratoriumuitrusting is vereist, in het bijzonder:

— magneetroerders en teflongecoate roerstaafjes, gebruikt om de waterfase te roeren;

— geschikte analyse-instrumenten voor het bepalen van de teststofconcentratie bij de verwachte concentraties;

— een roervat met een kraan in de bodem. Afhankelijk van de schatting van log P_{OW} en de detectiegrens van de teststof moet worden overwogen een gelijkvormig reactievat van meer dan een liter te gebruiken, opdat een groot genoeg volume water kan worden gebruikt voor chemische extractie en analyse. Dit zal leiden tot hogere concentraties in het waterextract en daarmee een grotere betrouwbaarheid opleveren van de analytische bepaling. Een tabel met schattingen van het minimaal benodigde volume, de detectiegrens van de verbinding, de geschatte log P_{OW} en de oplosbaarheid in water is opgenomen in aanhangsel 1. De tabel is gebaseerd op het verband tussen P_{OW} en de verhouding tussen de oplosbaarheidswaarden in octanol en water, volgens Pinsuwan *et al.* (14):

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

▼M4

waarbij

$SR = S_{oct}/S_w$ (in molariteit);

en op het verband volgens Lyman (15) voor het voorspellen van de oplosbaarheid in water. Waarden voor de oplosbaarheid in water die zijn berekend met de vergelijking uit aanhangsel 1 moeten worden beschouwd als voorlopige schattingen. Er zij op gewezen dat het de gebruiker vrij staat een schatting te maken van de oplosbaarheid in water door middel van ieder ander verband waarvan hij of zij meent dat dit het verband tussen hydrofobiciteit en oplosbaarheid beter weergeeft. Voor vaste stoffen wordt hierbij aanbevolen het smeltpunt te betrekken bij het voorspellen van de oplosbaarheid. Bij gebruik van een gewijzigde vergelijking moet worden nagegaan of de vergelijking voor het berekenen van de oplosbaarheid in octanol nog opgaat. Een schematische weergave van een dubbelwandig glazen roervat met een volume van ongeveer een liter is opgenomen in aanhangsel 2. Van de verhoudingen van het reactievat in aanhangsel 2 is gebleken dat ze gunstig zijn; deze moeten dan ook worden gehandhaafd bij gebruik van een apparaat van een andere omvang;

— een voorziening om de temperatuur tijdens het langzaam-roerenexperiment constant te houden is essentieel.

18. Het reactievat moet zijn vervaardigd van inert materiaal, opdat de adsorptie aan het oppervlak van het reactievat verwaarloosbaar is.

Bereiding van de testoplossingen

19. De bepaling van de P_{OW} moet worden uitgevoerd met 1-octanol van de hoogste zuiverheid die in de handel verkrijgbaar is (ten minste + 99 %). Aanbevolen wordt de 1-octanol te zuiveren door extractie met zuur, base en water en vervolgens te drogen. Bovendien kan de 1-octanol worden gezuiverd door middel van destillatie. Bij de bereiding van de standaardoplossingen van de teststof moet gezuiverde 1-octanol worden gebruikt. Het water dat voor de P_{OW}-bepaling wordt gebruikt, moet zijn gedistilleerd in apparatuur van glas of kwarts, of verkregen uit een zuiveringssysteem. Ook kan HPLC-water worden gebruikt. Voor gedestilleerd water is filtratie door een 0,22 μm-filter vereist, en moeten blanco's in het experiment worden opgenomen om na te gaan dat de geconcentreerde extracten geen onzuiverheden bevatten die kunnen interfereren met de teststof. Bij gebruik van een glasvezelfilter moet dit vooraf worden schoongemaakt door het ten minste drie uur bij 400 °C te verhitten.

20. Voorafgaand aan het experiment worden de beide oplosmiddelen met elkaar verzadigd door ze in een voldoende groot reactievat met elkaar in evenwicht te brengen. Hiertoe wordt het tweefasensysteem gedurende twee dagen geroerd.

21. Een geschikte teststofconcentratie wordt gekozen en opgelost in 1-octanol (verzadigd met water). De 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt moet worden bepaald in verdunde oplossingen in 1-octanol en water. Daarom mag de teststofconcentratie niet hoger zijn dan 70 % van de oplosbaarheid van de stof, met een maximumconcentratie van 0,1 M in elk van beide fasen (1). De voor het experiment gebruikte 1-octanoloplossingen moeten vrij zijn van gesuspendeerde vaste teststofdeeltjes.

22. De geschikte hoeveelheid teststof wordt opgelost in 1-octanol (verzadigd met water). Als de geschatte waarde voor log P_{OW} hoger is dan 5, moet men goed opletten dat de voor het experiment gebruikte 1-octanoloplossingen geen gesuspendeerde vaste teststofdeeltjes bevatten. Daartoe moet bij een geschatte waarde van log $P_{OW} > 5$ de volgende werkwijze worden gevolgd:

— de teststof wordt opgelost in 1-octanol (verzadigd met water);

▼M4

— de oplossing wordt lang genoeg weggezet om de gesuspendeerde vastestofdeeltjes te laten bezinken. Gedurende het bezinkingsproces wordt de teststofconcentratie gemonitord;

— nadat de gemeten concentraties in de 1-octanol-oplossing stabiele waarden hebben bereikt, wordt de stockoplossing verdund met een geschikt volume 1-octanol;

— de concentratie van de verdunde stockoplossing wordt gemeten. Als de gemeten concentratie consistent is met de verdunning kan de verdunde stockoplossing worden gebruikt in het langzaam-roerenexperiment.

Extractie en analyse van de monsters

23. Voor de bepaling van de teststofconcentratie moet een gevalideerde analysemethode worden gebruikt. De onderzoekers moeten aantonen dat de concentraties in de met water verzadigde 1-octanolfase en in de met 1-octanol verzadigde waterfase tijdens het experiment boven de bepaalbaarheidsgrens liggen van de gebruikte analysemethode. In gevallen waarin extractiemethoden nodig zijn, moeten voorafgaand aan het experiment de recovery's van de teststof uit de waterfase en uit de 1-octanolfase worden vastgesteld. Het analysesignaal moet worden gecorrigeerd voor blanco's en er moet voor worden gezorgd dat geen carry-over van analyt van het ene monster naar het andere kan optreden.

24. Voorafgaand aan de analyse zijn waarschijnlijk extractie van de waterfase met een organisch oplosmiddel en preconcentratie van het extract noodzakelijk. Om dezelfde reden is het noodzakelijk eventuele blancoconcentraties te verlagen. Daartoe moeten oplosmiddelen van hoge zuiverheid worden gebruikt, bij voorkeur oplosmiddelen voor restanalyse. Bovendien kan het voor het vermijden van kruisverontreiniging bevorderlijk zijn om te werken met vooraf zorgvuldig gereinigd glaswerk(bv. door te wassen met een oplosmiddel of tot hoge temperatuur te verhitten).

25. Een schatting van log P_{OW} kan worden verkregen met een schattingsprogramma of op basis van het oordeel van een deskundige. Indien de waarde hoger is dan 6 moeten blancocorrecties en analytcarry-over nauwlettend worden gemonitord. Evenzo is het bij een geschatte log $P_{OW} > 6$ geboden een surrogaatstandaard te gebruiken om te corrigeren voor de recovery. In de handel is een aantal softwareprogramma's beschikbaar voor het schatten van log P_{OW} ([1]), bv. Clog P(16), KOWWIN (17), ProLogP (18) en ACD log P (19). Beschrijvingen van de schattingaanpak zijn te vinden in de referenties (20-22).

26. De bepaalbaarheidsgrenzen voor de teststofconcentratie in 1-octanol en water worden vastgesteld met behulp van beproefde methoden. Als vuistregel geldt dat de bepaalbaarheidsgrens van de methode kan worden bepaald als zijnde de concentratie in water of 1-octanol die een signaal-ruisverhouding geeft van tien. Er moet een geschikte extractie- en preconcentratiemethode worden gekozen en analytische recovery's moeten eveneens worden gespecificeerd. Een geschikte preconcentratiefactor wordt gekozen om bij analytische bepaling een signaal van de vereiste sterkte te verkrijgen.

([1]) Deze informatie wordt slechts gegeven om de gebruikers van dienst te zijn. Andere, equivalente computerprogramma's kunnen worden gebruikt als kan worden aangetoond dat deze dezelfde resultaten geven.

▼M4

27. Op basis van de parameters van de analysemethode en de verwachte concentraties wordt bepaald van welke orde van grootte de monsteromvang moet zijn voor een nauwkeurige bepaling van de stofconcentratie. Het gebruik van watermonsters die te klein zijn om voldoende analysesignaal te verkrijgen, moet worden vermeden. Het gebruik van buitensporig grote watermonsters moet eveneens worden vermeden, aangezien er anders te weinig water over is voor het minimaal vereiste aantal analysen (n = 5). In aanhangsel 1 wordt het minimale monstervolume aangegeven als functie van het volume van het reactievat, de detectiegrens van de teststof en de oplosbaarheid van de teststof.

28. De kwantitatieve bepaling van de teststoffen geschiedt door de kalibratiecurven van de respectieve verbinding te vergelijken. De concentraties van de geanalyseerde monsters moeten vergezeld gaan van de concentraties van de standaarden.

29. Voor teststoffen met een geschatte log P_{OW} > 6 moet voorafgaand aan de extractie een surrogaatstandaard aan het watermonster worden gekoppeld om de tijdens extractie en preconcentratie van de watermonsters optredende verliezen te registeren. Voor een nauwkeurige recoverycorrectie moeten de eigenschappen van de surrogaten vrijwel of geheel overeenkomen met die van de teststof. Bij voorkeur worden voor dit doel stabiele, isotopisch gemerkte (bijvoorbeeld gedeutereerde of ^{13}C-gemerkte) analogen van de betreffende stoffen gebruikt. Indien het gebruik van gemerkte stabiele isotopen (bijvoorbeeld ^{2}H of ^{13}C) niet mogelijk is, moet op basis van betrouwbare gegevens in de literatuur worden aangetoond dat de fysisch-chemische eigenschappen van het surrogaat nagenoeg overeenkomen met die van de teststof. Bij vloeistof-vloeistofextractie van de waterfase kunnen zich emulsies vormen. Dit kan worden beperkt door zout toe te voegen en de emulsie gedurende de nacht te laten bezinken. De voor de extractie en de preconcentratie van de monsters gebruikte methoden dienen te worden vermeld.

30. Monsters die uit de 1-octanolfase zijn onttrokken, kunnen zo nodig voorafgaand aan de analyse worden verdund met een geschikt oplosmiddel. Bovendien wordt het gebruik van surrogaatstandaarden aanbevolen voor stoffen waarvoor recoveryexperimenten een grote mate van variatie hebben aangetoond in de recoveryexperimenten (een relatieve standaarddeviatie > 10 %).

31. De details van de analytische methode dienen te worden vermeld, waaronder de extractiemethode, de preconcentratie- en verdunningsfactoren, de instrumentparameters, de kalibratieprocedure, het kalibratiebereik, de analytische recovery van de teststof uit water, de toevoeging van surrogaatstandaarden voor recoverycorrectie, blancowaarden, detectiegrenzen en bepaalbaarheidsgrenzen.

Uitvoering van de test

Optimale volumeverhoudingen 1-octanol/water

32. Bij het kiezen van de water- en 1-octanolvolumes moet rekening worden gehouden met de bepaalbaarheidsgrenzen in 1-octanol en water, de preconcentratiefactoren die zijn toegepast op de watermonsters, de monstervolumes in 1-octanol en water, en de verwachte concentraties. Om experimentele redenen moet het volume 1-octanol in het langzaam-roerensysteem zodanig worden gekozen dat de 1-octanollaag dik genoeg is (> 0,5 cm) om een monster te kunnen nemen uit de 1-octanolfase zonder deze te verstoren.

33. Typische faseverhoudingen die worden gebruikt bij bepalingen van verbindingen met een log P_{OW} van 4,5 en hoger zijn 20 tot 50 ml 1-octanol en 950 tot 980 ml water in een 1 litervat.

▼**M4**

Testomstandigheden

34. Tijdens de test wordt het reactievat thermostatisch geregeld om de temperatuur tot op 1 °C constant te houden. De bepaling dient te worden uitgevoerd bij 25 °C.

35. De proefopstelling moet worden beschermd tegen daglicht, hetzij door het experiment in een donkere ruimte uit te voeren, hetzij door het reactievat met aluminiumfolie te bedekken.

36. Het experiment moet worden uitgevoerd in een (zo veel mogelijk) stofvrije omgeving.

37. Het 1-octanol-watersysteem wordt geroerd tot zich een evenwicht heeft ingesteld. In een pilotexperiment wordt de equilibratieperiode bepaald door een langzaam-roerenexperiment uit te voeren en op gezette tijden water- en 1-octanolmonsters te nemen. De monsters moeten worden genomen met een tussentijd van ten minste vijf uur.

38. Elke P_{OW}-bepaling moet worden uitgevoerd met ten minste drie onafhankelijke langzaam-roerenexperimenten.

Bepaling van de equilibratietijd

39. Aangenomen wordt dat zich een evenwicht heeft ingesteld wanneer een regressie van de 1-octanol/water-concentratieverhouding tegen de tijd over een periode van vier meetpunten een helling oplevert die niet significant afwijkt van nul bij een p-waarde van 0,05. De equilibratietijd is minimaal één dag voordat met de monsterneming kan worden begonnen. Als vuistregel geldt dat de monsterneming van stoffen met een geschatte log $P_{OW} < 5$ op de dagen twee en drie kan plaatsvinden. Bij meer hydrofobe verbindingen kan het zijn dat de equilibratieperiode moet worden verlengd. Voor een verbinding met log $P_{OW} = 8{,}23$ (decachloorbifenyl) waren 144 uur voldoende voor het instellen van een evenwicht. Of zich een evenwicht heeft ingesteld, wordt nagegaan door herhaaldelijk een monster te nemen uit hetzelfde reactievat.

Het experiment opstarten

40. Bij het opstarten van het experiment wordt het reactievat gevuld met 1-octanol verzadigd water. Vervolgens wordt gewacht totdat de thermostatisch ingestelde temperatuur is bereikt.

41. De gewenste hoeveelheid teststof (opgelost in het vereiste volume met water verzadigde 1-octanol) wordt voorzichtig toegevoegd in het reactievat. Dit is een cruciale stap in het experiment, daar turbulente menging van de twee fasen vermeden moet worden. Daartoe kan de 1-octanolfase langzaam worden gepipetteerd tegen de wand van het proefvat, vlak boven het wateroppervlak. Het zal dan langs de glaswand stromen en een film vormen boven op de waterfase. Het rechtstreeks schenken van 1-octanol in het vat moet te allen tijde worden vermeden; er mogen geen 1-octanoldruppels rechtstreeks in het water vallen.

42. Nadat met roeren is begonnen, wordt de roersnelheid langzaam opgevoerd. Als de roermotoren niet op de vereiste manier kunnen worden ingesteld, moet worden overwogen een transformator te gebruiken. De roersnelheid moet zodanig worden ingesteld dat op het raakvlak van het water en de 1-octanol een vortex van 0,5 tot maximaal 2,5 cm diepte wordt gevormd. De roersnelheid moet worden verlaagd als de vortexdiepte van 2,5 cm wordt overschreden, aangezien anders microdruppeltjes kunnen worden gevormd uit druppeltjes 1-octanol in de waterfase, die leiden tot een overschatting van de teststofconcentratie in het water. De maximale roersnelheid van 2,5 cm vortexdiepte wordt aanbevolen op basis van de bevindingen uit het als ringtest uitgevoerde validatieonderzoek (5). Het is een compromis tussen een snelle evenwichtsinstelling en beperking van de vorming van microdruppeltjes 1-octanol.

▼M4

Monsterneming en monsterbehandeling

43. Voordat een monster wordt genomen, moet de roerder worden uitgezet en moeten de vloeistoffen tot stilstand komen. Nadat het monster is genomen, wordt de roerder weer langzaam aangezet en wordt de roersnelheid weer geleidelijk opgevoerd, zoals hierboven beschreven.

44. Monsters uit de waterfase worden genomen via een kraan in de bodem van het reactievat. Het dode volume aan water dat zich in de kranen bevindt (in het in aanhangsel 2 beschreven vat ongeveer 5 ml) moet altijd worden weggegooid. Het water in de kranen wordt namelijk niet geroerd en is dan ook niet in evenwicht met de bulk. Noteer het volume van de watermonsters en zorg dat rekening wordt gehouden met de hoeveelheid teststof in het weggegooide water wanneer een massabalans wordt opgesteld. Verlies door verdamping moet zo veel mogelijk worden beperkt door het water rustig in de scheitrechter te laten lopen, zodat de water-1-octanollaag niet wordt verstoord.

45. 1-octanolmonsters worden verkregen door afname van een klein aliquot (ca. 100 µl) uit de 1-octanollaag met een 100 microliterspuit van glas en metaal. Pas op dat het grensvlak niet wordt verstoord. Het volume van het vloeistofmonster wordt opgeschreven. Een klein aliquot is voldoende, daar het 1-octanolmonster nog wordt verdund.

46. Om onnodige overbrengingsstappen van het monster te vermijden moet het monstervolume gravimetrisch worden bepaald. Bij watermonsters kan dit worden gedaan door het watermonster in een scheitrechter op te vangen die al de vereiste hoeveelheid oplosmiddel bevat.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

47. Volgens deze testmethode wordt de P_{OW} bepaald door drie langzaam-roerenexperimenten uit te voeren (drie proefnemingen) met de te onderzoeken verbinding, onder identieke omstandigheden. De regressie om aan te tonen dat evenwicht is bereikt, moet zijn gebaseerd op de resultaten van ten minste vier bepalingen van C_O/C_W op opeenvolgende tijdstippen. Op die manier kan de variantie worden berekend als maat voor de onzekerheid van de gemiddelde waarde die bij elke proefneming wordt verkregen.

48. De P_{OW} kan worden gekarakteriseerd door de variantie in de gegevens die in elke proefneming zijn verkregen. Deze informatie wordt gebruikt om de P_{OW} te berekenen als gewogen gemiddelde van de resultaten van de individuele proefnemingen. Daartoe wordt de inverse variantie van de resultaten van de proefnemingen als gewicht gebruikt. Op die manier zullen gegevens met een grote spreiding (uitgedrukt in de variantie), en dus een lagere betrouwbaarheid, minder invloed hebben op de uitkomst dan gegevens met een lage variantie.

49. Op soortgelijke wijze wordt de gewogen standaarddeviatie berekend. Dit is een maat voor de herhaalbaarheid van de P_{OW}-meting. Een lage waarde voor de gewogen standaarddeviatie geeft aan dat de P_{OW}-bepaling binnen hetzelfde laboratorium een hoge herhaalbaarheid had. De formele statische behandeling van de gegevens wordt hieronder geschetst.

▼M4

Verwerking van de resultaten

Het aantonen dat een evenwicht is bereikt

50. Voor iedere monstertijd wordt de logaritme berekend van de verhouding van de teststofconcentratie in 1-octanol en water (log (C_O/C_w)). Het bereiken van chemisch evenwicht wordt aangetoond door deze verhouding uit te zetten tegen de tijd. Als deze curve een plateau laat zien op basis van ten minste vier opeenvolgende tijdpunten toont dit aan dat een evenwicht is bereikt, en dat de verbinding daadwerkelijk in de 1-octanol is opgelost. Zo niet, dan moet de test worden voortgezet totdat vier opeenvolgende tijdpunten een helling opleveren die niet significant afwijkt van 0 bij een p-waarde van 0,05, hetgeen aangeeft dat log C_o/C_w niet langer afhangt van de tijd.

Berekening van log P_{OW}

51. De waarde van log P_{OW} van de proefneming wordt berekend als het gewogen gemiddelde van log C_o/C_w voor het deel van de curve van log C_o/C_w tegen de tijd waarvoor evenwicht is aangetoond. Het gewogen gemiddelde wordt berekend door de gegevens gewicht toe te kennen op basis van de inverse variantie, zodat de invloed van de gegevens op de einduitkomst omgekeerd evenredig is aan de onzekerheid van de gegevens.

Gemiddelde log P_{OW}

52. De gemiddelde waarde van log P_{OW} van de verschillende proefnemingen wordt berekend als het gemiddelde van de uitkomsten van de individuele proefnemingen, gewogen naar hun respectieve varianties.

De berekening gaat als volgt:

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

waarbij

$\log P_{OW,i}$ = de log P_{OW}-waarde van de individuele proefneming i;

$\log P_{OW,Av}$ = de gewogen gemiddelde waarde van de individuele log P_{OW}-bepalingen;

w_i = het statistische gewicht dat aan de log P_{OW}-waarde van proefneming i wordt toegekend.

Voor w_i wordt de reciproque waarde van de variantie van log $P_{OW,i}$ gebruikt ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. De fout in het gemiddelde van log P_{OW}, wordt geschat als de herhaalbaarheid van de log C_o/C_w die is bepaald in de evenwichtsfase in de verschillende proefnemingen, en deze wordt uitgedrukt als de gewogen standaarddeviatie van log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$), die op haar beurt een maat is voor de fout in log $P_{OW,Av}$. De gewogen standaarddeviatie kan als volgt worden berekend uit de gewogen variantie ($var_{\log\ Pow,Av}$):

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

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Het symbool n staat voor het aantal proefnemingen.

▼M4

Testverslag

54. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule (waarin de plaats van het label wordt aangegeven bij gebruik van een radioactief gemerkte stof) en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie punt 17),

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof,

— de zuiverheid van het label van gemerkte chemicaliën en molaire activiteit (indien van toepassing),

— de voorlopige schatting van log P_{OW}, alsmede de gebruikte methode om deze waarde af te leiden.

Testomstandigheden:

— de data waarop de onderzoeken zijn uitgevoerd,

— de temperatuur tijdens het experiment,

— de beginvolumes 1-octanol en water,

— de volumes van de 1-octanol- en watermonsters,

— de restvolumes 1-octanol en water in de testvaten,

— een beschrijving van de testvaten en de gebruikte roeromstandigheden (vorm van het roerstaafje en het testvat, vortexdiepte in mm en, indien beschikbaar, de roersnelheid),

— de gebruikte analysemethoden om de teststofconcentratie te bepalen en de bepaalbaarheidsgrens van de methode;

— de monsternemingsintervallen,

— de pH van de waterfase en de gebruikte buffers, wanneer de pH is bijgesteld voor ioniseerbare moleculen,

— het aantal replicaatbepalingen.

Resultaten:

— de herhaalbaarheid en de gevoeligheid van de gebruikte analysemethoden,

— de gemeten teststofconcentraties in 1-octanol en water in de tijd,

— de massabalans,

— de temperatuur en standaarddeviatie of het bereik van de temperatuur tijdens het experiment,

— een regressie van de concentratieverhouding tegen de tijd,

— de gemiddelde waarde voor log $P_{ow,Av}$ met standaardfout,

— een bespreking en interpretatie van de resultaten;

▼**M4**

— voorbeelden van onbewerkte gegevens van representatieve analysen (alle ruwe gegevens moeten worden opgeslagen overeenkomstig GLP-normen) inclusief recovery's van surrogaten, het aantal kalibratieniveaus (samen met de criteria voor de correlatiecoëfficiënt van de kalibratiecurve), en de resultaten van de kwaliteitsgarantie/kwaliteitscontrole (QA/QC),

— indien beschikbaar: validatierapport van de bepalingsmethode (op te nemen als referentie).

LITERATUUR:

(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) Hoofdstuk A.8 van deze bijlage, Verdelingscoëfficiënt.

(3) Hoofdstuk A.8 van deze bijlage, Verdelingscoëfficiënt.

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

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

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

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

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

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

(10) Hoofdstuk A.6 van deze bijlage, Oplosbaarheid in water.

(11) Hoofdstuk C.7 van deze bijlage, Afbraak — Niet-biologische afbraak: hydrolyse in afhankelijkheid van de pH.

(12) Hoofdstuk C.4 — Delen II tot en met VII (methoden A tot en met F) van deze bijlage, Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid.

(13) Hoofdstuk A.4 van deze bijlage, Dampspanning.

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

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

(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

Aanhangsel 1

Spreadsheet voor het berekenen van de minimaal benodigde volumes water voor de detectie van teststoffen met verschillende log P_{OW}-waarden in de waterfase

Aannamen:

— het maximumvolume van de individuele aliquots = 10 % van het totaalvolume; 5 aliquots = 50 % van het totaalvolume,

— de concentratie van de teststoffen = 0,7 × de oplosbaarheid in beide fasen. Bij lagere concentraties zouden grotere volumes nodig zijn,

— het volume voor het bepalen van de detectiegrens = 100 ml,

— log P_{ow} tegen log S_w en log P_{ow} tegen SR (S_{oct}/S_w) zijn goede manieren om de verbanden voor teststoffen weer te geven.

Geschatte S_w

Log P_{ow}	Vergelijking	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

Geschatte S_{oct}

Log P_{ow}	Vergelijking	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Totale massa test-stof (mg)	$Massa_{oct}/Massa_{water}$	$Massa_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Massa_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Berekening volumes

Minimaal benodigd volume voor de H_2O-fase bij iedere detectiegrensconcentratie

Log K_{ow}	Detectiegrens (mg/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
Gebruikt volume voor detectiegrens (l)	0,1					

Verklaring bij berekeningen

Staat voor < 10 % van het totaalvolume van de waterfase in een equilibratievat van 1 liter.

Staat voor < 10 % van het totaalvolume van de waterfase in een equilibratievat van 2 liter.

Staat voor < 10 % van het totaalvolume van de waterfase in een equilibratievat van 5 liter.

Staat voor < 10 % van het totaalvolume van de waterfase in een equilibratievat van 10 liter.

Is zelfs meer dan 10 % in een equilibratievat van 10 liter.

▼**M4**

Overzicht van de benodigde volumes als functie van de oplosbaarheid in water en log P_{ow}

Minimaal benodigd volume voor de H_2O-fase bij elke detectiegrensconcentratie (ml)

Log P_{ow}	S_w (mg/l)	Detectiegrens (mg/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

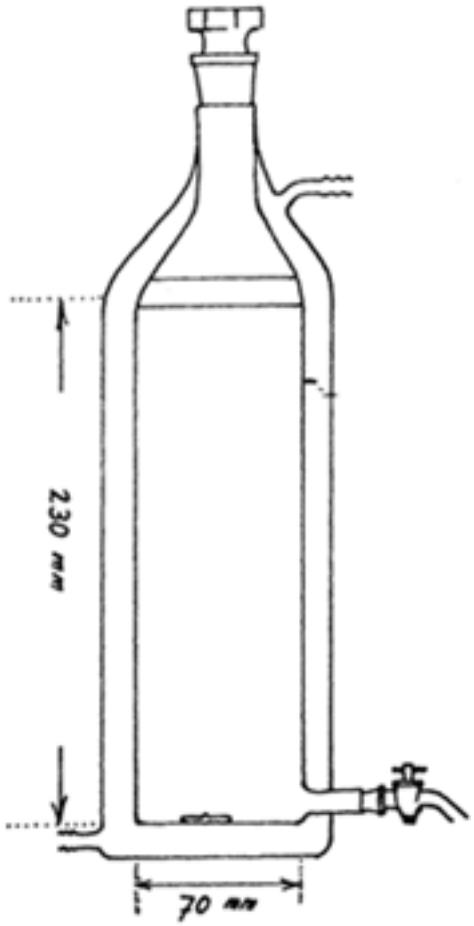
▼**M4**

Log P_{ow}	S_w (mg/l)	Detectiegrens (mg/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
Gebruikt volume voor detectiegrens (l)		0,1					

▼M4

Aanhangsel 2

Voorbeeld van een dubbelwandig glazen testvat voor de bepaling van P_{OW} met de langzaam-roerenmethode



▼M6

A.24. VERDELINGSCOËFFICIËNT (N-OCTANOL/WATER), HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE-METHODE (HPLC)

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 117 (2004) van de OESO.

1. De verdelingscoëfficiënt (P) is gedefinieerd als de verhouding van de evenwichtsconcentraties van een opgeloste stof in een tweefasensysteem bestaande uit twee in hoge mate niet mengbare oplosmiddelen. Voor n-octanol en water:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{water}}}$$

De verdelingscoëfficiënt is het quotiënt van twee concentraties en is daarom dimensieloos; deze waarde wordt meestal opgegeven als een logaritme met grondtal tien.

2. P_{ow} is een belangrijke parameter in onderzoeken naar het lot van chemische stoffen in het milieu. Er is een zeer duidelijk verband aangetoond tussen de P_{ow} van de niet-geïoniseerde vorm van stoffen en hun bioaccumulatie in vissen. De P_{ow} is ook een bruikbare parameter gebleken bij het voorspellen van adsorptie aan grond en sedimenten en het vaststellen van kwantitatieve structuur-activiteitrelaties voor een groot aantal verschillende biologische effecten.

3. Het eerste voorstel voor deze testmethode was gebaseerd op een artikel van C.V. Eadsforth en P. Moser (1). De ontwikkeling van de testmethode en een interlaboratorium-vergelijkingstest van de OESO werden in 1986 gecoördineerd door het Umweltbundesamt van de Bondsrepubliek Duitsland (2).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

4. Log P_{ow}-waarden in het bereik van – 2 tot 4 (soms tot 5 en hoger) ([1]) kunnen experimenteel worden bepaald met de schudflesmethode (hoofdstuk A.8 van deze bijlage, testrichtlijn 107 van de OESO). De HPLC-methode is geschikt voor het bepalen van verdelingscoëfficiënten in het log P_{ow}-bereik van 0 tot 6 (1) (2) (3) (4) (5). Voor deze methode kan een schatting van de P_{ow} nodig zijn om geschikte referentiestoffen aan te wijzen en conclusies getrokken uit de meetgegevens van de test te ondersteunen. Een beknopte beschrijving van berekeningsmethoden is te vinden in het aanhangsel bij deze testmethode. De HPLC wordt isocratisch uitgevoerd.

5. De P_{ow}-waarden zijn afhankelijk van de omgevingsomstandigheden, zoals temperatuur, pH, ionsterkte enz., en deze moeten in het experiment gedefinieerd worden om de P_{ow}-gegevens goed te kunnen interpreteren. Voor ioniseerbare stoffen komt mogelijk een andere methode beschikbaar (bv. ontwerprichtlijn van de OESO betreffende een pH-metrische methode voor geïoniseerde stoffen (6)) die als alternatief kan worden gebruikt. Hoewel de methode volgens deze OESO-ontwerprichtlijn geschikt kan zijn voor de bepaling van de P_{ow} voor ioniseerbare stoffen, is het in sommige gevallen beter om de HPLC-methode te gebruiken bij een voor het milieu relevante pH.

([1]) Er wordt een bovengrens opgegeven omdat het nodig is een fase van volledige scheiding te bereiken na aanpassingen van het verdelingsevenwicht en voordat monsters worden verwijderd voor analyse. Als de nodige zorgvuldigheid in acht wordt genomen kan de bovengrens worden opgeschoven naar hogere waarden van P_{ow}.

▼**M6**

PRINCIPE VAN DE METHODE

6. Reversed phase HPLC wordt uitgevoerd met analytische kolommen, gepakt met een in de handel verkrijgbare vaste fase bestaande uit chemisch aan silica gebonden lange koolwaterstofketens (bv. C8, C18).

7. Een in zo'n kolom geïnjecteerde chemische stof wordt door de mobiele fase meegevoerd door de kolom en verdeelt zich daarbij tussen de mobiele oplosmiddelfase en de stationaire koolwaterstoffase. De mate waarin stoffen worden vastgehouden is evenredig met hun koolwaterstof/water-verdelingscoëfficiënt, waarbij hydrofiele stoffen het eerst elueren en lipofiele stoffen het laatst. De retentietijd wordt beschreven door de capaciteitsfactor k, met de volgende formule:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

waarbij t_R de retentietijd van de teststof is, en t_0 de dode tijd, d.w.z. de gemiddelde tijd die een oplosmiddelmolecuul nodig heeft om door de kolom te lopen. Kwantitatieve analysemethoden zijn niet vereist, alleen de retentietijd moet worden bepaald.

8. De octanol/water-verdelingscoëfficiënt van een teststof kan berekend worden door de capaciteitsfactor k van de stof experimenteel te bepalen en deze waarde vervolgens in te vullen in de volgende vergelijking:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log\ k$$

waarbij:

a, b = lineaire regressiecoëfficiënten.

Bovenstaande vergelijking kan worden verkregen door lineaire regressie van de logaritme van de octanol/water-verdelingscoëfficiënten van referentiestoffen tegen de logaritme van de capacteitsfactoren van de referentiestoffen.

9. Met de reversed phase HPLC-methode kunnen verdelingscoëfficiënten in het log P_{ow}-bereik van 0 tot 6 worden geschat, en in uitzonderlijke gevallen kan dit worden uitgebreid met het log P_{ow}-bereik van 6 tot 10. Hiervoor kan het nodig zijn de mobiele fase aan te passen (3). De methode kan niet worden gebruikt voor sterke zuren en basen, metaalcomplexen, stoffen die met het eluens reageren en oppervlakteactieve stoffen. Er kunnen metingen worden uitgevoerd met ioniseerbare stoffen in hun niet-geïoniseerde vorm (vrij zuur of vrije base) door een geschikte buffer te gebruiken met een pH onder de pK_a voor een vrij zuur of boven de pK_a voor een vrije base. De pH-metrische methode voor het testen van ioniseerbare stoffen (6) komt mogelijk beschikbaar en zou als alternatieve methode kunnen worden gebruikt (6). Als de log P_{ow} wordt bepaald voor gebruik bij de indeling van milieugevaren of beoordeling van het milieurisico, moet de test worden uitgevoerd in het pH-bereik dat relevant is voor de natuurlijke omgeving, d.w.z. in het pH-bereik 5,0 - 9.

10. In sommige gevallen kunnen verontreinigingen de interpretatie van de resultaten bemoeilijken vanwege onzekerheid bij het benoemen van de pieken. Voor mengsels die een band van niet volledig gescheiden pieken geven, moeten de boven- en ondergrens van de log P_{ow}, en het oppervlaktepercentage van elke log P_{ow}-piek worden gerapporteerd. Voor mengsels die uit een groep homologen bestaan moet ook de log P_{ow} als gewogen gemiddelde worden opgegeven (7), berekend op basis van de individuele P_{ow}-waarden en de desbetreffende oppervlaktepercentages (8). Alle pieken die meer dan 5 % van de totale piekoppervlakte uitmaken, moeten in de berekening worden meegenomen (9).

▼**M6**

$$\textit{gewogen gemiddelde } \log\ P_{ow} = \frac{\sum_i (\log\ P_{owi})(\textit{oppervlakte \%})}{\textit{totale piekoppervlakte \%}} = \frac{\sum (\log\ P_{owi})(\textit{oppervlakte \%}_i)}{\sum_i \textit{oppervlakte \%}}$$

Het gewogen gemiddelde van log P_{ow} is alleen geldig voor stoffen of mengsels (bv. tallolie) die uit homologen bestaan (bv. een reeks alkanen). Metingen aan mengsels kunnen betekenisvolle resultaten opleveren mits de voor analyse gebruikte detector dezelfde gevoeligheid heeft voor alle stoffen in het mengsel en het scheidend vermogen voldoende groot is.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

11. De dissociatieconstante, de structuurformule en de oplosbaarheid in de mobiele fase moeten bekend zijn voordat de methode wordt gebruikt. Daarnaast is informatie over hydrolyse nuttig.

KWALITEITSCRITERIA

12. Om de betrouwbaarheid van de meting te vergroten moeten de bepalingen in duplo worden uitgevoerd.

— Herhaalbaarheid: De log P_{ow}-waarden die worden afgeleid uit herhaalde metingen onder identieke omstandigheden en met dezelfde set referentiestoffen mogen niet meer dan 0,1 log-eenheden van elkaar verschillen.

— Reproduceerbaarheid: De resultaten van herhaalde metingen met een verschillende set referentiestoffen mogen verschillend zijn. De correlatiecoëfficiënt R voor het verband tussen log k en log P_{ow} voor een set teststoffen ligt doorgaans rond 0,9, wat neerkomt op een octanol/waterverdelingscoëfficiënt van log P_{ow} ± 0,5 log-eenheden.

13. De interlaboratorium-vergelijkingstest heeft uitgewezen dat met de HPLC-methode log P_{ow}-waarden kunnen worden verkregen die minder dan ± 0,5 eenheden verschillen van de schudfleswaarden (2). Andere vergelijkingen zijn terug te vinden in de literatuur (4) (5) (10) (11) (12). Correlatiegrafieken op basis van structureel verwante referentiestoffen geven de meest nauwkeurige resultaten (13).

REFERENTIESTOFFEN

14. Om de gemeten capaciteitsfactor k van een stof te kunnen correleren met zijn P_{ow}, moet een ijklijn worden gemaakt met ten minste 6 punten (zie punt 24). Het is aan de gebruiker de geschikte referentiestoffen te kiezen. De log P_{ow}-waarden van de referentiestoffen moeten normaal gesproken zodanig zijn dat ze de log P_{ow} van de teststof omvatten, dat wil zeggen dat ten minste één referentiestof een P_{ow} moet hebben boven die van de teststof, en een andere een P_{ow} onder die van de teststof. Extrapolatie dient alleen in uitzonderlijke gevallen te worden gebruikt. De referentiestoffen zijn bij voorkeur structureel verwant met de teststof. De log P_{ow}-waarden van de voor de ijking gebruikte referentiestoffen moeten op betrouwbare experimentele gegevens zijn gebaseerd. Voor stoffen met een hoge log P_{ow} (in de regel hoger dan 4) mogen berekende waarden worden gebruikt, tenzij er betrouwbare experimentele gegevens beschikbaar zijn. Als geëxtrapoleerde waarden worden gebruikt, moet een grenswaarde worden opgegeven.

15. Er zijn uitgebreide lijsten beschikbaar met log P_{ow}-waarden voor een groot aantal groepen van chemische stoffen (14) (15). Als er geen gegevens over de verdelingscoëfficiënt van structureel verwante stoffen beschikbaar zijn, mag een meer algemene ijking worden toegepast met andere referentiestoffen. Aanbevolen referentiestoffen en hun P_{ow}-waarden zijn vermeld in tabel 1. Voor ioniseerbare stoffen hebben de vermelde waarden betrekking op de niet-geïoniseerde vorm. De aannemelijkheid en kwaliteit van de waarden werden gecontroleerd tijdens de interlaboratorium-vergelijkingstest.

▼**M6**

Tabel 1

Aanbevolen referentiestoffen

	CAS-nummer	Referentiestof	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-Butanon (Methylethylketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-Acetylpyridine	0,5	
3	62-53-3	Aniline	0,9	
4	103-84-4	Aceetanilide	1,0	
5	100-51-6	Benzylalcohol	1,1	
6	150-76-5	4-Methoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	fenoxyazijnzuur	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	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Fenylacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-Methylbenzylalcohol	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-Nitrobenzoëzuur	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Chlooraniline	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzeen	1,9	
18	104-54-1	Cinnamylalcohol (kaneelalcohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzoëzuur	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Kresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kaneelzuur	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisool	2,1	
23	93-58-3	Methylbenzoaat	2,1	
24	71-43-2	Benzeen	2,1	
25	99-04-7	3-Methylbenzoëzuur	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Chloorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichloorethyleen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazine	2,6	
29	93-89-0	Ethylbenzoaat	2,6	

▼**M6**

	CAS-nummer	Referentiestof	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-Dichloorbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-Chloorbenzoëzuur	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Tolueen	2,7	
33	90-15-3	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dichlooraniline	2,8	
35	108-90-7	Chloorbenzeen	2,8	
36	1746-13-0	Allylfenylether	2,9	
37	108-86-1	Broombenzeen	3,0	
38	100-41-4	Ethylbenzeen	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-Fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Thymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Dichloorbenzeen	3,4	
43	122-39-4	Difenylamine	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftaleen	3,6	
45	93-99-2	Fenylbenzoaat	3,6	
46	98-82-8	Isopropylbenzeen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Trichloorfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenyl	4,0	
49	120-51-4	Benzylbenzoaat	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sec-butylfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Trichloorbenzeen	4,2	
52	143-07-7	Dodecaanzuur	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenylether	4,2	
54	85-01-8	Fenantreen	4,5	
55	104-51-8	n-Butylbenzeen	4,6	
56	103-29-7	Dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Difenylpyridine	4,9	
58	206-44-0	Fluorantheen	5,1	
59	603-34-9	Trifenylamine	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Oriënterende schatting van de verdelingscoëfficiënt

16. Indien nodig kan de verdelingscoëfficiënt van de teststof worden geschat, bij voorkeur met een berekeningsmethode (zie aanhangsel) of, waar van toepassing, op basis van de verhouding van de oplosbaarheidswaarden van de teststof in de zuivere oplosmiddelen.

Apparatuur

17. Benodigd is een vloeibare-fase-chromatograaf uitgerust met een licht pulserende pomp en een geschikt detectiesysteem. Een UV-detector, ingesteld op een golflengte van 210 nm, of een brekingsindexdetector is toepasbaar voor de grote verscheidenheid van chemische groepen. De aanwezigheid van polaire groepen in de stationaire fase kan de prestaties van de HPLC-kolom in ernstige mate nadelig beïnvloeden. Om deze reden dienen stationaire fasen een zo klein mogelijk percentage polaire groepen te bevatten (16). Men kan gebruik maken van in de handel verkrijgbare, uit microdeeltjes bestaande reversed phase-pakkingen of van voorgepakte kolommen. Tussen het injectiesysteem en de analytische kolom kan een voorkolom worden geïnstalleerd.

Mobiele fase

18. Voor de bereiding van het elutiemiddel worden methanol van HPLC-kwaliteit en gedestilleerd of gedeïoniseerd water gebruikt, en het elutiemiddel wordt voor gebruik ontgast. De elutie dient isocratisch te worden uitgevoerd. Er moeten methanol/water-verhoudingen met een wateraandeel van minimaal 25 % worden gebruikt. Een 3:1 (v/v) methanol/water-mengsel voldoet meestal goed om stoffen met een log P van 6 binnen een uur te elueren bij een debiet van 1 ml/minuut. Voor stoffen met een log P groter dan 6 kan het nodig zijn de elutietijd te verkorten (en ook die voor de referentiestoffen) door de polariteit van de mobiele fase te verlagen of de kolomlengte te reduceren.

19. De teststof en de referentiestoffen moeten zodanig goed oplosbaar zijn in de mobiele fase dat hun concentraties detecteerbaar zijn. Aan het methanol/water-mengsel mogen alleen in uitzonderlijke gevallen hulpstoffen worden toegevoegd, aangezien ze de eigenschappen van de kolom veranderen. In die gevallen moet bevestigd worden dat de retentietijd van de test- en referentiestoffen niet wordt beïnvloed. Als methanol/water niet voldoet, kunnen andere mengsels van een organisch oplosmiddel en water worden gebruikt, bij voorbeeld ethanol/water, acetonitril/water of isopropylacohol (2-propanol)/water.

20. Voor ioniseerbare stoffen is de pH van het eluens kritisch. Deze moet in het functionele pH-bereik van de kolom liggen, gewoonlijk tussen 2 en 8. Bufferen wordt aangeraden. Zoutprecipitatie en achteruitgang van de kolom, verschijnselen die zich bij sommige mengsels van een organische fase en een buffer kunnen voordoen, moeten worden vermeden. HPLC-metingen met stationaire fasen op basis van silica bij een pH hoger dan 8 worden doorgaans afgeraden, omdat door het gebruik van een alkalische mobiele fase de kolomprestaties snel kunnen afnemen.

Oplossingen

21. De test- en referentiestoffen moeten voldoende zuiver zijn om de pieken in de chromatogrammen te kunnen toewijzen aan de respectieve stoffen. Stoffen die voor test- of ijkdoeleinden worden gebruikt, worden zo mogelijk in de mobiele fase opgelost. Als voor het oplossen van de test- en referentiestoffen een ander oplosmiddel dan de mobiele fase wordt gebruikt, moet de mobiele fase worden gebruikt voor de laatste verdunningsstap voorafgaand aan injectie.

Testomstandigheden

22. De temperatuur tijdens de meting mag niet meer variëren dan ± 1 °C.

▼M6

Bepaling van de dode tijd t_o

23. De dode tijd t_0 kan worden gemeten met behulp van organische stoffen die niet worden vastgehouden (bv. thioureum of formamide). Een nauwkeurigere waarde voor de dode tijd kan worden afgeleid uit de gemeten retentietijden van een set van ongeveer zeven stoffen uit een homologe reeks (bv. alkylmethylketonen) (17). De retentietijden t_R (n_C + 1) worden uitgezet tegen t_R (n_C), waarbij n_C het aantal koolstofatomen is. Er wordt een rechte lijn, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, verkregen waarbij A, zijnde k(n_C + 1)/k(n_C), constant is. De dode tijd t_0 wordt verkregen uit het snijpunt met de y-as (1 – A)t_0 en de helling A.

Regressievergelijking

24. De volgende stap bestaat uit het maken van een correlatiegrafiek van log k versus log P voor geschikte referentiestoffen met log P-waarden in de buurt van de waarde die voor de teststof wordt verwacht. In de praktijk worden 6 tot 10 referentiestoffen gelijktijdig geïnjecteerd. De retentietijden worden bepaald, bij voorkeur met een recorder/integrator die is aangesloten op het detectiesysteem. De corresponderende logaritmen van de capaciteitsfactoren, log k, worden uitgezet als functie van log P. De regressievergelijking wordt met regelmatige tussenpozen, ten minste eenmaal per dag, uitgevoerd zodat eventuele veranderingen in de prestaties van de kolom in aanmerking kunnen worden genomen.

BEPALING VAN DE P_{OW} VAN DE TESTSTOF

25. De teststof wordt in de kleinste detecteerbare hoeveelheden geïnjecteerd. De retentietijd wordt in duplo bepaald. De verdelingscoëfficiënt van de teststof wordt verkregen door interpolatie van de berekende capaciteitsfactor in de ijkgrafiek. Voor zeer lage en zeer hoge verdelingscoëfficiënten is extrapolatie noodzakelijk. Vooral in deze gevallen moet aandacht worden besteed aan de betrouwbaarheidsgrenzen van de regressielijn. Als de retentietijd van een teststof buiten het voor de referentiestoffen verkregen bereik valt, moet een grenswaarde worden opgegeven.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Testverslag

26. In het verslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

— de eventuele oriënterende schatting van de verdelingscoëfficiënt, de geschatte waarden en de gebruikte methode, en indien een berekeningsmethode werd gebruikt, een volledige beschrijving daarvan inclusief opgave van de database en uitgebreide informatie over de keuze van de fragmenten;

— test- en referentiestoffen: zuiverheid, structuurformule en CAS-nummer;

— beschrijving van de apparatuur en chromatografische omstandigheden: analytische kolom, voorkolom;

— mobiele fase, manier van detectie, temperatuurbereik, pH;

— elutieprofielen (chromatogrammen);

— dode tijd en hoe deze werd gemeten;

— gemeten retentiewaarden en log P_{ow}-waarden uit de literatuur voor de bij de ijking gebruikte referentiestoffen;

— details van de gefitte regressielijn (log k versus log P_{ow}), de correlatiecoëfficiënt van de lijn met de betrouwbaarheidsintervallen;

▼**M6**

— gemiddelde van de gemeten retentiewaarden en de geïnterpoleerde log P_{ow} waarde voor de teststof;

— in het geval van een mengsel: chromatogram met het elutieprofiel, met aangegeven grenswaarden;

— log P_{ow}-waarden in relatie tot het oppervlaktepercentage van de log P_{ow}-piek;

— berekening met behulp van een regressielijn;

— log P_{ow}-waarden als berekend gewogen gemiddelde, indien van toepassing.

LITERATUUR

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and 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 and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and 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 and 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 and 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 and 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 and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

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

(16) R. F. Rekker, 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, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Aanhangsel

Methoden voor de berekening van P_{OW}

INLEIDING

1. In dit aanhangsel wordt een korte inleiding gegeven tot de berekening van P_{ow}. Voor meer informatie wordt de lezer naar handboeken verwezen (1) (2).

2. Berekende waarden van P_{ow} worden gebruikt om:

   — te beslissen welke experimentele methode moet worden gebruikt: de schudflesmethode bij een log P_{ow} tussen – 2 en 4 en de HPLC-methode bij een log P_{ow} tussen 0 en 6;

   — de juiste HLPC-omstandigheden te kiezen (referentiestoffen, methanol/water-verhouding);

   — de aannemelijkheid van experimenteel verkregen waarden te controleren;

   — een schatting te geven in het geval er geen experimentele methoden kunnen worden toegepast.

Principe van de berekeningsmethoden

3. Alle voorgestelde berekeningsmethoden zijn gebaseerd op de theoretische fragmentatie van het molecuul in geschikte substructuren waarvoor betrouwbare P_{ow}-fragmentwaarden bekend zijn. De log P_{ow} van het volledige molecuul wordt dan berekend als de som van de fragmentwaarden en de correctietermen voor intramoleculaire interacties. Lijsten van fragmentconstanten en correctietermen zijn te vinden in de literatuur (1) (2) (3) (4) (5) (6). Sommige hiervan worden regelmatig bijgewerkt (3).

Betrouwbaarheid van berekende waarden

4. Over het algemeen neemt de betrouwbaarheid van berekeningsmethoden af naarmate de complexiteit van de onderzochte stof toeneemt. Voor eenvoudige moleculen met een laag molecuulgewicht en slechts één of twee functionele groepen kan een afwijking van 0,1 tot 0,3 log P_{ow}-eenheden worden verwacht tussen de resultaten van de verschillende fragmentatiemethoden en de gemeten waarden. De foutmarge is afhankelijk van de betrouwbaarheid van de gebruikte fragmentconstanten, het vermogen om intramoleculaire interacties (bv. waterstofbruggen) te herkennen en het juiste gebruik van correctietermen. In het geval van ioniserende stoffen moeten de lading en mate van ionisatie in aanmerking worden genomen (10).

Fujita-Hansch π -methode

5. De hydrofobe-substituent-constante, π, die door Fujita et al. werd geïntroduceerd (7), wordt gedefinieerd als:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

waarbij PhX een aromatisch derivaat is en PhH de moederstof.

$$\begin{aligned} \text{bv.}\quad ^{\pi}Cl &= \log Pow\ (C6H5Cl) - \log P_{ow}\ (C6H6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

De π-methode is hoofdzakelijk van belang voor aromatische stoffen. π voor een groot aantal substituenten zijn de π -waarden beschikbaar (4) (5).

Rekker-Methode

6. Volgens de Rekker-methode (8) wordt de log P_{ow}-waarde als volgt berekend:

$$LogP_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interactietermen})$$

▼M6

waarbij a_i het aantal keren is dat een bepaald fragment in het molecuul voorkomt en f_i de log P_{ow}-toename van het fragment is. De interactietermen kunnen worden uitgedrukt als een gehele veelvoud van één enkele constante C_m (de zogenaamde „magische constante"). De fragmentconstanten f_i en C_m zijn bepaald op grond van een lijst van 1 054 experimentele P_{ow}-waarden (825 stoffen) met behulp van meervoudige regressieanalyse (6) (8). De bepaling van de interactietermen wordt uitgevoerd volgens vaste regels (6) (8) (9).

Hansch-Leo-methode

7. Volgens de methode volgens Hansch en Leo (4) wordt de log P_{ow}-waarde berekend als:

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

waarbij f_i een fragmentconstante is, F_j een correctieterm (factor), a_i en b_j de corresponderende frequentie van voorkomen. Uit experimentele P_{ow}-waarden zijn door „trial and error" lijsten van fragmentwaarden voor atomen en groepen en van correctietermen F_j afgeleid. De correctietermen zijn ingedeeld in verschillende klassen (1) (4). Er zijn softwarepakketten ontwikkeld voor berekeningen waarbij alle regels en correctietermen in aanmerking worden genomen (3).

GECOMBINEERDE METHODE

8. De berekening van de log P_{ow} van complexe moleculen kan aanzienlijk worden verbeterd als het molecuul wordt opgesplitst in grotere substructuren waarvoor betrouwbare log P_{ow}-waarden beschikbaar zijn, hetzij uit tabellen (3) (4) of uit bestaande metingen. Zulke fragmenten (bv. heterocyclische structuren, antrachinon, azobenzeen) kunnen dan gecombineerd worden met de π-waarden volgens Hansch of met de fragmentconstanten volgens Rekker of Leo.

Opmerkingen

i) Voor gedeeltelijk of volledig geïoniseerde stoffen kunnen de berekeningsmethoden alleen worden toegepast wanneer rekening wordt gehouden met de nodige correctiefactoren.

ii) Als de aanwezigheid van intramoleculaire waterstofbruggen kan worden aangenomen, moeten de desbetreffende correctietermen (ongeveer + 0,6 tot + 1,0 log P_{ow}-eenheden) bij het resultaat worden opgeteld (1). Aanwijzingen voor de aanwezigheid van waterstofbruggen kunnen uit stereomodellen of spectroscopische gegevens worden verkregen.

iii) Als meerdere tautomere vormen mogelijk zijn, moet de berekening gebaseerd worden op de meest waarschijnlijke vorm.

iv) Het is belangrijk de herzieningen van lijsten van fragmentconstanten in de gaten te houden.

LITERATUUR OVER BEREKENINGSMETHODEN

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

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

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

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, 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 & 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 and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

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

▼M7

A.25. DISSOCIATIECONSTANTEN IN WATER (TITRATIE-METHODE — SPECTROFOTOMETRISCHE METHODE — CONDUCTOMETRISCHE METHODE)

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 112 (1981) van de OESO.

Voorwaarden

— Geschikte analysemethode

— Oplosbaarheid in water

Begeleidende informatie

— Structuurformule

— Elektrische geleidbaarheid voor conductometrische methode

Kwalificerende opmerkingen

— Alle testmethoden mogen worden uitgevoerd op zuivere stoffen of op stoffen van handelskwaliteit. Er dient rekening te worden gehouden met de mogelijke effecten van verontreinigingen op de resultaten.

— De titratiemethode is niet geschikt voor stoffen met een lage oplosbaarheid (zie Testoplossingen hieronder).

— De spectrofotometrische methode is uitsluitend toepasbaar op stoffen die voor de gedissocieerde en niet-gedissocieerde vormen aanmerkelijk verschillen met betrekking tot het absorptiespectrum in uv/zichtbaar licht. Deze methode kan ook geschikt zijn voor stoffen met een lage oplosbaarheid en voor niet-zuur/base-dissociaties, bv. complexvorming.

— In gevallen waarin de Onsager-vergelijking van toepassing is, kan de conductometrische methode worden gebruikt, zelfs bij matig lage concentraties en zelfs voor niet-zuur/base-evenwichten.

Standaarddocumenten

Deze testmethode is gebaseerd op methoden die worden genoemd in de referenties onder Literatuur, en op de Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notices van het EPA van 18 augustus 1978.

METHODE — INLEIDING, DOEL, TOEPASSINGSGEBIED, RELEVANTIE, TOEPASSING EN BEPERKINGEN VAN DE TEST

De dissociatie van een stof in water is van belang bij de beoordeling van het effect van de stof op het milieu. Zij bepaalt de vorm van de stof, die op zijn beurt het gedrag en transport van de stof bepaalt. Ze kan van invloed zijn op de adsorptie van de chemische stof op bodems en sedimenten en op de absorptie in biologische cellen.

Definities en eenheden

Dissociatie is de omkeerbare splitsing in twee of meer chemische vormen, die ionisch kunnen zijn. Het proces wordt doorgaans beschreven door

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

en de concentratie-evenwichtsconstante die de reactie bepaalt, is

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

Voorbeeld: in het bijzondere geval waarin R waterstof is (de stof is een zuur), is de constante gelijk aan

▼M7

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

of

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

Referentiestoffen

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof de volgende referentiestoffen te gebruiken. Ze worden vooral gegeven zodat de methode van tijd tot tijd kan worden geijkt en om de resultaten te kunnen vergelijken wanneer een andere methode wordt toegepast.

	pKa ([1])	Temp. in °C
p-Nitrofenol	7,15	251 ([1])
Benzoëzuur	4,12	20
p-Chlooraniline	3,93	20

([1]) Er is geen waarde voor 20 °C beschikbaar, maar er kan worden aangenomen dat de variabiliteit van de meetresultaten groter is dan de te verwachten temperatuurafhankelijkheid

Het is nuttig een stof met meerdere pK's te hebben, zoals hieronder aangegeven in Principe van de testmethode. Een voorbeeld van een dergelijke stof is:

Citroenzuur	pK_a (8)	Temp. in °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Principe van de testmethode

Het beschreven chemische proces is in het voor het milieu relevante temperatuurbereik doorgaans slechts beperkt van de temperatuur afhankelijk. Voor de bepaling van de dissociatieconstante is een meting van de concentraties van de gedissocieerde en niet-gedissocieerde vormen van de chemische stof nodig. Op basis van de kennis van de stoichiometrie van de dissociatiereactie zoals hierboven in Definities en eenheden vermeld, kan de juiste constante worden bepaald. In het bijzondere geval dat in deze testmethode wordt beschreven, gedraagt de stof zich als een zuur of een base, en de bepaling kan het gemakkelijkst geschieden door de relatieve concentraties van de geïoniseerde en niet-geïoniseerde vormen van de stof en de pH van de oplossing te bepalen. Het verband tussen deze termen wordt hierboven gegeven in de vergelijking voor pK_a in Definities en eenheden. Sommige stoffen vertonen meer dan één dissociatieconstante, waarvoor vergelijkbare vergelijkingen kunnen worden opgesteld. Enkele van de hierin beschreven methoden zijn ook geschikt voor niet-zuur/base-dissociatie.

Kwaliteitscriteria

Herhaalbaarheid

De dissociatieconstante moet in duplo worden bepaald (minimaal drie bepalingen) tot op ± 0,1 log-eenheden.

BESCHRIJVING VAN DE TESTPROCEDURES

Er zijn twee basisbenaderingen om pK_a te bepalen. Bij de ene wordt een bekende hoeveelheid van de stof getitreerd met standaardzuur of -base, naargelang het geval; bij de andere worden de relatieve concentratie van de geïoniseerde en niet-geïoniseerde vormen en de pH-afhankelijkheid daarvan bepaald.

▼M7

Voorbereidingen

Op deze beginselen gebaseerde methoden kunnen worden ingedeeld als titratie-, spectrofotometrische en conductometrische procedures.

Testoplossingen

Voor de titratiemethode en conductometrische methode wordt de chemische stof opgelost in gedestilleerd water. Voor de spectrofotometrische en overige methoden worden bufferoplossingen gebruikt. De concentratie van de teststof mag niet hoger zijn dan het minimum van 0,01 M of, als dat lager is, de helft van de verzadigingsconcentratie, en bij het bereiden van de oplossingen wordt een zo zuiver mogelijke vorm van de stof gebruikt. Als de stof slechts matig oplosbaar is, kan zij vóór toevoeging aan de hierboven genoemde concentraties worden opgelost in een kleine hoeveelheid van een met water mengbaar oplosmiddel.

Oplossingen worden met een Tyndall-kegel gecontroleerd op de aanwezigheid van emulsies, vooral als er een co-oplosmiddel is gebruikt om de oplosbaarheid te vergroten. Wanneer bufferoplossingen worden gebruikt, mag de bufferconcentratie niet hoger zijn dan 0,05 M.

Testomstandigheden

Temperatuur

De temperatuur wordt geregeld tot op ± 1 °C of beter. De bepaling vindt bij voorkeur plaats bij 20 °C.

Als een aanzienlijke temperatuurafhankelijkheid wordt vermoed, vindt de bepaling ook plaats bij ten minste twee andere temperaturen. De temperatuurintervallen zijn in dit geval 10 °C en de temperatuur wordt geregeld tot op ± 0,1 °C.

Analyses

De methode wordt bepaald door de aard van de stof die wordt getest. Zij moet voldoende gevoelig zijn om de verschillende vormen bij elke concentratie van de testoplossing te kunnen bepalen.

Uitvoering van de test

Titratiemethode

De testoplossing wordt bepaald door titratie met de basische of zure standaardoplossing, naargelang hetgeen van toepassing is, waarbij na elke toevoeging van titrant de pH wordt gemeten. Er moeten ten minste 10 incrementele toevoegingen plaatsvinden vóór het equivalentiepunt. Als het evenwicht voldoende snel wordt bereikt, mag een registrerende potentiometer worden gebruikt. Voor deze methode moeten zowel de totale hoeveelheid van de stof als haar concentratie nauwkeurig bekend zijn. Er moeten voorzorgsmaatregelen worden genomen om koolstofdioxide uit te sluiten. Gedetailleerde gegevens van de procedure, voorzorgen en berekeningswijze worden gegeven in standaardtesten, bv. referenties (1), (2), (3) en (4).

Spectrofotometrische methode

Er wordt een golflengte gevonden waarbij de geïoniseerde en niet-geïoniseerde vormen van de stof aanmerkelijk verschillende extinctiecoëfficiënten hebben,. Het absorptiespectrum in uv/zichtbaar licht wordt verkregen van oplossingen met een constante concentratie bij pH's waarbij de stof hoofdzakelijk niet-geïoniseerd, dan wel volledig geïoniseerd, is en bij meerdere tussenliggende pH's. Dit kan worden gedaan hetzij door porties geconcentreerd(e) zuur (base) toe te voegen aan een relatief groot volume van een oplossing van de stof in een uit meerdere componenten bestaande buffer, in eerste instantie bij een hoge (lage) pH (referentie 5), of door gelijke volumes van een voorraadoplossing van de stof in bv. water of methanol toe te voegen aan constante volumes van verschillende bufferoplossingen die het gewenste pH-bereik bestrijken. Uit de pH- en extinctiewaarden bij de gekozen golflengte wordt een voldoende aantal waarden voor de pK_a berekend met behulp van gegevens van ten minste 5 pH's waarbij de stof voor ten minste 10 procent en minder dan 90 procent is geïoniseerd. Nadere experimentele gegevens en de berekeningswijze zijn te vinden in referentie (1).

▼M7

Conductometrische methode

Met behulp van een cel met een kleine, bekende celconstante wordt de geleidbaarheid van een ongeveer 0,1 M-oplossing van de stof in conductometrisch zuiver water gemeten. De geleidbaarheid van een aantal nauwkeurig gemaakte verdunningen van deze oplossing wordt ook gemeten. De concentratie wordt elke keer gehalveerd, en de reeks bestrijkt in concentratie ten minste een orde van grootte. De uiterste geleidbaarheid bij oneindige verdunning wordt gevonden door een vergelijkbaar experiment uit te voeren met het Na-zout en te extrapoleren. De mate van dissociatie kan dan met de Onsager-vergelijking worden berekend uit de geleidbaarheid van elk van de oplossingen, en daarna kan met de verdunningswet van Ostwald de dissociatieconstante worden berekend als $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, waarin C de concentratie in mol per liter is en α de gedissocieerde fractie is. Er moeten voorzorgsmaatregelen worden genomen om CO_2 uit te sluiten. Nadere experimentele details en de berekeningswijze worden gegeven in standaardteksten en in de referenties (1), (6) en (7).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

Titratiemethode

De pK_a wordt berekend voor 10 gemeten punten op de titratiecurve. Het gemiddelde en de standaardafwijking van deze pK_a-waarden worden berekend. Een grafiek van de pH uitgezet tegen het volume van de standaardbase of het standaardzuur wordt vermeld, tezamen met een weergave in tabelvorm.

Spectrofotometrische methoden

Er wordt een tabel gemaakt met de extinctie en pH voor elk spectrum. Er worden ten minste vijf waarden voor de pK_a berekend uit de tussenliggende spectrumgegevenspunten, en ook het gemiddelde en de standaardafwijking van deze resultaten worden berekend.

Conductometrische methode

De equivalente geleidbaarheid Λ wordt berekend voor elke concentratie van het zuur en voor elke concentratie van een mengsel van één equivalent zuur plus 0,98 equivalent carbonaatvrij natriumhydroxide. Het zuur is in overmaat om een overmaat aan OH^- als gevolg van hydrolyse te voorkomen. $1/\Lambda$ wordt in een grafiek uitgezet tegen $\sqrt{C}$, en Λ_o van het zout wordt gevonden door extrapolatie naar een concentratie van nul.

Λ_o van het zuur kan worden berekend met behulp van waarden uit de literatuur voor H^+ en Na^+. De pK_a kan worden berekend uit $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ en $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ voor elke concentratie. Door te corrigeren voor mobiliteit en activiteit kunnen betere waarden voor K_a worden verkregen. Het gemiddelde en de standaardafwijking van de pK_a-waarden moeten worden berekend.

Testverslag

Alle ruwe gegevens en berekende pK_a-waarden worden ingediend met de berekeningsmethode (bij voorkeur in tabelvorm, zoals voorgesteld in referentie (1)) en de hierboven beschreven statistische parameters. Voor titratiemethoden worden de details van de standaardisatie van de titranten vermeld.

Voor de spectrofotometrische methode worden alle spectra ingediend. Voor de conductometrische methode worden de details van de bepaling van de celconstante gerapporteerd. Er wordt informatie verstrekt over de gebruikte techniek, analysemethoden en de aard van de eventueel gebruikte buffers.

De testtemperatu(u)r(en) worden gerapporteerd.

LITERATUUR

(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, blz. 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, (maart 1973).

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

(7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (zie (4) hierboven).

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

▼B

DEEL B: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE TOXICITEIT EN ANDERE INVLOEDEN OP DE GEZONDHEID

INHOUD

ALGEMENE INLEIDING

B.1 bis. ACUTE ORALE TOXICITEIT: PROCEDURE MET VASTE DOSES

B.1 ter. ACUTE ORALE TOXICITEIT: METHODE TER BEPALING VAN DE ACUTE-TOXICITEITSKLASSE

B.2. ACUTE INHALATIETOXICITEIT

B.3. ACUTE DERMALE TOXICITEIT

B.4. ACUTE TOXICITEIT: HUIDIRRITATIE/CORROSIE

B.5. ACUTE OOGIRRITATIE/-CORROSIE

B.6. SENSIBILISATIE VAN DE HUID

B.7. TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

B.8. SUBACUTE INHALATIETOXICITEIT: ONDERZOEK VAN 28 DAGEN

B.9. TOXICITEIT (DERMAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

B.10. IN-VITROTEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN IN ZOOGDIEREN

B.11. TEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN IN BEENMERG-CELLEN VAN ZOOGDIEREN

B.12. MICRONUCLEUSTEST BIJ ERYTROCYTEN VAN ZOOGDIE-REN

B.13/14. MUTAGENITEIT: TERUGMUTATIETEST MET BACTERIËN

B.17. MUTAGENITEIT — *IN VITRO* GENMUTATIETEST MET ZOOGDIERCELLEN

B.21. ZOOGDIERENCELTRANSFORMATIETEST *IN VITRO*

B.22. ONDERZOEK NAAR DOMINANTE LETALE MUTATIES BIJ KNAAGDIEREN

▼B

B.23.	TEST OP CHROMOSOOMAFWUKINGEN IN SPERMATOGONIA VAN ZOOGDIEREN
B.25.	ERFELIJKE TRANSLOCATIES BIJ DE MUIS
B.26.	SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST: TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)
B.27.	SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST: TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP DIEREN ANDERS DAN KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)
B.28.	SUBCHRONISCHE DERMALE TOXICITEITSTEST: 90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE DERMALE TOEDIENING AAN KNAAGDIERSOORTEN
B.29.	SUBCHRONISCHE INHALATIETOXICITEIT: ONDERZOEK VAN 90 DAGEN
B.30.	ONDERZOEK NAAR CHRONISCHE TOXICITEIT
B.31.	ONDERZOEK NAAR PRENATALE ONTWIKKELINGSTOXICITEIT
B.32.	CARCINOGENITEITSONDERZOEK
B.33.	GECOMBINEERD ONDERZOEK NAAR CHRONISCHE TOXICITEIT EN CARCINOGENITEIT
B.34.	REPRODUCTIETOXICITEITSONDERZOEK OVER ÉÉN GENERATIE
B.35.	REPRODUCTIETOXICITEITSONDERZOEK OVER TWEE GENERATIES
B.36.	TOXICOKINETIEK
B.37.	VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN NA ACUTE BLOOTSTELLING
B.38.	VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)
B.39.	*IN VIVO* TEST OP DNA-HERSTELSYNTHESE IN LEVERCELLEN VAN ZOOGDIEREN
B.40.	*IN VITRO* HUIDCORROSIE: TEST OP BASIS VAN DE TRANSCUTANE ELEKTRISCHE WEERSTAND (TEW)
B.40 BIS.	*IN VITRO* HUIDCORROSIE: TEST MET HUMAAN HUIDMODEL
B.41.	*IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOXICITEITSTEST
B.42.	HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST

▼B

B.43. NEUROTOXICITEITSONDERZOEK BIJ KNAAGDIEREN

B.44. ABSORPTIE DOOR DE HUID: *IN VIVO* METHODE

B.45. ABSORPTIE DOOR DE HUID: *IN VITRO* METHODE

B.46. IN-VITROHUIDIRRITATIE: TESTMETHODE MET GERECONSTRUEERDE HUMANE EPIDERMIS

B.47. BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY-(BCOP-) TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN I) CHEMISCHE STOFFEN DIE ERNSTIG OOGLETSEL VEROORZAKEN EN II) CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

B.48. ISOLATED CHICKEN EYE-TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN I) CHEMISCHE STOFFEN DIE ERNSTIG OOGLETSEL VEROORZAKEN EN II) CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

B.49. IN-VITROMICRONUCLEUSTEST BIJ ZOOGDIERCELLEN

B.50. HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST: AA

B.51. HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST: BrdU-ELISA

B.52. ACUTE INHALATIETOXICITEIT: METHODE TER BEPALING VAN DE ACUTE-TOXICITEITSKLASSE

B.53. ONDERZOEK NAAR ONTWIKKELINGSNEUROTOXICITEIT

B.54. UTEROTROFE BIOASSAY BIJ KNAAGDIEREN: EEN KORTLOPENDE SCREENINGSTEST OP OESTROGENE EIGENSCHAPPEN

B.55. HERSHBERGER-BIOASSAY BIJ RATTEN: EEN KORTLOPENDE SCREENINGSTEST OP (ANTI)ANDROGENE EIGENSCHAPPEN

B.56. UITGEBREID ONDERZOEK NAAR REPRODUCTIETOXICITEIT OVER ÉÉN GENERATIE

B.57. H295R-STEROÏDOGENESETEST

B.58. GENMUTATIETESTEN MET SOMATISCHE CELLEN EN GESLACHTSCELLEN VAN TRANSGENE KNAAGDIEREN

B.59. IN-CHEMICOHUIDSENSIBILISATIE: DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY (DPRA-TEST)

B.60. IN-VITROHUIDSENSIBILISATIE: ARE-NRF2-LUCIFERASE-TESTMETHODE

B.61. FLUORESCEÏNELEKKAGE-TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN VOOR HET OOG CORROSIEVE EN HEVIG IRRITERENDE STOFFEN

B.62. IN VIVO ALKALISCHE KOMEETTEST BIJ ZOOGDIEREN

▼B

ALGEMENE INLEIDING

A. **KARAKTERISERING VAN DE TESTSTOF**

De samenstelling van de teststof, met inbegrip van de voornaamste verontreinigingen, en de relevante fysisch-chemische eigenschappen, waaronder de stabiliteit, moeten vóór de aanvang van ieder toxiciteitsonderzoek bekend zijn.

De fysisch-chemische eigenschappen van de teststof leveren belangrijke informatie over de keuze van de manier van toedienen, de opzet van ieder afzonderlijk onderzoek en het hanteren en bewaren van de teststof.

Alvorens het onderzoek wordt aangevat, moet een analytische methode voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof (zo mogelijk met inbegrip van de voornaamste verontreinigingen) in het toedieningsmedium en in het biologisch materiaal ontwikkeld worden.

Alle gegevens met betrekking tot de identificatie, de fysisch-chemische eigenschappen, de zuiverheid en het gedrag van de teststof moeten in het onderzoeksrapport worden opgenomen.

B. **VERZORGING VAN DE DIEREN**

Bij toxiciteitstests zijn een stringente bewaking van de levensomstandigheden en een goede verzorging van de dieren een eerste vereiste.

i) *Huisvesting*

De leefomstandigheden in de kamers of ruimten waar de proefdieren zijn ondergebracht, moeten geschikt zijn voor het soort proefdier. Voor ratten, muizen en cavia's is een kamertemperatuur van 22 °C ± 3 °C en een relatieve luchtvochtigheid van 30-70 % geschikt; voor konijnen moet de temperatuur 20 °C + 3 °C en de relatieve luchtvochtigheid 30-70 % bedragen.

Sommige experimentele technieken zijn bijzonder gevoelig voor temperatuureffecten; in dergelijke gevallen wordt in de beschrijving van de onderzoekmethode nader ingegaan op de correcte proefomstandigheden. Bij ieder onderzoek naar toxische effecten moeten de temperatuur en de vochtigheidsgraad worden gecontroleerd, opgetekend en in het eindverslag van de studie worden opgenomen.

Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met afwisselend twaalf uur licht — twaalf uur duisternis. Nadere gegevens over de verlichting moeten worden opgetekend en in het eindverslag worden opgenomen.

Tenzij anders bij de methode vermeld, worden de dieren hetzij afzonderlijk, hetzij in kleine groepen van hetzelfde geslacht gehuisvest In het laatste geval mogen per kooi niet meer dan vijf dieren worden gehuisvest.

Het is belangrijk om in verslagen over dierproeven steeds te vermelden welk soort kooien is gebruikt en hoeveel dieren tijdens de blootstelling aan de chemische stof en tijdens latere waarnemingsperioden in iedere kooi waren gehuisvest.

▼B

ii) *Voeding*

Bij de samenstelling van het voedsel moet worden voldaan aan alle eisen die de proefdiersoorten aan hun voeding stellen. Indien chemische stoffen via de voeding aan de dieren worden toegediend, kan de voedingswaarde door interactie tussen de stof en een bestanddeel van de voeding verminderd worden. Bij het interpreteren van de resultaten dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van dergelijke reacties. Er kan gebruik worden gemaakt van gebruikelijk laboratoriumvoeder met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voedsel kan mede worden bepaald door de noodzaak de teststof, wanneer die via het voedsel wordt toegediend, op een passende wijze daarmee te vermengen.

Onzuiverheden in de voeding waarvan bekend is dat ze de toxiciteit beïnvloeden, mogen niet in werkzame concentraties voorkomen.

C. **ALTERNATIEVE TESTEN**

De Europese Unie maakt zich sterk voor het ontwikkelen en valideren van alternatieve technieken die dezelfde hoeveelheid informatie opleveren als de huidige dierproeven, maar waarbij minder proefdieren worden gebruikt, die minder lijden veroorzaken of die het gebruik van dieren volledig overbodig maken.

Naarmate dergelijke methoden ter beschikking komen, moet het gebruik ervan waar mogelijk worden overwogen voor de risicobeoordeling en de daaruit voortvloeiende classificatie en etikettering ten aanzien van de intrinsieke risico's.

D. **EVALUATIE EN INTERPRETATIE**

Bij de evaluatie en interpretatie van de testresultaten moet rekening worden gehouden met de beperkingen ten aanzien van de mate waarin de resultaten van dierproeven en *in-vitro* tests kunnen worden geëxtrapoleerd naar de mens. Daarom kunnen aanwijzingen voor schadelijke effecten bij de mens, indien beschikbaar, gebruikt worden als bevestiging van de testresultaten.

E. **LITERATUUR**

De meeste van deze methoden zijn ontwikkeld binnen het kader van het OESO-programma inzake richtsnoeren voor het testen; zij moeten worden toegepast overeenkomstig de beginselen van „goede laboratoriumpraktijken”, om zoveel mogelijk te komen tot „onderlinge acceptatie van gegevens”.

Verdere informatie kan worden gevonden in de referenties die te vinden zijn in de OESO-richtsnoeren en in relevante literatuur die elders is gepubliceerd.

▼B

B.1 bis. **ACUTE ORALE TOXICITEIT: PROCEDURE MET VASTE DOSES**

1. **METHODE**

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 420 (2001) van de OESO.

1.1. INLEIDING

Bij klassieke methoden voor de bepaling van de acute toxiciteit wordt de dood van dieren als eindpunt gebruikt. In 1984 is door de British Toxicology Society een nieuwe aanpak voor acute toxiciteitstests voorgesteld op basis van de toediening van een reeks vaste doses (1). Deze aanpak gebruikt niet meer de dood van dieren als eindpunt, maar berust op de observatie van duidelijke toxiciteitsverschijnselen bij één van een reeks vaste doses. Na *in-vivo* valideringsonderzoek in het VK (2) en in internationaal verband (3) is deze procedure in 1992 als testmethode goedgekeurd. Vervolgens zijn de statistische eigenschappen van de procedure met vaste doses bij een reeks onderzoeken met behulp van mathematische modellen geëvalueerd (4)(5)(6). Met de combinatie van *in-vivo*-onderzoek en modellen is aangetoond dat de procedure reproduceerbaar is, minder dieren gebruikt en minder leed veroorzaakt dan de klassieke methoden en stoffen op een vergelijkbare wijze kan rangschikken als de andere testmethoden voor acute toxiciteit.

Richtsnoeren voor de keuze van de meest geschikte testmethode voor een bepaald doel worden gegeven in de leidraad voor tests op acute orale toxiciteit (7). Deze leidraad bevat ook aanvullende informatie over de uitvoering en interpretatie van testmethode B.1 bis.

De methode heeft als beginsel dat bij het hoofdonderzoek slechts beperkt toxische doses worden gebruikt en dat de toediening van doses waarvan wordt verwacht dat ze dodelijk zijn, moet worden vermeden. Ook doses waarvan bekend is dat ze door een bijtende of sterk irriterende werking hevige pijn en leed veroorzaken, behoeven niet te worden toegediend. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, worden op humane wijze gedood en worden bij de interpretatie van de testresultaten op dezelfde manier behandeld als dieren die tijdens de test gestorven zijn. Er is een aparte leidraad met criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen (8).

De methode levert informatie over de gevaarlijke eigenschappen op en maakt het mogelijk de stof te rangschikken en in te delen aan de hand van het „Globally Harmonised System” (GHS) voor de indeling van chemische stoffen die acute toxiciteit veroorzaken (9).

Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Hierbij gaat het om informatie als de identiteit en de chemische structuur van de stof, de fysisch-chemische eigenschappen, de resultaten van andere met de stof uitgevoerde toxiciteitstests *in vivo* of *in vitro*, toxicologische gegevens over qua structuur verwante stoffen en de voorgenomen toepassing(en) van de stof. Deze informatie is nodig om alle betrokkenen ervan te overtuigen dat de test relevant is voor de bescherming van de gezondheid van de mens en helpt tevens bij de keuze van een geschikte aanvangsdosis.

▼B

1.2. DEFINITIES

Acute orale toxiciteit: de schadelijke effecten die zich voordoen na orale toediening van één dosis van een stof of verschillende doses die binnen 24 uur worden toegediend.

Vertraagde sterfte: houdt in dat een dier niet binnen 48 uur sterft of stervende is maar later gedurende de observatieperiode van 14 dagen sterft.

Dosis: de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bijvoorbeeld mg/kg).

Manifeste toxiciteit: een algemene term die zodanige duidelijke toxiciteitsverschijnselen na de toediening van de teststof beschrijft (zie (3) voor voorbeelden), dat bij de eerstvolgende vaste dosis hevige pijn en blijvende verschijnselen van ernstig leed, stervende dieren (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor criteria) of waarschijnlijke sterfte bij de meeste dieren kunnen worden verwacht.

GHS: het „Globally Harmonised Classification System" voor chemische stoffen en mengsels. Een samenwerkingsproject van de OESO (gezondheid van de mens en milieu), het Comité van deskundigen voor het vervoer van gevaarlijke goederen van de VN (fysisch-chemische eigenschappen) en de ILO (communicatie van gevaren) dat wordt gecoördineerd door het Gezamenlijk programma voor een verantwoord beheer van chemische stoffen (IOMC).

Ophanden zijnde sterfte: wanneer vóór het eerstvolgende geplande observatietijdstip een stervende toestand of sterfte wordt verwacht. Voorbeelden van indicaties voor deze toestand bij knaagdieren zijn convulsies, zijligging, liggende positie en tremors (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor meer bijzonderheden).

LD_{50} (mediaan van de letale dosis): een statistisch afgeleide enkelvoudige dosis van een stof waarvan kan worden verwacht dat 50 % van de dieren waaraan deze dosis oraal wordt toegediend, sterft. De LD_{50} wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (mg/kg).

Limietdosis: een dosis die bij tests als bovengrens wordt gehanteerd (2 000 of 5 000 mg/kg).

Stervende toestand: een toestand waarop de dood volgt of waarin overleven onmogelijk is, zelfs wanneer het dier wordt behandeld (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor meer bijzonderheden).

Voorspelbare sterfte: een toestand met klinische verschijnselen die wijzen op sterfte op een bekend tijdstip in de toekomst vóór het geplande einde van het experiment, bijvoorbeeld wanneer het dier geen water of voer kan bereiken (zie de leidraad voor humane eindpunten (8) voor meer bijzonderheden).

▼B

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Groepen met dieren van hetzelfde geslacht krijgen stapsgewijs de vaste doses 5, 50, 300 en 2 000 mg/kg toegediend (bij wijze van uitzondering kan een extra vaste dosis van 5 000 mg/kg worden overwogen; zie punt 1.6.2). Op basis van een verkennende test wordt de aanvangsdosis gekozen, waarvan wordt verwacht dat er enige toxiciteitsverschijnselen optreden zonder dat er sprake is van ernstige toxische effecten of sterfte. Klinische verschijnselen en situaties die gepaard gaan met pijn, leed en ophanden zijnde sterfte, worden gedetailleerd in een aparte OESO-leidraad beschreven (8). Afhankelijk van het al dan niet optreden van toxiciteitsverschijnselen of sterfte kan er aan andere groepen dieren een hogere of lagere dosis worden toegediend. Deze procedure wordt gestaakt zodra de dosis wordt bepaald waarbij manifeste toxiciteit optreedt of ten hoogste één dier sterft, of wanneer blijkt dat er bij de hoogste dosis geen effecten worden geconstateerd of bij de laagste dosis dieren sterven.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Keuze van de diersoort**

Bij voorkeur wordt de rat gebruikt, maar ook andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt. Normaal gesproken worden vrouwtjes gebruikt (7), omdat uit literatuuronderzoek van klassieke LD_{50}-tests blijkt dat er meestal weinig verschil in gevoeligheid tussen mannetjes en vrouwtjes is, maar wanneer er een verschil wordt geconstateerd, zijn vrouwtjes meestal iets gevoeliger (10). Als echter uit kennis omtrent de toxicologische of toxicokinetische eigenschappen van qua structuur verwante chemische stoffen blijkt dat mannetjes waarschijnlijk gevoeliger zullen zijn, moeten mannetjes worden gebruikt. Wanneer de test bij mannetjes wordt uitgevoerd, moet hiervoor een afdoende motivering worden gegeven. Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt.

De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Elk dier moet bij de eerste toediening 8 tot 12 weken oud zijn en het lichaamsgewicht mag niet meer dan ± 20 % afwijken van het gemiddelde gewicht van dieren waaraan al eerder een dosis is toegediend.

1.4.2. **Huisvesting en voeding**

De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De dieren mogen per dosis in groepen worden gehuisvest, maar het aantal dieren per kooi mag niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord.

1.4.3. **Voorbereiding van de dieren**

De dieren worden aselect ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal 5 dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

▼B

1.4.4. **Bereiding van de dosis**

In het algemeen worden alle doses van de teststof in het hele testbereik in een constant volume toegediend door de concentratie van de toegediende dosis te variëren. Wanneer echter een vloeibaar eindproduct of mengsel wordt getest, kan het voor de latere risicobeoordeling van die stof zinvoller zijn de teststof onverdund, d.w.z. met een constante concentratie, te gebruiken en sommige regelgevende instanties hebben dit verplicht gesteld. Het maximaal toe te dienen volume mag echter in geen geval worden overschreden. Het is afhankelijk van de grootte van het proefdier welk volume vloeistof in één keer kan worden toegediend. Bij knaagdieren mag het volume normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden overwogen. Voor de formulering van de dosis wordt waar mogelijk het gebruik van een waterige oplossing/suspensie/emulsie aanbevolen, in volgorde van voorkeur gevolgd door een oplossing/suspensie/emulsie in olie (bijvoorbeeld maïsolie) en eventueel een oplossing in een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxicologische kenmerken van het medium bekend zijn. De dosis moet kort vóór de toediening worden bereid, tenzij de stabiliteit van het preparaat gedurende de gebruiksperiode bekend is en is aangetoond dat deze aanvaardbaar is.

1.5. PROCEDURE

1.5.1. **Toediening van de dosis**

De teststof wordt in één dosis toegediend met een maagsonde of een geschikte katheter. In het uitzonderlijke geval dat één dosis niet mogelijk is, kan de dosis in kleinere porties worden verdeeld die in de loop van maximaal 24 uur worden toegediend.

De dieren moeten vóór de toediening vasten (ratten mogen bijvoorbeeld de nacht vóór de toediening geen voer maar wel water krijgen en muizen gedurende 3-4 uur). Na de vastperiode worden de dieren gewogen en wordt de teststof toegediend. Na de toediening van de stof kan men ratten nog eens 3-4 uur en muizen nog eens 1-2 uur laten vasten. Wanneer een dosis in de loop van de tijd in porties wordt toegediend, kan het afhankelijk van de lengte van de periode nodig zijn de dieren voer en water te geven.

1.5.2. **Verkennende test**

De verkennende test is bedoeld om de juiste aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek te kunnen kiezen. De teststof wordt overeenkomstig het stroomschema in bijlage 1 achtereenvolgens telkens aan één dier toegediend. De verkennende test is afgelopen wanneer er een beslissing kan worden genomen over de aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek (of als er bij de laagste vaste dosis een dier sterft).

Als aanvangsdosis voor de verkennende test wordt uit de vaste doses 5, 50, 300 en 2 000 mg/kg de dosis gekozen waarvan wordt verwacht dat er manifeste toxiciteit optreedt, waar mogelijk op basis van gegevens uit *in-vitro*- en *in-vivo*-onderzoek met dezelfde chemische stof en andere qua structuur verwante chemische stoffen. Wanneer deze informatie niet beschikbaar is, wordt 300 mg/kg als aanvangsdosis gebruikt.

Er wordt ten minste 24 uur gewacht voordat een dosis aan het volgende dier wordt toegediend. Alle dieren worden gedurende ten minste 14 dagen geobserveerd.

▼B

Bij wijze van uitzondering kan alleen met een motivering op basis van specifieke regelgevingsvereisten daarnaast het gebruik van een hogere vaste dosis van 5 000 mg/kg worden overwogen (zie bijlage 3). Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven in GHS-categorie 5 tot 2 000-5 000 mg/kg niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die test van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van mensen of dieren of het milieu.

Wanneer een dier waaraan bij de verkennende test de laagste vaste dosis (5 mg/kg) is toegediend, sterft, is de normale procedure dat de test wordt afgesloten en de stof wordt ingedeeld in GHS-categorie 1 (zie bijlage 1). Als de indeling echter moet worden bevestigd, kan de volgende facultatieve aanvullende procedure worden uitgevoerd. De dosis van 5 mg/kg wordt aan een tweede dier toegediend. Als dit tweede dier sterft. is de indeling in GHS-categorie 1 bevestigd en wordt het onderzoek onmiddellijk beëindigd. Als het tweede dier blijft leven, wordt de dosis van 5 mg/kg aan ten hoogste nog eens drie dieren toegediend. Omdat er een hoog risico op sterfte zal zijn, moet de dosis met het oog op het welzijn van dieren achtereenvolgens aan telkens één dier worden toegediend. Vóór de toediening aan het volgende dier moet lang genoeg worden gewacht om vast te kunnen stellen dat het vorige dier waarschijnlijk zal blijven leven. Als er een tweede dier sterft, wordt de toediening onmiddellijk gestaakt en worden er geen dieren meer gebruikt. Een tweede dier dat sterft, levert (ongeacht het aantal dieren dat bij beëindiging is getest) het resultaat A op (2 of meer dode dieren), zodat de indelingsregel van bijlage 2 bij de vaste dosis van 5 mg/kg wordt gevolgd (categorie 1 als er 2 of meer dode dieren zijn en categorie 2 als er niet meer dan één dood dier is). Daarnaast geeft bijlage 4 een leidraad voor de indeling in het EU-systeem totdat het nieuwe GHS ingevoerd is.

1.5.3. **Hoofdonderzoek**

1.5.3.1. *Aantal dieren en dosisniveaus*

Het stroomschema in bijlage 2 geeft aan wat er na de test op het aanvangsniveau moet gebeuren. Er zijn drie mogelijkheden: de test wordt gestaakt en de desbetreffende gevaar-indelingscategorie wordt toegekend, de test wordt bij een hogere vaste dosis voortgezet of de test wordt bij een lagere vaste dosis voortgezet. Met het oog op de bescherming van dieren wordt een dosisniveau dat bij de verkennende test een dood dier opleverde, bij het hoofdonderzoek niet opnieuw getest (zie bijlage 2). De ervaring heeft geleerd dat het meest waarschijnlijke resultaat bij de aanvangsdosis is dat de stof kan worden ingedeeld en dat er geen verdere tests nodig zijn.

Normaal gesproken worden er voor elk dosisniveau in totaal vijf dieren van hetzelfde geslacht gebruikt, namelijk het dier dat deze dosis bij de verkennende test toegediend heeft gekregen en nog eens vier dieren (behalve wanneer bij wijze van uitzondering een dosisniveau van het hoofdonderzoek niet in de verkennende test was opgenomen).

Het tijdsverloop tussen de toediening op elk niveau wordt bepaald door de aanvang, de duur en de ernst van de toxiciteitsverschijnselen. Met de toediening van een volgende dosis wordt gewacht totdat men er zeker van is dat de eerder geteste dieren blijven leven. Indien nodig wordt een periode van drie of vier dagen tussen de toediening op elk dosisniveau aanbevolen om observatie van vertraagde toxiciteit mogelijk te maken. Dit interval kan indien gewenst worden aangepast, bijvoorbeeld bij een onduidelijke reactie.

▼B

Wanneer het gebruik van een hoogste vaste dosis van 5 000 mg/kg wordt overwogen, moet de procedure van bijlage 3 worden gevolgd (zie ook punt 1.6.2).

1.5.3.2. *Limiettest*

De limiettest wordt voornamelijk uitgevoerd wanneer er informatie is die erop wijst dat het testmateriaal waarschijnlijk niet toxisch is c.q. alleen toxisch is in hogere doses dan de limieten in de regelgeving. Informatie over de toxiciteit van het testmateriaal kan afkomstig zijn van kennis omtrent vergelijkbare geteste verbindingen of vergelijkbare geteste mengsels of producten, waarbij rekening wordt gehouden met de identiteit en het percentage van de bestanddelen waarvan bekend is dat ze in toxicologisch opzicht relevant zijn. Wanneer er weinig of geen informatie over de toxiciteit van het testmateriaal is of wordt verwacht dat het toxisch is, moet het hoofdonderzoek worden uitgevoerd.

De limiettest voor deze testmethode wordt volgens de normale procedure uitgevoerd met een verkennende test met een aanvangsdosis van 2 000 mg/kg (of in uitzonderingsgevallen 5 000 mg/kg), gevolgd door de toediening van deze dosis aan nog eens vier dieren.

1.6. OBSERVATIE

De dieren worden gedurende de eerste 30 minuten na de toediening ten minste éénmaal elk afzonderlijk geobserveerd, gedurende de eerste 24 uur periodiek met bijzondere aandacht voor de eerste vier uur en vervolgens dagelijks gedurende in totaal 14 dagen, behalve wanneer ze met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek moeten worden genomen en op humane wijze moeten worden gedood of dood aangetroffen worden. De observatieduur is echter geen regel waarvan niet kan worden afgeweken. Deze moet worden bepaald aan de hand van de toxische reacties, het tijdstip waarop ze beginnen en de duur van de herstelperiode en kan dus worden verlengd indien dit nodig wordt geacht. Het is belangrijk op welk tijdstip de toxiciteitsverschijnselen verschijnen en verdwijnen, vooral als er een neiging is tot vertraagde toxiciteitsverschijnselen (11). Alle observaties worden systematisch geregistreerd en voor elk dier wordt een apart verslag bijgehouden.

Als de dieren toxiciteitsverschijnselen blijven vertonen, is aanvullende observatie nodig. Bij de observatie wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedragspatroon. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Er moet rekening worden gehouden met de beginselen en criteria in de leidraad voor humane eindpunten (8). Dieren die stervend worden aangetroffen en dieren die hevige pijn hebben of blijvende tekenen van ernstig leed vertonen, worden op humane wijze gedood. Wanneer dieren op humane wijze worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

1.6.1. **Lichaamsgewicht**

Kort vóór de toediening van de teststof en vervolgens ten minste wekelijks wordt het gewicht van elk dier bepaald. De gewichtsverandering wordt berekend en geregistreerd. Aan het einde van de test worden de dieren die nog leven gewogen en vervolgens op humane wijze gedood.

▼B

1.6.2. **Pathologie**

Op alle proefdieren (ook degene die tijdens de test sterven of met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek worden genomen) wordt macroscopische obductie uitgevoerd. Alle macroscopische pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd. Microscopisch onderzoek van organen die tekenen van macroscopische pathologische veranderingen vertonen bij dieren die 24 uur of langer na de toediening nog leven, kan ook worden overwogen aangezien dit nuttige informatie kan opleveren.

2. **GEGEVENS**

Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast worden alle gegevens in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of op humane wijze is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen:

Teststof:

— de fysische aard, de zuiverheid en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de isomeer-samenstelling);

— identificatiegegevens, zoals het CAS-nr.

Medium (indien van toepassing):

— een motivering voor de keuze van het medium als een ander medium dan water wordt gebruikt.

Proefdieren:

— de gebruikte soort/stam;

— de microbiologische status van de dieren, indien deze bekend is;

— het aantal dieren, hun leeftijd en hun geslacht (indien van toepassing een motivering voor het gebruik van mannetjes in plaats van vrouwtjes);

— de herkomst, de huisvesting, de voeding enz.

Testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof met bijzonderheden over de fysische vorm van het toegediende materiaal;

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof met vermelding van het toegediende volume en het toedieningstijdstip;

— gedetailleerde gegevens over het voer en het water (met vermelding van de aard/herkomst van het voer en de herkomst van het water);

— de motivering voor de keuze van de aanvangsdosis.

▼B

Resultaten:

— een tabel met gegevens over de respons en de dosis voor elk dier (bv. dieren met toxiciteitsverschijnselen of sterfte en de aard, de hevigheid en de duur van de effecten);

— een tabel met het lichaamsgewicht en de veranderingen in het lichaamsgewicht;

— het gewicht van de dieren op de toedieningsdag, daarna een keer per week en tenslotte wanneer ze sterven of gedood worden;

— de datum en het tijdstip waarop de dieren sterven als dit eerder gebeurt dan gepland;

— voor elk dier de aanvang en het verloop van de toxiciteitsverschijnselen en of ze reversibel waren;

— voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar.

Bespreking en interpretatie van de resultaten.

Conclusies.

4 **REFERENTIES**

(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) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002) Statistical evaluation on the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

(9) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF html|.

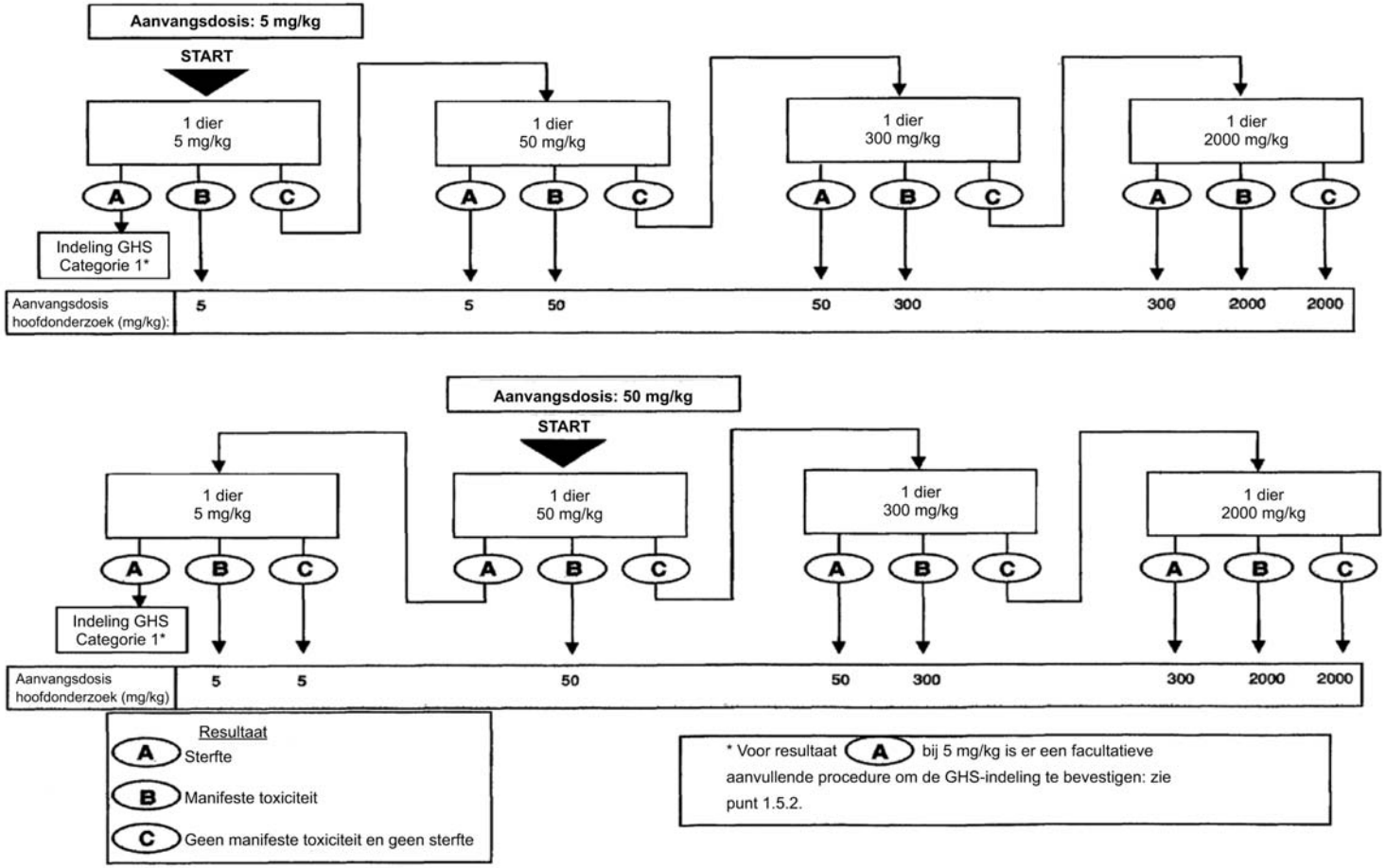
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33,223-231.

(11) Chan, P.K. and A.W. Hayes (1994). Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In Principles and Methods of Toxicology. 3 rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

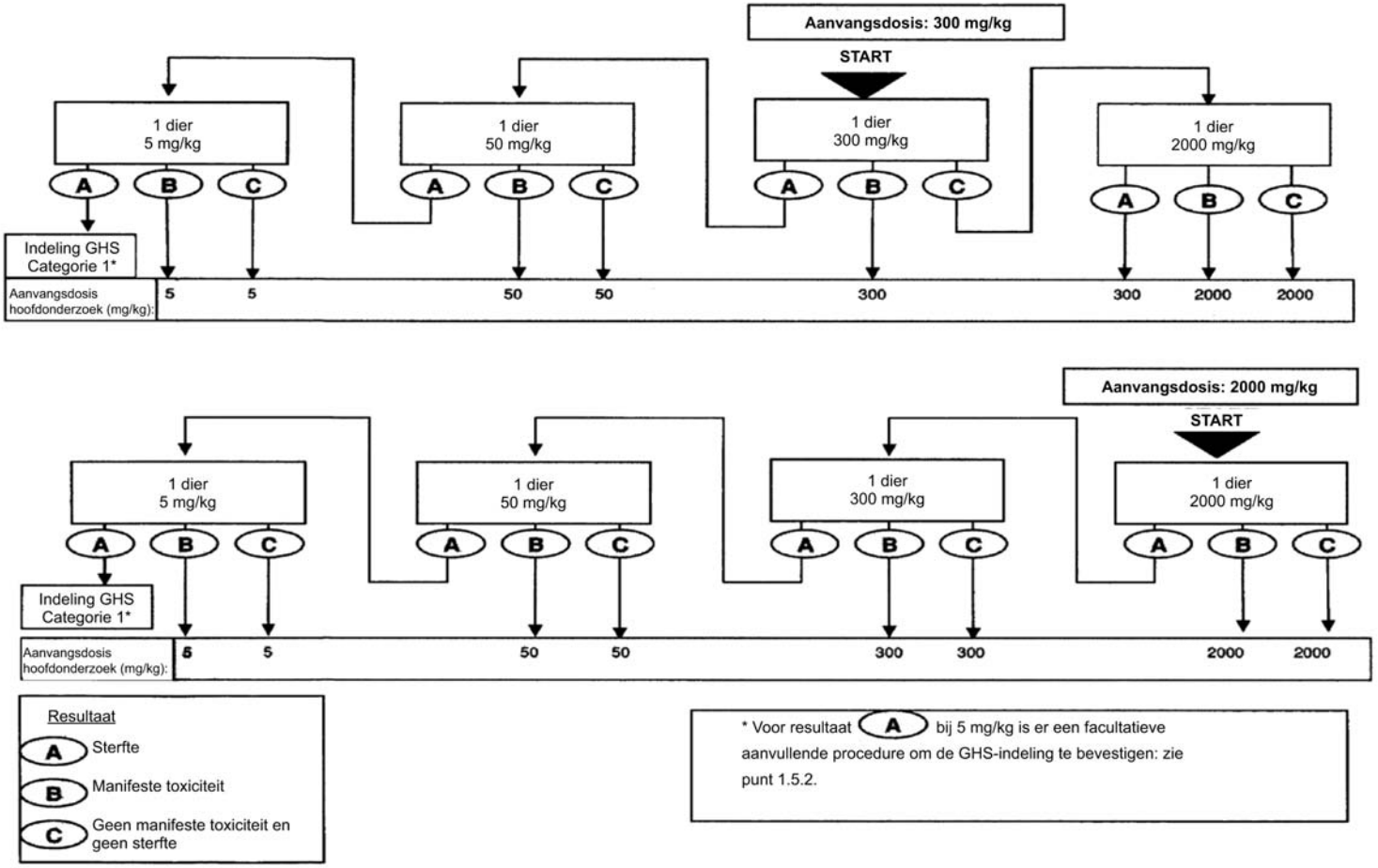
▼B

BIJLAGE 1:

STROOMSCHEMA VOOR DE VERKENNENDE TEST



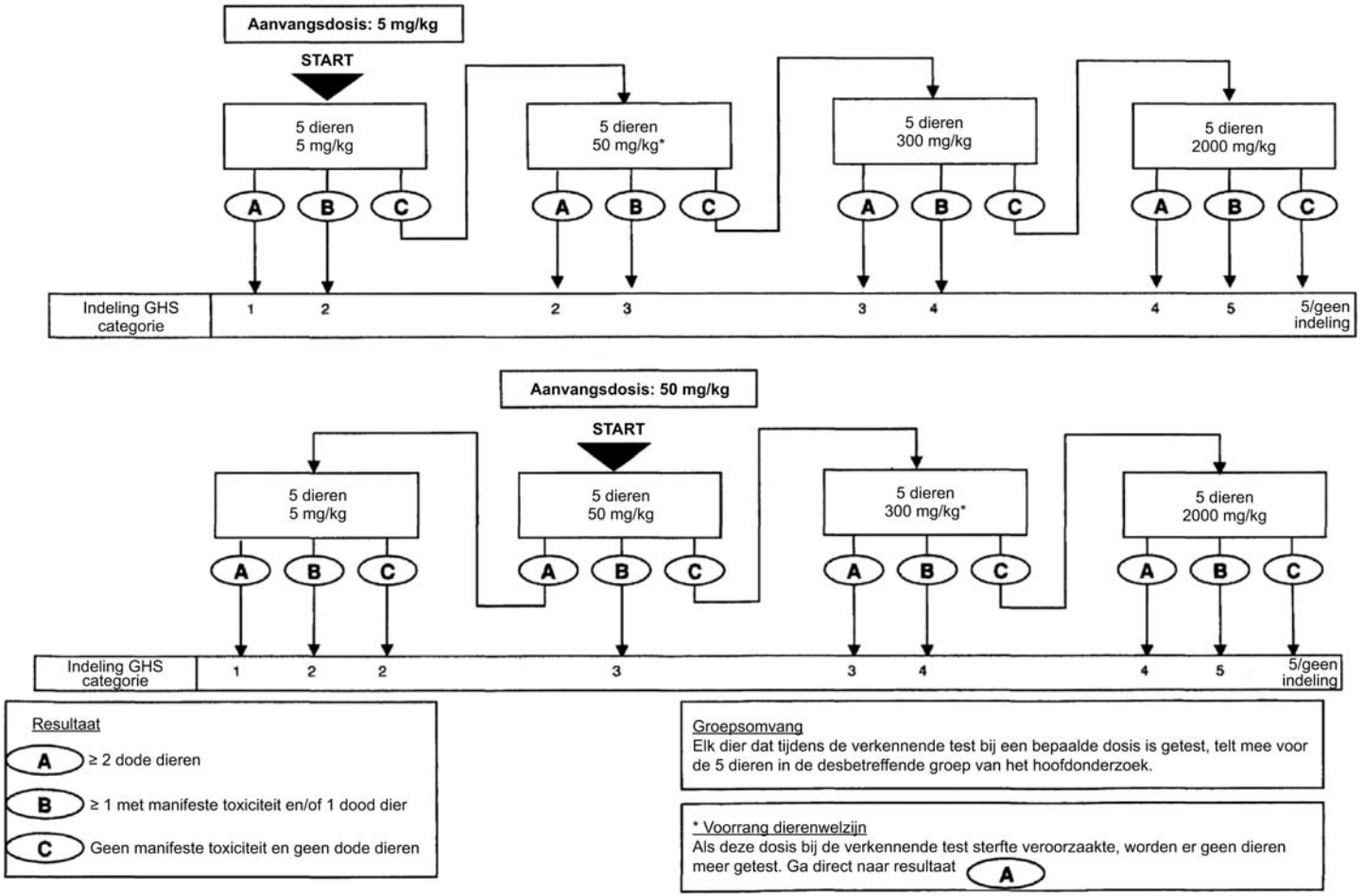
▼B


Aanvangsdosis: 300 mg/kg
START
1 dier
5 mg/kg
1 dier
50 mg/kg
1 dier
300 mg/kg
1 dier
2000 mg/kg
A
B
C
Indeling GHS
Categorie 1*
Aanvangsdosis
hoofdonderzoek (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Aanvangsdosis: 2000 mg/kg
START
1 dier
5 mg/kg
1 dier
50 mg/kg
1 dier
300 mg/kg
1 dier
2000 mg/kg
A
B
C
Indeling GHS
Categorie 1*
Aanvangsdosis
hoofdonderzoek (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Resultaat
A
Sterfte
B
Manifeste toxiciteit
C
Geen manifeste toxiciteit en
geen sterfte
* Voor resultaat A bij 5 mg/kg is er een facultatieve
aanvullende procedure om de GHS-indeling te bevestigen: zie
punt 1.5.2.

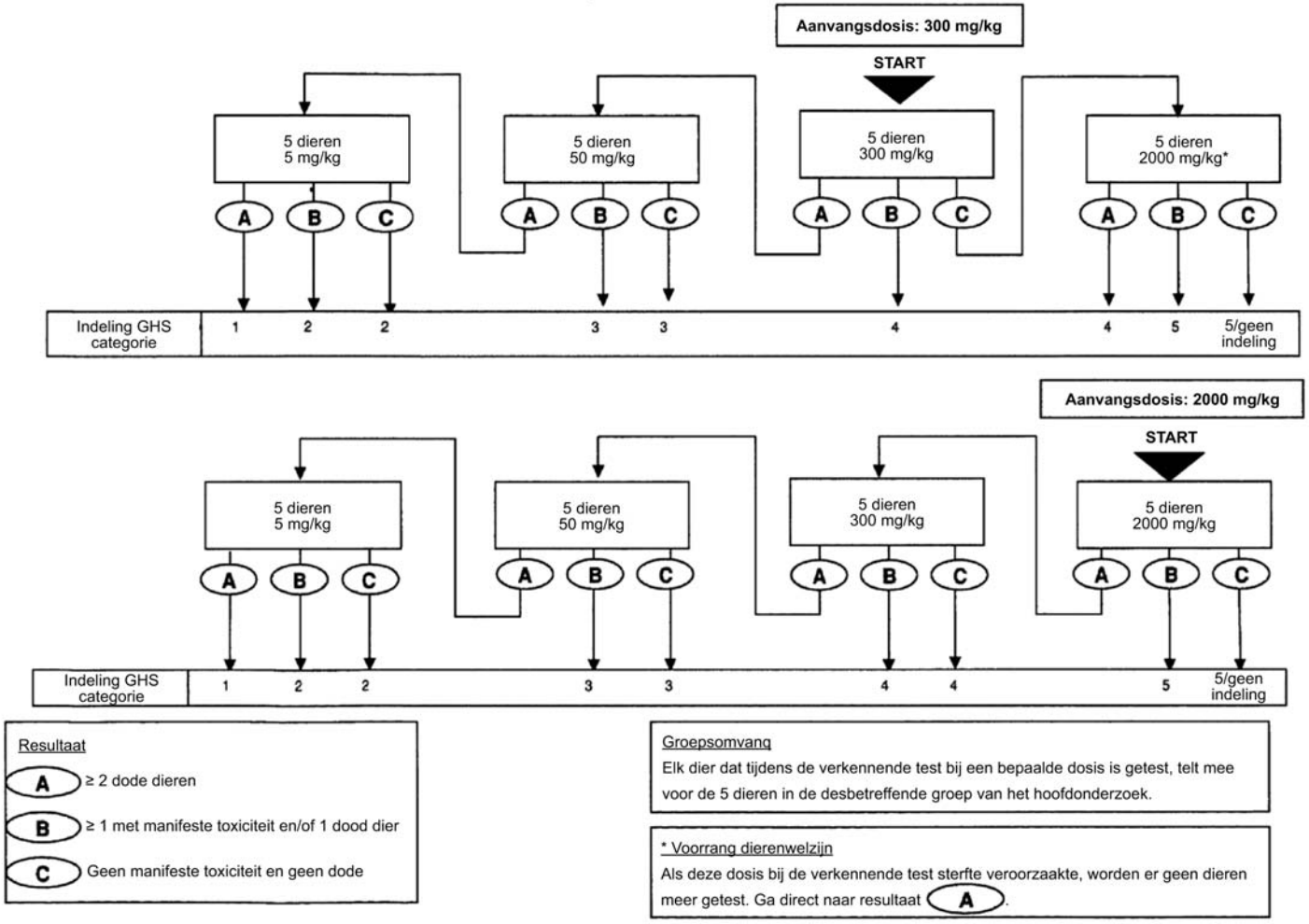
▼B

BIJLAGE 2:

STROOMSCHEMA VOOR HET HOOFDONDERZOEK



▼B


Aanvangsdosis: 300 mg/kg
START
5 dieren 5 mg/kg
5 dieren 50 mg/kg
5 dieren 300 mg/kg
5 dieren 2000 mg/kg*
A B C
Indeling GHS categorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/geen indeling
Aanvangsdosis: 2000 mg/kg
START
5 dieren 5 mg/kg
5 dieren 50 mg/kg
5 dieren 300 mg/kg
5 dieren 2000 mg/kg
A B C
Indeling GHS categorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/geen indeling
Resultaat
A ≥ 2 dode dieren
B ≥ 1 met manifeste toxiciteit en/of 1 dood dier
C Geen manifeste toxiciteit en geen dode
Groepsomvang
Elk dier dat tijdens de verkennende test bij een bepaalde dosis is getest, telt mee voor de 5 dieren in de desbetreffende groep van het hoofdonderzoek.
* Voorrang dierenwelzijn
Als deze dosis bij de verkennende test sterfte veroorzaakte, worden er geen dieren meer getest. Ga direct naar resultaat A.

▼B

BIJLAGE 3

CRITERIA VOOR DE INDELING VAN TESTSTOFFEN MET EEN VERWACHTE LD_{50}, DIE HOGER LIGT DAN 2 000 MG/KG ZONDER DAT ER TESTS BEHOEVEN TE WORDEN UITGEVOERD

De criteria voor de gevarencategorie 5 zijn bedoeld om reststoffen te kunnen signaleren die een betrekkelijk geringe acute toxiciteit hebben maar onder bepaalde omstandigheden een gevaar voor kwetsbare bevolkingsgroepen kunnen opleveren. Van deze stoffen wordt verwacht dat ze een orale of dermale LD_{50} tussen 2 000 en 5 000 mg/kg hebben of een vergelijkbare toxiciteit voor andere routes. Deze teststoffen kunnen in de volgende gevallen in de gevarencategorie 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg worden ingedeeld (categorie 5 in het GHS):

a) als ze via een van de testschema s van bijlage 2 op basis van de sterftecijfers in deze categorie terechtkomen;

b) als er al betrouwbaar bewijsmateriaal beschikbaar is waaruit blijkt dat de LD_{50} binnen het interval van categorie 5 valt of als uit ander onderzoek bij dieren of toxische effecten bij de mens blijkt dat er sprake is van een risico voor de gezondheid van de mens van acute aard;

c) via extrapolatie, raming of meting van gegevens als indeling in een gevaarlijkere categorie niet terecht is en

— er betrouwbare informatie beschikbaar is die wijst op significante toxische effecten bij de mens, of

— bij tests tot waarden van categorie 4 langs orale weg sterfte wordt waargenomen, of

— wanneer het oordeel van deskundigen bevestigt dat er bij tests tot waarden voor categorie 4 significante klinische toxiciteitsverschijnselen zijn met uitzondering van diarree, pilo-erectie of een onverzorgd uiterlijk, of

— wanneer het oordeel van deskundigen betrouwbare informatie bevestigt die op grond van andere dierproeven op mogelijke significante acute effecten wijst.

TESTEN BI J DOSES VAN MEER DAN 2 000 MG/KG

Bij wijze van uitzondering kan alleen met een motivering op basis van specifieke regelgevingsvereisten daarnaast het gebruik van een hogere vaste dosis van 5 000 mg/kg worden overwogen. Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven bij 5 000 mg/kg niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die proeven van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van dieren of mensen (9).

Verkennende test

De beslissingsregels voor de sequentiële procedure van bijlage 1 worden uitgebreid met een dosis van 5 000 mg/kg. Dit betekent dat wanneer er bij een verkennende test een aanvangsdosis van 5 000 mg/kg wordt gebruikt die resultaat A (sterfte) oplevert, een tweede dier bij 2 000 mg/kg wordt getest; bij resultaat B of C (manifeste toxiciteit of geen toxiciteit) wordt 5 000 mg/kg als aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek gekozen. Als een andere aanvangsdosis dan 5 000 mg/kg wordt gebruikt, wordt de test bij resultaat B of C met 2 000 mg/kg voortgezet met 5 000 mg/kg; wanneer vervolgens 5 000 mg/kg resultaat A oplevert, wordt 2 000 mg/kg als aanvangsdosis voor het hoofdonderzoek gekozen en bij resultaat B of C wordt 5 000 mg/kg als aanvangsdosis gekozen.

▼B

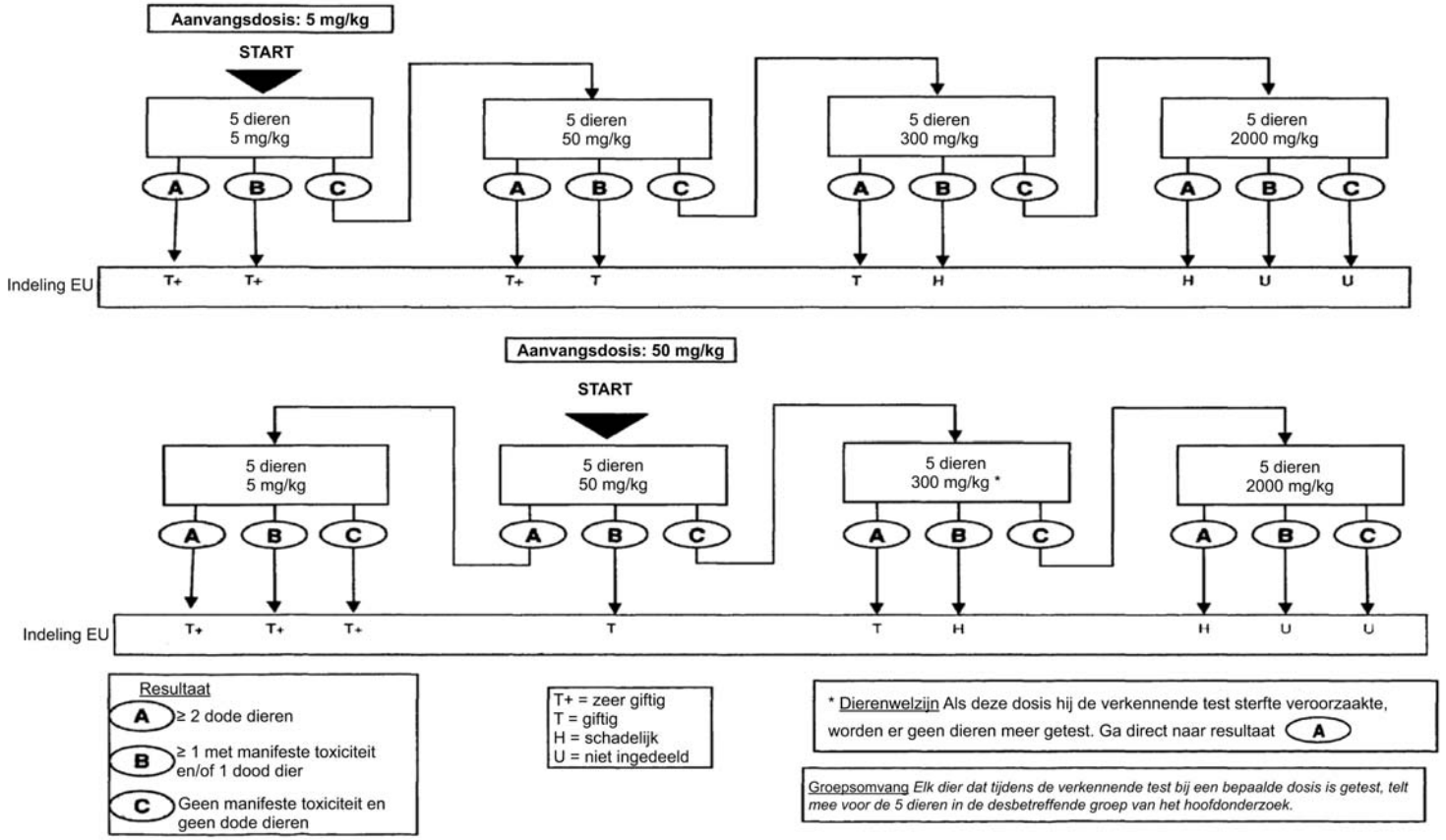
Hoofdonderzoek

De beslissingsregels voor de sequentiële procedure van bijlage 2 worden uitgebreid met een dosis van 5 000 mg/kg Dit betekent dat wanneer er bij het hoofdonderzoek een aanvangsdosis van 5 000 mg/kg wordt gebruikt die resultaat A (> 2 dode dieren) oplevert, een tweede groep bij 2 000 mg/kg wordt getest; bij resultaat B (manifeste toxiciteit en/of < 1 dood dier) of C (geen toxiciteit) wordt de stof niet volgens het GHS ingedeeld. Als een andere aanvangsdosis dan 5 000 mg/kg wordt gebruikt, wordt de test bij resultaat C met 2 000 mg/kg voortgezet met 5 000 mg/kg; wanneer vervolgens 5 000 mg/kg resultaat A oplevert, wordt de stof ingedeeld in categorie 5 van het GHS en bij resultaat B of C wordt de stof niet ingedeeld.

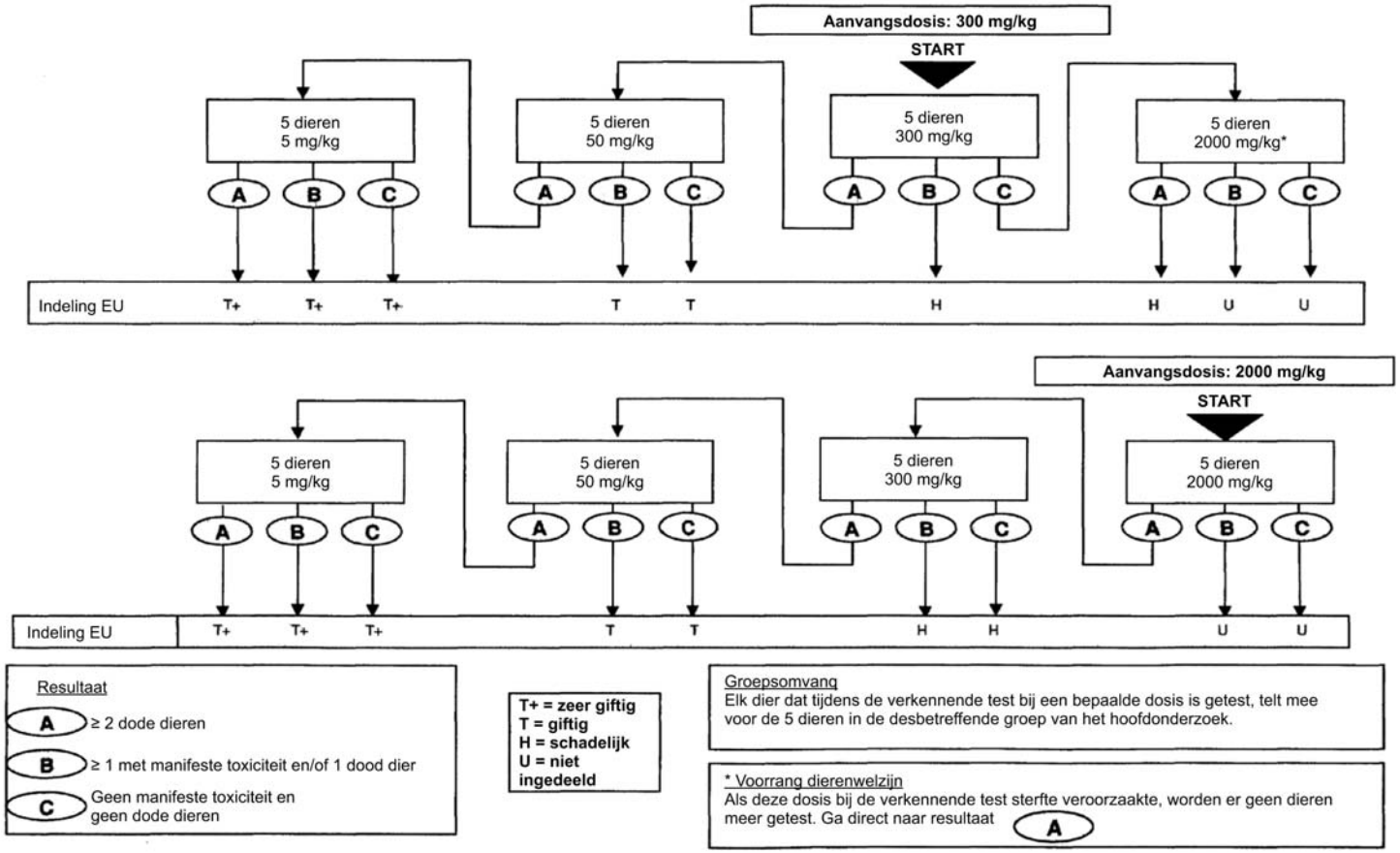
BIJLAGE 4:

TESTMETHODE B.1 bis

Leidraad voor de indeling in het EU-systeem gedurende de overgangsperiode totdat het „Globally Harmonised Classification System" (GHS) volledig is ingevoerd (overgenomen uit referentie (8))



▼B


Aanvangsdosis: 300 mg/kg
START
5 dieren 5 mg/kg
5 dieren 50 mg/kg
5 dieren 300 mg/kg
5 dieren 2000 mg/kg*
A B C
Indeling EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Aanvangsdosis: 2000 mg/kg
START
5 dieren 5 mg/kg
5 dieren 50 mg/kg
5 dieren 300 mg/kg
5 dieren 2000 mg/kg
A B C
Indeling EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Resultaat
A ≥ 2 dode dieren
B ≥ 1 met manifeste toxiciteit en/of 1 dood dier
C Geen manifeste toxiciteit en geen dode dieren
T+ = zeer giftig
T = giftig
H = schadelijk
U = niet ingedeeld
Groepsomvang
Elk dier dat tijdens de verkennende test bij een bepaalde dosis is getest, telt mee voor de 5 dieren in de desbetreffende groep van het hoofdonderzoek.
* Voorrang dierenwelzijn
Als deze dosis bij de verkennende test sterfte veroorzaakte, worden er geen dieren meer getest. Ga direct naar resultaat A

▼B

B.1 ter. **ACUTE ORALE TOXICITEIT: METHODE TER BEPALING VAN DE ACUTE-TOXICITEITSKLASSE**

1. **METHODE**

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 423 (2001) van de OESO.

1.1. INLEIDING

De in deze test beschreven methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (1) is een stapsgewijze procedure waarbij voor iedere stap drie dieren van hetzelfde geslacht worden gebruikt. Afhankelijk van het aantal dode en/of stervende dieren kunnen er gemiddeld twee tot vier stappen nodig zijn om een uitspraak over de acute toxiciteit van de teststof te kunnen doen. Deze procedure is reproduceerbaar, gebruikt heel weinig dieren en kan stoffen op een vergelijkbare wijze rangschikken als de andere testmethoden voor acute toxiciteit. De methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse is gebaseerd op biometrische evaluaties (2)(3)(4)(5) met vaste doses, die ver genoeg uiteenliggen om een stof met het oog op de indeling en de bepaling van de gevaren te kunnen rangschikken. De in 1996 goedgekeurde methode is zowel op nationaal (6) als op internationaal (7) niveau uitgebreid *in vivo* gevalideerd in vergelijking met LD_{50}-gegevens uit de literatuur.

Richtsnoeren voor de keuze van de meest geschikte testmethode voor een bepaald doel worden gegeven in de leidraad voor tests op acute orale toxiciteit (8). Deze leidraad bevat ook aanvullende informatie over de uitvoering en interpretatie van testmethode B.1 ter.

Teststoffen behoeven niet te worden toegediend in doses waarvan bekend is dat ze door een bijtende of sterk irriterende werking hevige pijn en leed veroorzaken. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, worden op humane wijze gedood en worden bij de interpretatie van de testresultaten op dezelfde manier behandeld als dieren die tijdens de test gestorven zijn. Er is een aparte leidraad met criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen (9).

Bij de methode worden vooraf bepaalde doses gebruikt en de resultaten maken het mogelijk de stof te rangschikken en in te delen aan de hand van het „Globally Harmonised System” voor de indeling van chemische stoften die acute toxiciteit veroorzaken (10).

De methode is in principe niet bedoeld om de berekening van een exacte LD_{50} mogelijk te maken, maar er kan wel een zeker blootstellingsinterval worden bepaald waar sterfte te verwachten valt, aangezien sterfte van een deel van de dieren het belangrijkste eindpunt van deze test blijft. Een LD_{50} kan met deze methode alleen worden bepaald wanneer ten minste twee doses een sterfte tussen 0 % en 100 % opleveren. Het gebruik van een aantal vooraf bepaalde doses, ongeacht de teststof, waarbij de indeling expliciet wordt gekoppeld aan het aantal dieren waarbij uiteenlopende toestanden worden geobserveerd, biedt betere mogelijkheden voor consistentie en herhaalbaarheid bij rapportage door verschillende laboratoria.

▼B

Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Hierbij gaat het om informatie als de identiteit en de chemische structuur van de stof, de fysisch-chemische eigenschappen, het resultaat van andere met de stof uitgevoerde toxiciteitstests *in vivo* of *in vitro*, toxicologische gegevens over de qua structuur verwante stoffen en de voorgenomen toepassing(en) van de stof. Deze informatie is nodig om alle betrokkenen ervan te overtuigen dat de test relevant is voor de bescherming van de gezondheid van de mens en helpt tevens bij de keuze van de geschiktste aanvangsdosis.

1.2. DEFINITIES

Acute orale toxiciteit: de schadelijke effecten die zich voordoen na orale toediening van een dosis van een stof of verschillende doses die binnen 24 uur worden toegediend.

Vertraagde sterfte: houdt in dat een dier niet binnen 48 uur sterft of stervende is maar later gedurende de observatieperiode van 14 dagen sterft.

Dosis: de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bijvoorbeeld mg/kg).

GHS: het „Globally Harmonised Classification System" voor chemische stoffen en mengsels. Een samenwerkingsproject van de OESO (gezondheid van de mens en milieu), het Comité van deskundigen voor het vervoer van gevaarlijke goederen van de VN (fysisch-chemische eigenschappen) en de ILO (communicatie van gevaren) dat wordt gecoördineerd door het Gezamenlijk programma voor een verantwoord beheer van chemische stoften (IOMC).

Ophanden zijnde sterfte: wanneer voor het eerstvolgende geplande observatietijdstip een stervende toestand of sterfte wordt verwacht. Voorbeelden van indicaties voor deze toestand bij knaagdieren zijn convulsies, zijligging, liggende positie en tremors (zie de leidraad voor humane eindpunten (9) voor meer bijzonderheden).

LD_{50} (mediaan van de orale letale dosis): een statistisch afgeleide enkelvoudige dosis van een stof waarvan kan worden verwacht dat 50 % van de dieren waaraan deze dosis oraal wordt toegediend, sterft. De LD_{50} wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (mg/kg).

Limietdosis: een dosis die bij tests als bovengrens wordt gehanteerd (2 000 of 5 000 mg/kg).

Stervende toestand: een toestand waarop de dood volgt of waarin overleven onmogelijk is, zelfs wanneer het dier wordt behandeld (zie de leidraad voor humane eindpunten (9) voor meer bijzonderheden).

Voorspelbare sterfte: een toestand met klinische verschijnselen die wijzen op sterfte op een bekend tijdstip in de toekomst voor het geplande einde van het experiment, bijvoorbeeld wanneer het dier geen water of voer kan bereiken (zie de leidraad voor humane eindpunten (9) voor meer bijzonderheden).

▼B

1.3. PRINCIPE VAN DE TEST

Het principe van de test is dat op basis van een stapsgewijze procedure, waarbij per stap een zo klein mogelijk aantal dieren wordt gebruikt, voldoende informatie over de acute toxiciteit van de teststof wordt verkregen om deze in te kunnen delen. Een van de vaste doses van de stof wordt oraal aan een groep proefdieren toegediend. De stof wordt stapsgewijs getest en bij elke stap worden drie dieren van hetzelfde geslacht (normaal gesproken vrouwtjes) gebruikt. Het resultaat van de stap (dieren die ten gevolge van de toediening van de stof sterven of niet) is bepalend voor de volgende stap, namelijk:

— de test kan worden gestaakt,

— dezelfde dosis wordt aan nog eens drie dieren toegediend of

— de eerstvolgende hogere of lagere dosis wordt aan drie andere dieren toegediend.

Bijlage 1 bevat een gedetailleerde beschrijving van de testprocedure. Met deze methode kan een uitspraak worden gedaan over de indeling van de teststof in een van de toxiciteitsklassen die elk worden begrensd door vaste LD_{50} waarden.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.4.1. **Keuze van de diersoort**

Bij voorkeur wordt de rat gebruikt, maar ook andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt Normaal gesproken worden vrouwtjes gebruikt (9), omdat uit literatuuronderzoek van klassieke LD_{50}-tests blijkt dat er weliswaar meestal weinig verschil in gevoeligheid tussen mannetjes en vrouwtjes is, maar dat vrouwtjes meestal iets gevoeliger zijn wanneer er verschillen worden geconstateerd (11). Als echter uit kennis omtrent de toxicologische of toxicokinetische eigenschappen van qua structuur verwante chemische stoffen blijkt dat mannetjes waarschijnlijk gevoeliger zullen zijn, moeten mannetjes worden gebruikt. Wanneer de test bij mannetjes wordt uitgevoerd, moet hiervoor een afdoende motivering worden gegeven.

Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Elk dier moet bij de eerste toediening 8 tot 12 weken oud zijn en het lichaamsgewicht mag niet meer dan ± 20 % afwijken van het gemiddelde gewicht van dieren waaraan al eerder een dosis is toegediend.

1.4.2. **Huisvesting en voeding**

De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De dieren mogen per dosis in groepen worden gehuisvest, maar het aantal dieren per kooi mag niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord.

▼B

1.4.3. **Voorbereiding van de dieren**

De dieren worden aselect ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren en voor de toediening gedurende minimaal 5 dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

1.4.4. **Bereiding van de dosis**

In het algemeen worden alle doses van de teststof in het hele testbereik in een constant volume toegediend door de concentratie van de toegediende dosis te variëren. Wanneer echter een vloeibaar eindproduct of mengsel wordt getest, kan het voor de latere risicobeoordeling van die stof zinvoller zijn de teststof onverdund, d.w.z. met een constante concentratie, te gebruiken en sommige regelgevende instanties hebben dit verplicht gesteld. Het maximaal toe te dienen volume mag echter in geen geval worden overschreden. Het is afhankelijk van de grootte van het proefdier welk volume vloeistof in één keer kan worden toegediend. Bij knaagdieren mag het volume normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden overwogen. Voor de formulering van de dosis wordt waar mogelijk het gebruik van een waterige oplossing/suspensie/emulsie aanbevolen, in volgorde van voorkeur gevolgd door een oplossing/suspensie/emulsie in olie (bijvoorbeeld maïsolie) en eventueel een oplossing in een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxicologische kenmerken van het medium bekend zijn. De dosis moet kort voor de toediening worden bereid, tenzij de stabiliteit van het preparaat gedurende de gebruiksperiode bekend is en is aangetoond dat deze aanvaardbaar is.

1.5. PROCEDURE

1.5.1. **Toediening van de dosis**

De teststof wordt in een dosis toegediend met een maagsonde of een geschikte katheter In het uitzonderlijke geval dat een dosis niet mogelijk is, kan de dosis in kleinere porties worden verdeeld die in de loop van maximaal 24 uur worden toegediend.

De dieren moeten voor de toediening vasten (ratten mogen bijvoorbeeld de nacht voor de toediening geen voer maar wel water krijgen en muizen gedurende 3-4 uur). Na de vastpenode worden de dieren gewogen en wordt de teststof toegediend. Na de toediening van de stof kan men ratten nog eens 3-4 uur en muizen nog eens 1-2 uur laten vasten. Wanneer een dosis in de loop van de tijd in porties wordt toegediend, kan het afhankelijk van de lengte van de periode nodig zijn de dieren voer en water te geven.

1.5.2. **Aantal dieren en hoogte van de doses**

Voor elke stap worden er drie dieren gebruikt. Een van de vier vaste doses 5, 50, 300 en 2 000 mg/kg lichaamsgewicht wordt als aanvangsdosis gekozen. Als aanvangsdosis wordt de dosis gekozen waarbij naar alle waarschijnlijkheid enkele dieren zullen sterven. In de stroomschema's van bijlage 1 wordt de procedure beschreven die bij elk van de aanvangsdoses moet worden gevolgd. Daarnaast bevat bijlage 4 een leidraad voor de indeling in het EU systeem totdat het nieuwe GHS is ingevoerd.

▼B

Wanneer de beschikbare informatie erop wijst dat er bij de hoogste aanvangdosis (2 000 mg/kg lichaamsgewicht) waarschijnlijk geen dieren zullen sterven, moet er een limiettest worden uitgevoerd. Wanneer er geen informatie over een te testen stof is, wordt met het oog op het welzijn van dieren aanbevolen 300 mg/kg lichaamsgewicht als aanvangsdosis te gebruiken.

Het tijdsverloop tussen de toediening aan de verschillende groepen wordt bepaald door de aanvang, de duur en de ernst van de toxiciteitsverschijnselen. Met de toediening van een volgende dosis moet worden gewacht totdat men er zeker van is dat de eerder geteste dieren blijven leven.

Bij wijze van uitzondering kan alleen met een motivering op basis van specifieke regelgevingsvereisten daarnaast het gebruik van een hogere vaste dosis van 5 000 mg/kg lichaamsgewicht worden overwogen (zie bijlage 2). Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven in GHS categorie 5 (2 000-5 000 mg/kg) niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die test van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van mens of dier of het milieu.

1.5.3. **Limiettest**

De limiettest wordt voornamelijk uitgevoerd wanneer er informatie is die erop wijst dat het testmateriaal waarschijnlijk niet toxisch is c.q. alleen toxisch is in hogere doses dan de limieten in de regelgeving. Informatie over de toxiciteit van het testmateriaal kan afkomstig zijn van kennis omtrent vergelijkbare geteste verbindingen of vergelijkbare geteste mengsels of producten, waarbij rekening wordt gehouden met de identiteit en het percentage van de bestanddelen waarvan bekend is dat ze in toxicologisch opzicht relevant zijn. Wanneer er weinig of geen informatie over de toxiciteit van het testmateriaal is of wordt verwacht dat het toxisch is, moet het hoofdonderzoek worden uitgevoerd.

Er kan een limiettest met een dosisniveau van 2 000 mg/kg worden uitgevoerd met zes dieren (drie dieren per stap). Bij wijze van uitzondering kan er een limiettest met een dosisniveau van 5 000 mg/kg worden uitgevoerd met drie dieren (zie bijlage 2). Als er dieren vanwege de toediening van de stof sterven, kan het nodig zijn de test bij de eerstvolgende lagere dosis voort te zetten.

1.6. OBSERVATIE

De dieren worden gedurende de eerste 30 minuten na de toediening ten minste eenmaal elk afzonderlijk geobserveerd, gedurende de eerste 24 uur periodiek met bijzondere aandacht voor de eerste vier uur en vervolgens dagelijks gedurende in totaal 14 dagen, behalve wanneer ze met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek moeten worden genomen en op humane wijze moeten worden gedood of dood aangetroffen worden. De observatieduur is echter geen regel waarvan niet kan worden afgeweken. Deze moet worden bepaald aan de hand van de toxische reacties, het tijdstip waarop ze beginnen en de duur van de herstelperiode en kan dus worden verlengd indien dit nodig wordt geacht. Het is belangrijk op welk tijdstip de toxiciteitsverschijnselen verschijnen en verdwijnen, vooral als er een neiging is tot vertraagde toxiciteitsverschijnselen (12). Alle observaties worden systematisch geregistreerd en voor elk dier wordt een apart verslag bijgehouden.

▼B

Als de dieren toxiciteitsverschijnselen blijven vertonen, is aanvullende observatie nodig. Bij de observatie wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedragspatroon. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Er moet rekening worden gehouden met de beginselen en criteria in de leidraad voor humane eindpunten (9). Dieren die stervend worden aangetroffen en dieren die hevige pijn hebben of blijvende tekenen van ernstig leed vertonen, worden op humane wijze gedood. Wanneer dieren op humane wijze worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

1.6.1. **Lichaamsgewicht**

Kort vóór de toediening van de teststof en vervolgens ten minste wekelijks wordt het gewicht van elk dier bepaald. De gewichtsverandering wordt berekend en geregistreerd. Aan het einde van de test worden de dieren die nog leven gewogen en op humane wijze gedood.

1.6.2. **Pathologie**

Op alle proefdieren (ook degene die tijdens de test sterven of met het oog op het welzijn van dieren uit het onderzoek worden genomen) wordt macroscopische obductie uitgevoerd. Alle macroscopische pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd. Microscopisch onderzoek van organen die tekenen van macroscopische pathologische veranderingen vertonen bij dieren die na 24 uur of langer nog leven, kan ook worden overwogen aangezien dit nuttige informatie kan opleveren.

2. **GEGEVENS**

Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast worden alle gegevens in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of op humane wijze is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. **TESTVERSLAG**

In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen:

Teststof

— de fysische aard, de zuiverheid en indien relevant de fysisch chemische eigenschappen (bv. de isomeersamenstelling);

— identificatiegegevens, zoals het CAS-nr.

Medium (indien van toepassing):

— een motivering voor de keuze van het medium als een ander medium dan water wordt gebruikt.

Proefdieren:

— de gebruikte soort/stam;

▼B

— de microbiologische status van de dieren, indien deze bekend is;

— het aantal dieren, hun leeftijd en hun geslacht (indien van toepassing een motivering voor het gebruik van mannetjes in plaats van vrouwtjes);

— de herkomst, de huisvesting, de voeding enz.

Testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof met bijzonderheden over de fysische vorm van het toegediende materiaal;

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof met vermelding van het toegediende volume en het toedieningstijdstip;

— gedetailleerde gegevens over het voer en het water (met vermelding van de aard/herkomst van het voer en de herkomst van het water);

— de motivering voor de keuze van de aanvangsdosis.

Resultaten:

— een tabel met gegevens over de respons en de dosis voor elk dier (bv. dieren met toxiciteitsverschijnselen of sterfte en de aard, de hevigheid en de duur van de effecten);

— een tabel met het lichaamsgewicht en de veranderingen in het lichaamsgewicht;

— het gewicht van de dieren op de toedieningsdag, daarna een keer per week en tenslotte wanneer ze sterven of gedood worden;

— de datum en het tijdstip waarop de dieren sterven, als dit eerder gebeurt dan gepland;

— voor elk dier de aanvang en het verloop van de toxiciteitsverschijnselen en of ze reversibel waren;

— voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar.

Bespreking en interpretatie van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

(1) Roll R., Hofer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschlager M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizitat 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 Chemical 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 Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11. [http://webnetl.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 A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

BIJLAGE 1

PROCEDURE VOOR ELKE AANVANGSDOSIS

ALGEMENE OPMERKINGEN

In de stroomschema's in deze bijlage wordt voor elke aanvangsdosis de te volgen procedure geschetst:

— Bijlage 1 A: Aanvangsdosis 5 mg/kg lichaamsgewicht

— Bijlage 1 B: Aanvangsdosis 50 mg/kg lichaamsgewicht

— Bijlage 1 C: Aanvangsdosis 300 mg/kg lichaamsgewicht

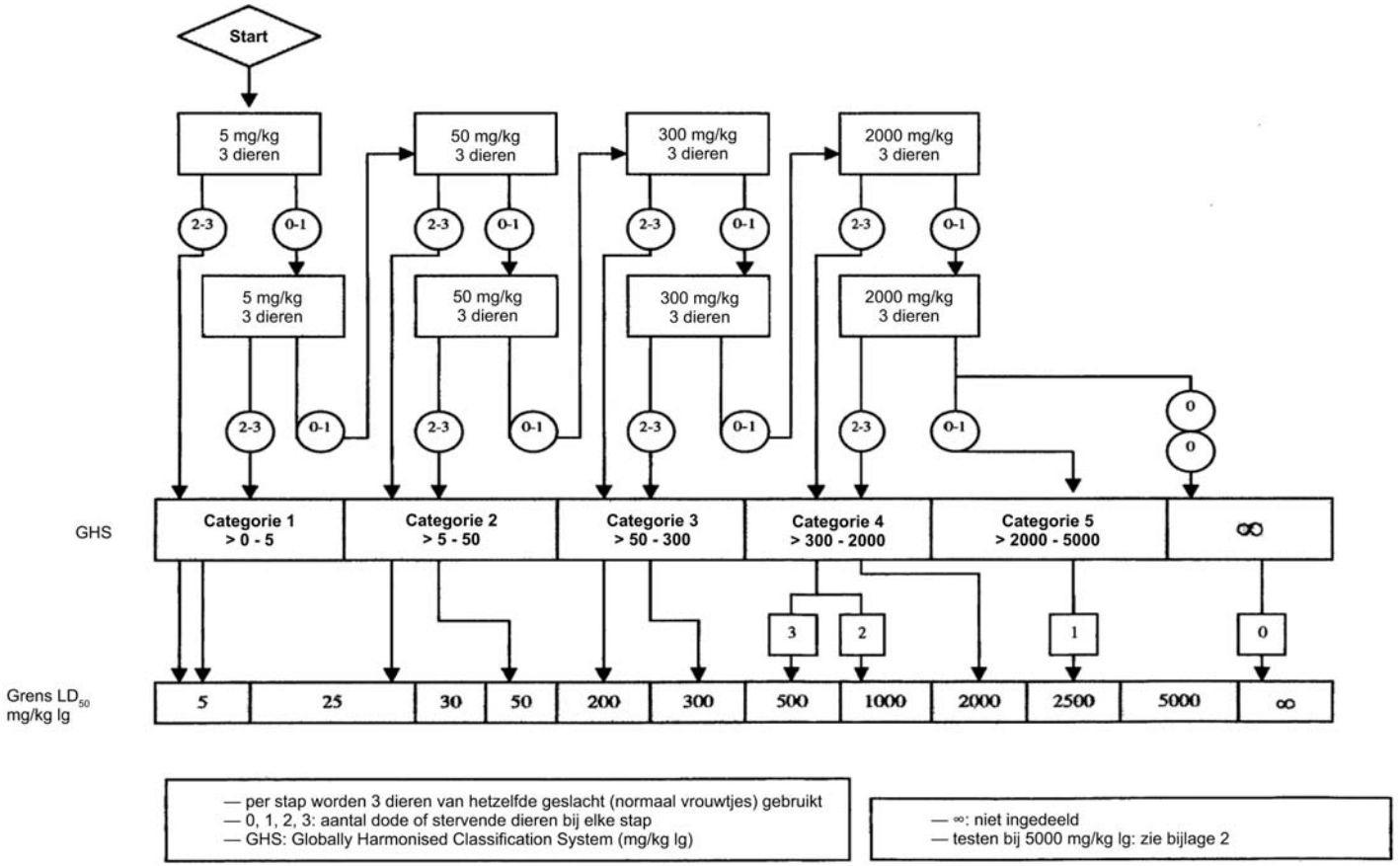
— Bijlage 1 D: Aanvangsdosis 2 000 mg/kg lichaamsgewicht

De pijlen geven, afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze gedode dieren, de te volgen procedure aan.

▼B

BIJLAGE 1 A

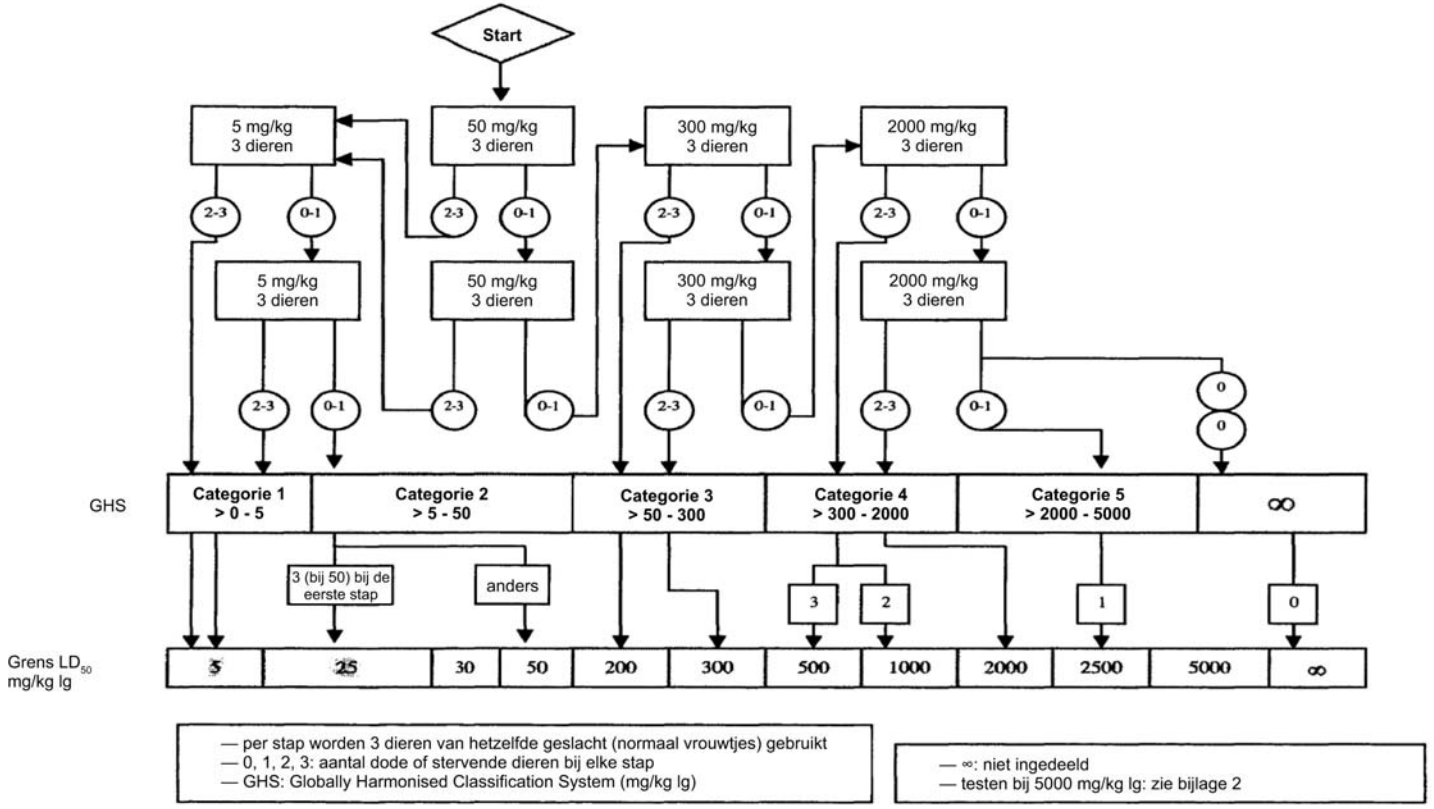
TESTPROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 5 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



▼B

BIJLAGE 1 B

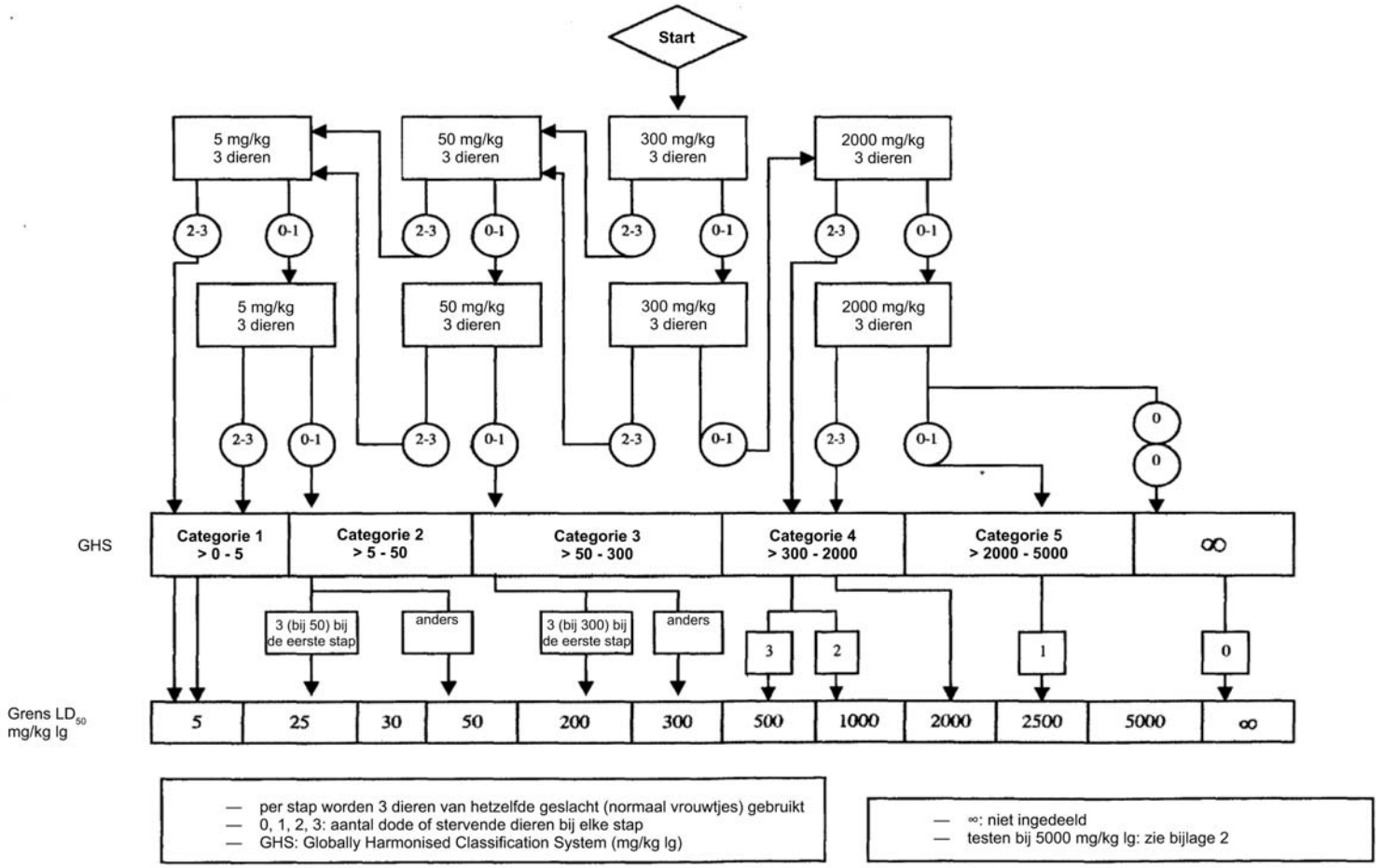
TESTPROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 50 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 226

BIJLAGE 1 C

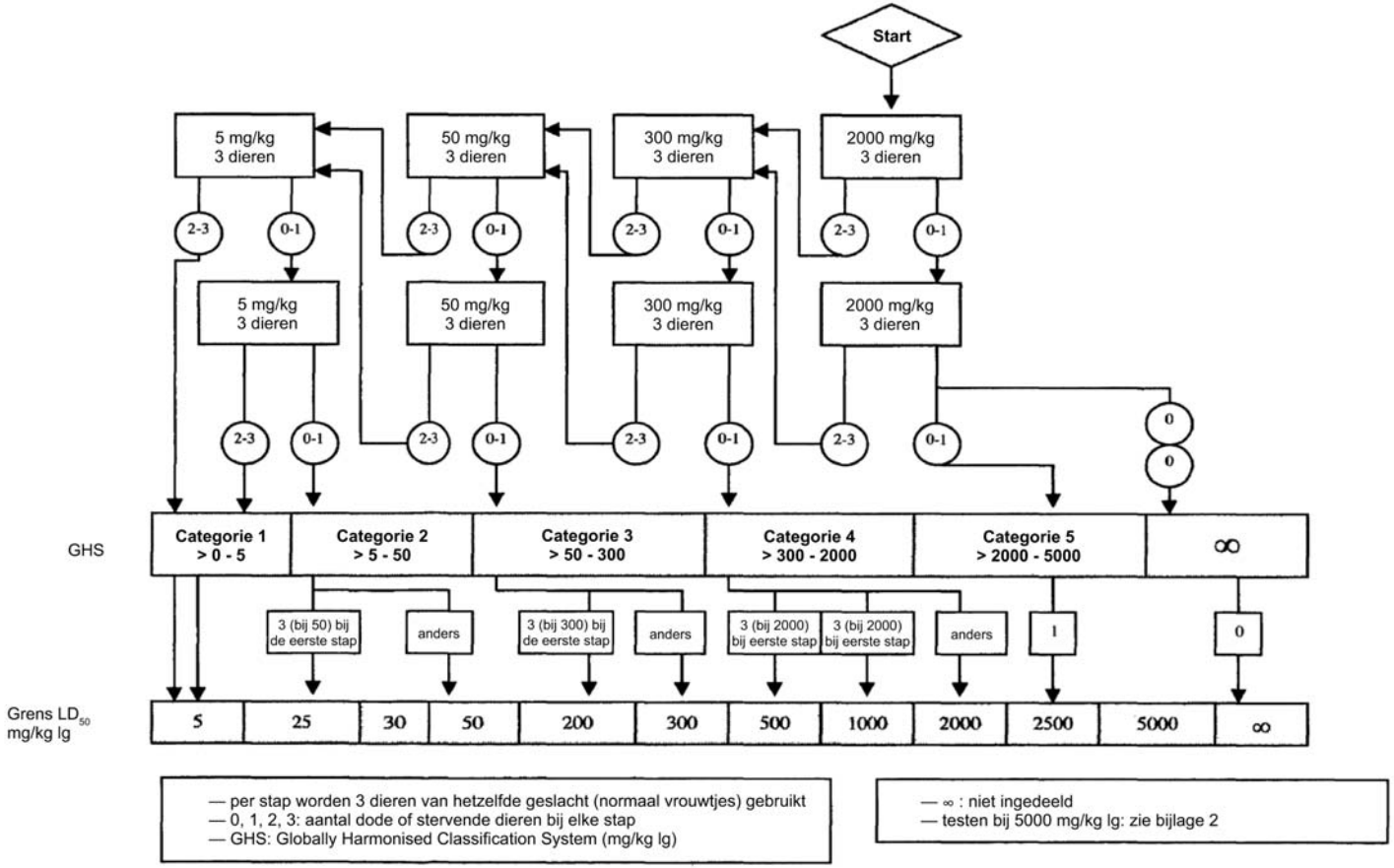
TESTROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 300 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



▼B

BIJLAGE 1 D

TESTPROCEDURE MET EEN AANVANGSDOSIS VAN 2 000 MG/KG LICHAAMSGEWICHT



▼B

BIJLAGE 2

CRITERIA VOOR DE INDELING VAN TESTSTOFFEN MET EEN VERWACHTE LD_{50}, DIE HOGER LIGT DAN 2 000 MG/KG ZONDER DAT ER TESTS BEHOEVEN TE WORDEN UITGEVOERD

De criteria voor de gevarencategorie 5 zijn bedoeld om teststoffen te kunnen signaleren die een betrekkelijk geringe acute toxiciteit hebben, maar onder bepaalde omstandigheden een gevaar voor kwetsbare bevolkingsgroepen kunnen opleveren. Van deze stoffen wordt verwacht dat ze een orale of dermale LD_{50} tussen 2 000 en 5 000 mg/kg hebben of een vergelijkbare toxiciteit voor andere routes. Deze teststoffen moeten in de volgende gevallen in de gevarencategorie 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg worden ingedeeld (categorie 5 in het GHS).

a) als ze via een van de testschema's van bijlage 1A-1D op basis van de sterftecijfers in deze categorie terechtkomen;

b) als er al betrouwbaar bewijsmateriaal beschikbaar is waaruit blijkt dat de LD_{50} binnen het interval van categorie 5 valt of als uit ander onderzoek bij dieren of toxische effecten bij de mens blijkt dat er sprake is van een risico voor de gezondheid van de mens van acute aard;

c) via extrapolatie, raming of meting van gegevens als indeling in een gevaarlijkere categorie niet terecht is en

   — er betrouwbare informatie beschikbaar is die wijst op significante toxische effecten bij de mens of

   — bij tests tot waarden van categorie 4 langs orale weg sterfte wordt waargenomen of

   — wanneer het oordeel van deskundigen bevestigt dat er bij tests tot waarden voor categorie 4 significante klinische toxiciteitsverschijnselen zijn, met uitzondering van diarree, pilo-erectie of een onverzorgd uiterlijk of

   — wanneer het oordeel van deskundigen betrouwbare informatie bevestigt die op grond van andere dierproeven op mogelijke significante acute effecten wijst.

TESTEN BIJ DOSES VAN MEER DAN 2 000 MG/KG

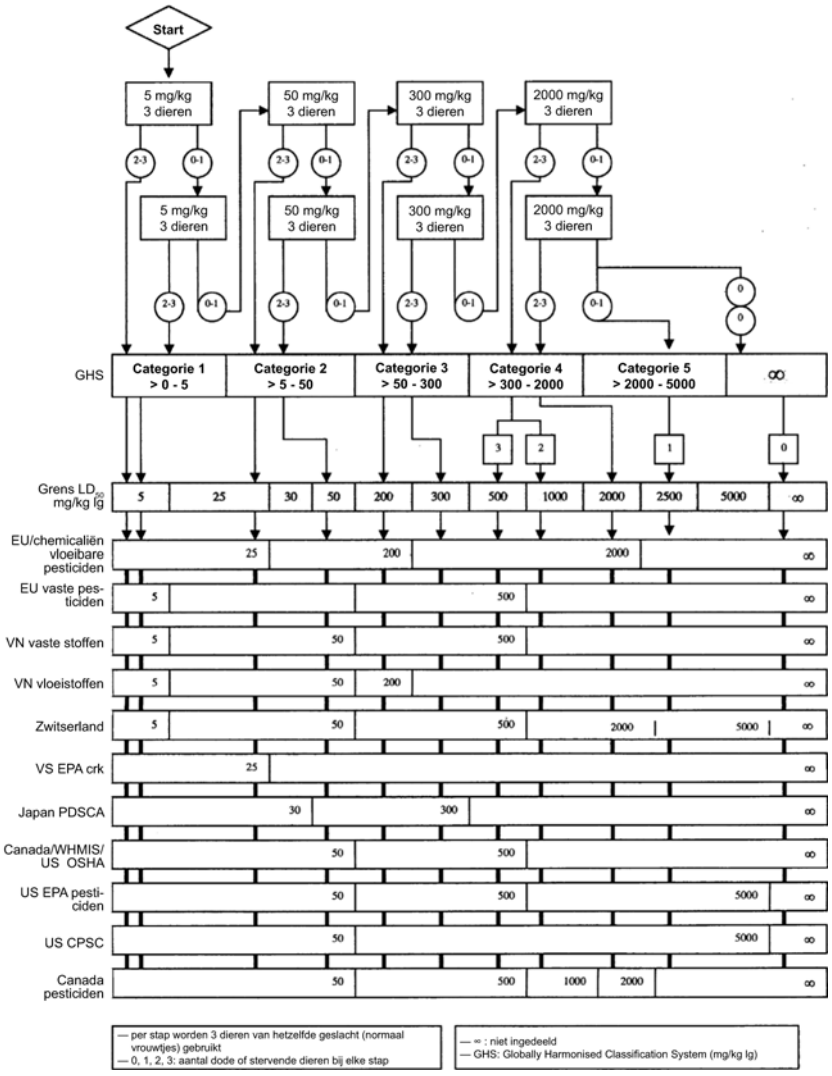
Met het oog op het welzijn van dieren zijn dierproeven in categorie 5 (5 000 mg/kg) niet wenselijk en moeten deze alleen worden overwogen wanneer er een grote kans is dat de resultaten van die test van direct belang zijn voor de bescherming van de gezondheid van mens of dier (10). Er dienen geen verdere tests bij hogere doses te worden uitgevoerd.

Wanneer testen met een dosis van 5 000 mg/kg nodig is, wordt er slechts één stap (d.w.z. drie dieren) uitgevoerd. Als het eerste dier na toediening sterft, gaat de toediening verder met 2 000 mg/kg volgens de stroomschema's van bijlage 1. Als het eerste dier blijft leven, wordt aan nog eens twee dieren 5 000 mg/kg toegediend. Als slechts één van de drie dieren sterft, wordt ervan uitgegaan dat de LD_{50} hoger is dan 5 000 mg/kg. Als beide dieren sterven, gaat de toediening verder met 2 000 mg/kg.

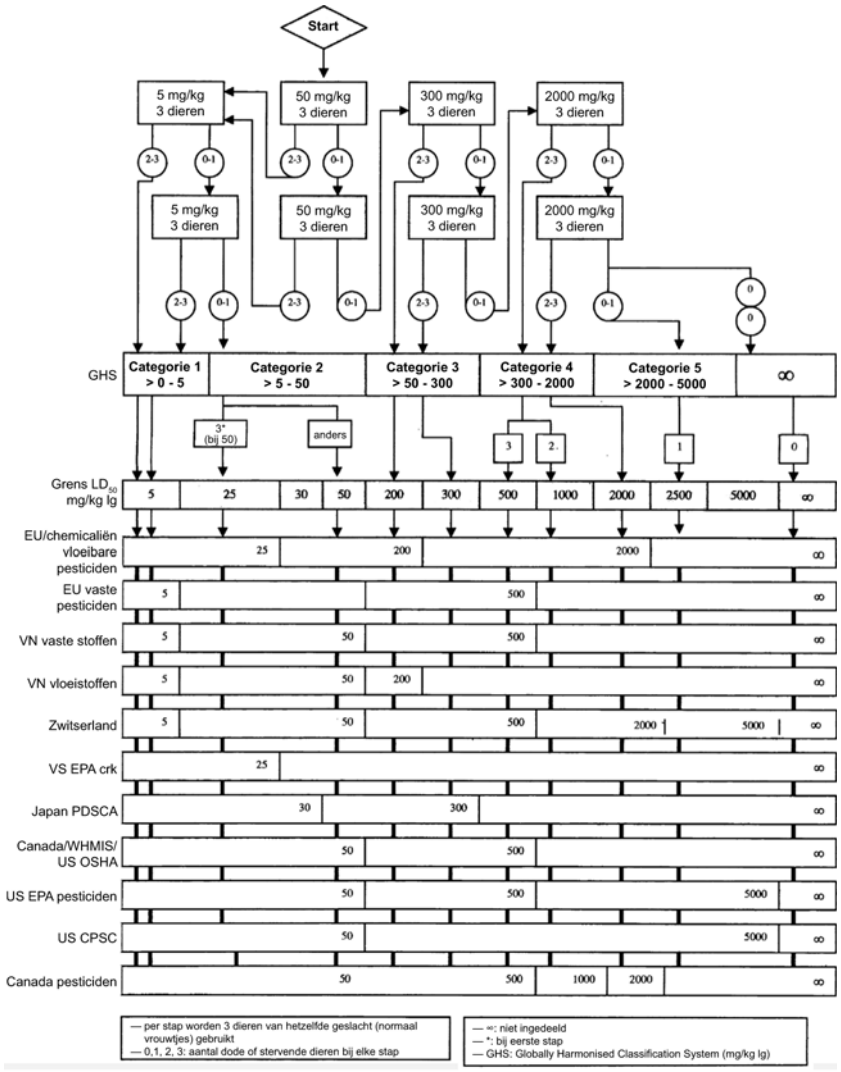
▼B

BIJLAGE 3

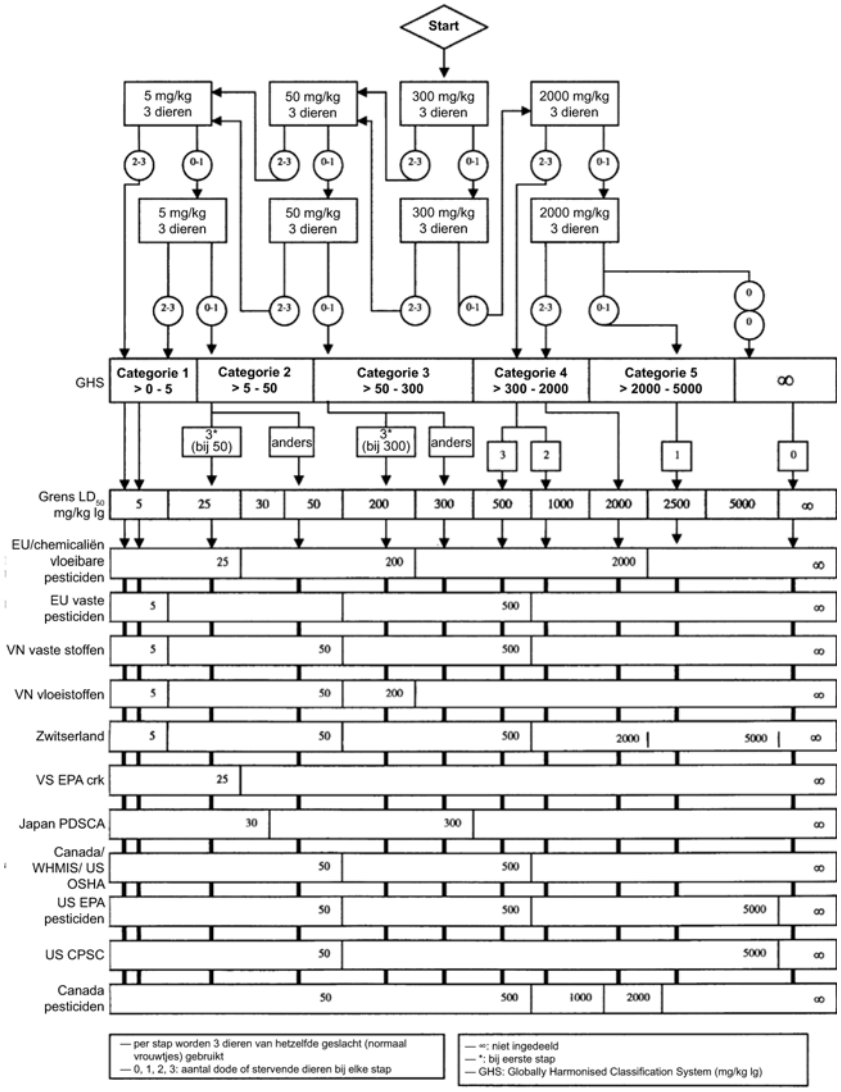
TESTMETHODE B.1 ter: Leidraad voor de indeling in het EU-systeem gedurende de overgangsperiode totdat het „Globally Harmonised Classification System" (GHS) volledig is ingevoerd (overgenomen uit referentie (8))



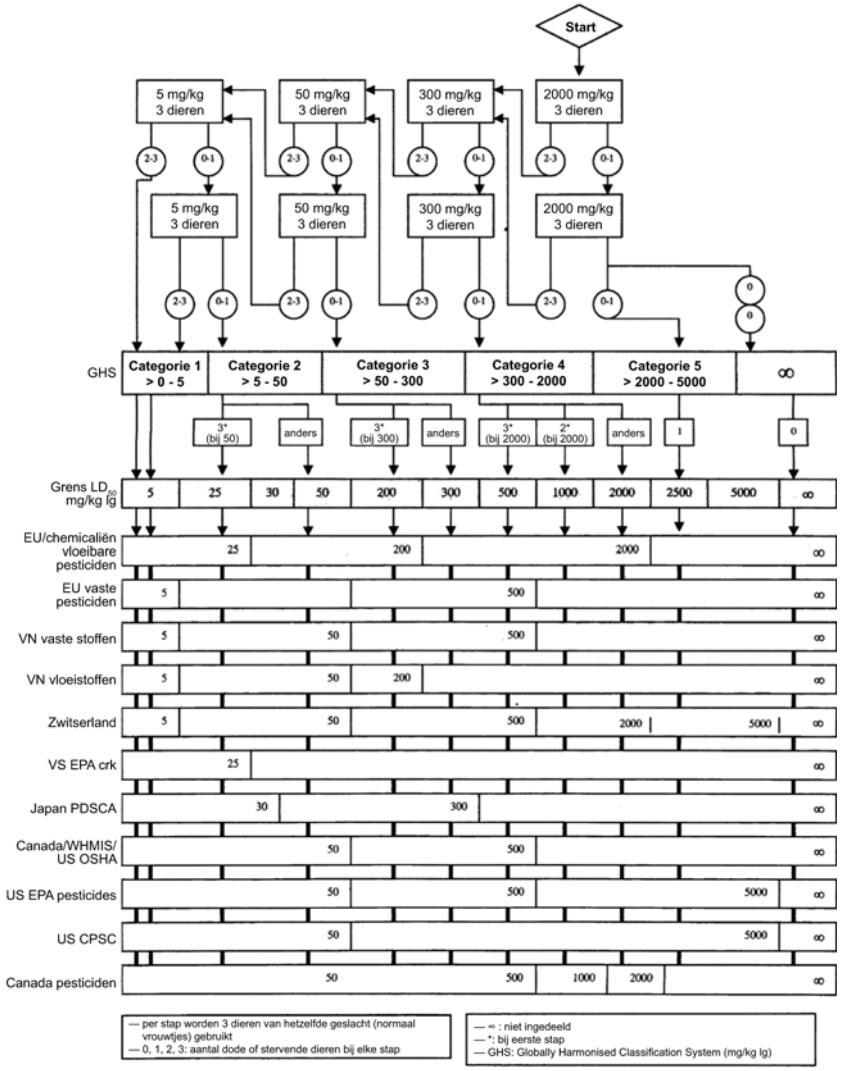
▼B


Start
5 mg/kg 3 dieren
50 mg/kg 3 dieren
300 mg/kg 3 dieren
2000 mg/kg 3 dieren
2-3
0-1
0
GHS
Categorie 1 > 0 - 5
Categorie 2 > 5 - 50
Categorie 3 > 50 - 300
Categorie 4 > 300 - 2000
Categorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (bij 50)
anders
Grens LD50 mg/kg lg
EU/chemicaliën vloeibare pesticiden
EU vaste pesticiden
VN vaste stoffen
VN vloeistoffen
Zwitserland
VS EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticiden
US CPSC
Canada pesticiden
— per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
— 0,1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
— =: niet ingedeeld
— *: bij eerste stap
— GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 dieren
50 mg/kg 3 dieren
300 mg/kg 3 dieren
2000 mg/kg 3 dieren
2-3
0-1
0
GHS
Categorie 1 > 0 - 5
Categorie 2 > 5 - 50
Categorie 3 > 50 - 300
Categorie 4 > 300 - 2000
Categorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (bij 50)
anders
3* (bij 300)
anders
3
2
1
0
Grens LD50 mg/kg lg
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
∞
EU/chemicaliën vloeibare pesticiden
EU vaste pesticiden
VN vaste stoffen
VN vloeistoffen
Zwitserland
VS EPA crk
Japan PDSCA
Canada/ WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticiden
US CPSC
Canada pesticiden
— per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
— 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
— =: niet ingedeeld
— *: bij eerste stap
— GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 dieren
50 mg/kg 3 dieren
300 mg/kg 3 dieren
2000 mg/kg 3 dieren
2-3
0-1
0
GHS
Categorie 1 > 0 - 5
Categorie 2 > 5 - 50
Categorie 3 > 50 - 300
Categorie 4 > 300 - 2000
Categorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (bij 50)
anders
3* (bij 300)
3* (bij 2000)
2* (bij 2000)
1
Grens LD50 mg/kg lg
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU/chemicaliën vloeibare pesticiden
EU vaste pesticiden
VN vaste stoffen
VN vloeistoffen
Zwitserland
VS EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticiden
— per stap worden 3 dieren van hetzelfde geslacht (normaal vrouwtjes) gebruikt
— 0, 1, 2, 3: aantal dode of stervende dieren bij elke stap
— ∞ : niet ingedeeld
— *: bij eerste stap
— GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg lg)

▼M4

B.2. ACUTE INHALATIETOXICITEIT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 403 (2009) van de OESO (1). Testrichtlijn 403 (TG 403), de oorspronkelijke testrichtlijn voor acute inhalatie, werd in 1981 vastgesteld. Deze herziene testmethode B.2 (die gelijkwaardig is aan de herziene versie van TG 403) is ontworpen om de flexibiliteit te vergroten, het gebruik van dieren terug te dringen en in regelgevingsbehoeften te voorzien. De herziene testmethode omvat twee soorten onderzoek: een traditioneel LC_{50}-protocol en een concentratie × tijd-protocol (c × t-protocol). Deze testmethode heeft als belangrijkste kenmerken dat zij het mogelijk maakt om een verband tussen concentratie en respons vast te stellen dat loopt van een niet-dodelijke tot een dodelijke afloop, teneinde een mediaan letale concentratie (LC_{50}), niet-dodelijke drempelconcentratie (bv. LC_{01}), en helling af te leiden, en om mogelijke geslachtsgebonden gevoeligheid aan te tonen. Het c × t-protocol moet worden gebruikt wanneer specifieke behoeften op het gebied van regelgeving of wetenschap het nodig maken gedurende meerdere perioden van verschillende duur dierproeven uit te voeren, bijvoorbeeld met het oog op het opstellen van rampenbestrijdingsplannen (bv. om waarden voor de richtniveaus voor acute blootstelling (Acute Exposure Guideline Levels, AEGL's), richtsnoeren voor rampenbestrijdingsplannen (Emergency Response Planning Guidelines (ERPG's), of drempelniveaus voor acute blootstelling (Acute Exposure Threshold Levels, AETL's) af te leiden) of ruimtelijkeordeningsplannen.

2. Aanwijzingen voor de uitvoering en interpretatie van onderzoek volgens deze testmethode zijn opgenomen in de leidraad betreffende tests op acute inhalatietoxiciteit (GD 39 (2)).

3. De in de context van deze testmethode gebruikte definities zijn opgenomen in het laatste deel van dit hoofdstuk en in GD 39 (2).

4. Deze testmethode maakt het mogelijk teststoffen te karakteriseren, er een kwantitatieve risicobeoordeling voor uit te voeren, en ze te rangschikken en in te delen overeenkomstig Verordening (EG) nr. 1272/2008 (3). GD 39 (2) bevat een leidraad voor de keuze van de geschikte testmethode voor acute toxiciteitstests. Wanneer alleen informatie over indeling en etikettering nodig is, wordt over het algemeen hoofdstuk B.52 van deze bijlage (4) aanbevolen (zie GD 39 (2)). Deze testmethode B.2 is niet specifiek bedoeld voor het testen van speciale materialen, zoals slecht oplosbare isometrische materialen of vezelmaterialen of gefabriceerde nanomaterialen.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

5. Alvorens te overwegen deze testmethode toe te passen, moet het testlaboratorium alle beschikbare informatie over de teststof, met inbegrip van bestaande studies (bv. hoofdstuk B.52 van deze bijlage (4)) waarvan de gegevens een argument vormen om geen aanvullende tests uit te voeren, in aanmerking nemen teneinde het gebruik van dieren tot een minimum te beperken. Voor de keuze van de geschiktste soorten, stam, geslacht, wijze van blootstelling en testconcentraties kan onder meer gebruik worden gemaakt van informatie over de identiteit, chemische structuur en fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de resultaten van eventuele in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests; de voorgenomen toepassingen en de potentiële blootstelling van de mens; en de beschikbare (Q)SAR-gegevens en toxicologische gegevens over chemische stoffen met een verwante structuur (zie GD 39 (2)).

▼M4

6. Het testen van bijtende en/of irriterende teststoffen bij concentraties die naar verwachting hevige pijn en/of angst zullen veroorzaken, moeten zo veel mogelijk worden vermeden. Het bijtende/irriterende potentieel moet op basis van het oordeel van deskundigen worden geëvalueerd, met behulp van bijvoorbeeld ervaring bij mens en dier (bv. op grond van onderzoek met herhaalde toediening, uitgevoerd bij niet-bijtende/niet-irriterende concentraties), bestaande in-vitrogegevens (bv. op grond van de hoofdstukken B.40 (5) en B.40 bis (6) van deze bijlage of van OESO TG 435 (7)), pH-waarden, informatie over soortgelijke stoffen of andere relevante gegevens, teneinde uit te zoeken of van verdere tests kan worden afgezien. Bij specifieke regelgevingsbehoeften (bv. voor het opstellen van rampenplannen) kan deze testmethode worden gebruikt voor het blootstellen van dieren aan deze materialen, aangezien zij de onderzoeksleider of hoofdonderzoeker de controle geeft over de keuze van de doelconcentraties. De doelconcentraties mogen echter geen ernstige irriterende/bijtende effecten veroorzaken, maar moeten wel toereikend zijn om de concentratie/responscurve uit te breiden tot niveaus die stroken met de wetenschappelijke en regelgevingsdoelstellingen van de test. Deze concentraties moeten per geval worden gekozen en de keuze voor een bepaalde concentratie moet worden gemotiveerd (zie GD 39 (2)).

PRINCIPE VAN DE TEST

7. Deze herziene testmethode B.2 is ontworpen om voldoende informatie te kunnen verzamelen over de acute toxiciteit van een teststof om deze in te kunnen delen, en om voor kwantitatieve risicobeoordelingen benodigde gegevens over de sterfte (bv. LC_{50}, LC_{01} en helling) voor één of beide geslachten te verkrijgen. Deze testmethode omvat twee methoden. De eerste methode is een traditioneel protocol waarin groepen dieren gedurende een vaststaande periode, doorgaans vier uur, aan een limietconcentratie (limiettest) of een stapsgewijze reeks concentraties worden blootgesteld. Voor specifieke regelgevingsdoeleinden kan een andere blootstellingsduur vereist zijn. De tweede methode is een (c × t)-protocol waarin groepen dieren worden blootgesteld aan één concentratie (limietconcentratie) of een reeks van verschillende concentraties gedurende perioden van verschillende duur.

8. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevige en voortdurende angst vertonen, worden op humane wijze gedood en worden bij de interpretatie van het testresultaat op dezelfde manier behandeld als dieren die tijdens de test gestorven zijn. OESO-leidraad nr. 19 inzake humane eindpunten (8) bevat criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

9. Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten; het gebruik van andere soorten moet worden gemotiveerd.

Voorbereiding van de dieren

10. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Op de dag van blootstelling moeten de jonge volwassen dieren acht tot twaalf weken oud zijn en een lichaamsgewicht hebben dat niet meer dan 20 % afwijkt van het gemiddelde gewicht voor elk geslacht van eerder blootgestelde dieren van dezelfde leeftijd. De dieren worden willekeurig gekozen en gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren. De dieren blijven voordat de test begint minimaal vijf dagen in hun kooi om in het laboratorium te acclimatiseren. Vlak voor de test acclimatiseren de dieren ook enige tijd in het testapparaat, aangezien hierdoor de stress als gevolg van de nieuwe omgeving zal afnemen.

▼M4

Dierhouderij

11. De temperatuur van de ruimte waar de proefdieren verblijven, moet 22 ± 3 °C zijn. De relatieve vochtigheid wordt idealiter tussen 30 en 70 % gehouden, maar wanneer water als medium wordt gebruikt, zal dit niet altijd mogelijk zijn. Voor en na de blootstelling worden de dieren over het algemeen groepsgewijs in kooien ondergebracht, waarbij zij naar geslacht en concentratie worden gescheiden; het aantal dieren per kooi mag echter niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord en moet zodanig worden gekozen dat er zo min mogelijk dieren verloren gaan als gevolg van kannibalisme en gevechten. Wanneer de dieren uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan acclimatisatie voor de fixeerbuizen noodzakelijk zijn. De fixeerbuizen mogen geen onnodige lichamelijke, thermische of immobilisatiestress voor de dieren opleveren. De immobilisatie kan van invloed zijn op fysiologische eindpunten zoals de lichaamstemperatuur (hyperthermie) en/of het ademminuutvolume. Als er generieke gegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat geen significante veranderingen als gevolg van de immobilisatie optreden, is geen voorafgaande gewenning aan de fixeerbuizen noodzakelijk. Dieren die met hun hele lijf aan een aerosol worden blootgesteld, worden tijdens de blootstelling individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij het testaerosol filteren door de vacht van hun kooigenoten. Er kan gebruik worden gemaakt van gebruikelijk en gecertificeerd laboratoriumvoeder, behalve tijdens de blootstelling, met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater uit de waterleiding. Er wordt kunstlicht gebruikt met een cyclus van 12 uur licht/12 uur donker.

Inhalatiekamers

12. Bij de keuze van de inhalatiekamer wordt rekening gehouden met de aard van de teststof en het doel van de test. Blootstelling via de neus alleen heeft de voorkeur (hieronder vallen blootstelling via de kop alleen, blootstelling via de neus alleen en blootstelling via de snuit alleen). Blootstelling via de neus alleen heeft over het algemeen de voorkeur voor studies van vloeibare of vaste aerosolen en voor dampen die kunnen condenseren tot aerosolen. Speciale doelstellingen van de studie kunnen beter worden verwezenlijkt door blootstelling van het hele lijf, maar dit moet in het studieverslag worden gemotiveerd. Om bij gebruik van een kamer voor het hele lijf te zorgen voor een stabiele atmosfeer, mag het totale volume van de testdieren niet meer dan 5 % van het volume van de kamer innemen. De technische principes voor blootstelling via de neus alleen en blootstelling van het hele lijf, alsook de specifieke voor- en nadelen ervan, zijn uiteengezet in GD 39 (2).

BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Toediening van concentraties

13. Voor de blootstelling via de neus alleen mag bij ratten elke tijdsduur worden gekozen, tot een maximum van zes uur. Bij muizen dient de blootstelling via de neus alleen in het algemeen niet langer dan vier uur te duren. Als er onderzoek met een langere tijdsduur nodig is, moet dit worden gemotiveerd (zie GD 39 (2)). Dieren die in een kamer voor het hele lijf aan aerosolen worden blootgesteld, worden afzonderlijk gehuisvest om ingestie van de teststof door het verzorgen van kooigenoten te voorkomen. Tijdens de blootstellingsperiode krijgen de dieren geen voeder. Tijdens een blootstelling van het hele lijf kan de dieren water worden gegeven.

14. De dieren worden aan de teststof blootgesteld in de vorm van gas, damp, aerosol of een mengsel daarvan. De te testen fysische toestand hangt af van de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, de gekozen concentratie en/of de meest waarschijnlijke fysische vorm waarin de teststof bij hantering en gebruik aanwezig is. Hygroscopische en chemisch reactieve teststoffen moeten worden getest in drogeluchtomstandigheden. Er dient op te worden gelet dat er geen explosieve concentraties optreden.

▼M4

Deeltjesgrootteverdeling

15. Voor alle aerosolen en voor dampen die tot aerosolen kunnen condenseren, wordt de deeltjesgrootte bepaald. Om blootstelling van alle relevante delen van de ademhalingswegen mogelijk te maken worden aerosolen met een massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) tussen 1 en 4 μm en een geometrische standaardafwijking (σ_g) tussen 1,5 en 3,0 aanbevolen (2)(9)(10). Hoewel redelijkerwijs moet worden getracht deze normwaarden te halen, wordt het oordeel van een deskundige gegeven als dit niet mogelijk blijkt. Zo kunnen de deeltjes van metaaldampen kleiner zijn dan deze norm, terwijl geladen deeltjes, vezels en hygroscopische materialen (die in de vochtige omgeving van de ademhalingswegen opzwellen) de norm kunnen overschrijden.

Bereiding van de teststof in een medium

16. Er kan een medium worden gebruikt om een passende concentratie en deeltjesgrootte van de teststof in de atmosfeer te verkrijgen. Als algemene regel wordt de voorkeur gegeven aan water. Deeltjesmateriaal kan aan mechanische processen worden onderworpen om de gewenste deeltjesgrootteverdeling te verkrijgen, waarbij er echter op moet worden gelet dat de teststof niet wordt ontbonden of gewijzigd. Als de samenstelling van de teststof mogelijk is gewijzigd door mechanische processen (bv. als er bij overvloedig malen door wrijving extreme temperaturen zijn ontstaan), wordt de samenstelling analytisch gecontroleerd. Er dient zorgvuldig op te worden gelet dat de teststof niet wordt verontreinigd. Niet-broze korrelige materialen die met opzet zo zijn samengesteld dat zij niet-inhaleerbaar zijn, hoeven niet te worden getest. Aan de hand van een slijtageproef moet worden aangetoond dat bij de hantering van het korrelige materiaal geen inhaleerbare deeltjes ontstaan. Als bij een slijtageproef inhaleerbare stoffen ontstaan, wordt een test op inhalatietoxiciteit verricht.

Controledieren

17. Er is geen parallelle negatieve controlegroep (lucht) noodzakelijk. Wanneer voor het verkrijgen van de testatmosfeer een ander medium dan water wordt gebruikt, moet alleen een controlegroep voor dat medium worden gebruikt wanneer er geen historische gegevens over de inhalatietoxiciteit beschikbaar zijn. Indien een toxiciteitsstudie van een in een medium bereide teststof uitwijst dat er geen toxiciteit optreedt, volgt hieruit dat het medium bij de geteste concentratie niet toxisch is; in dat geval is er geen mediumcontrole noodzakelijk.

CONTROLE VAN DE BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Luchtdoorstroming in de kamer

18. Tijdens elke blootstelling wordt de luchtdoorstroming in de kamer zorgvuldig geregeld, voortdurend gecontroleerd en ten minste elk uur geregistreerd. De controle van de concentratie (of stabiliteit) van de testatmosfeer is een integrale meting van alle dynamische parameters waarbij indirect alle relevante dynamische parameters voor het verkrijgen van de atmosfeer kunnen worden geregeld. Wanneer kamers voor blootstelling via de neus alleen worden gebruikt, moet er in het bijzonder op worden gelet dat de uitgeademde lucht niet opnieuw wordt ingeademd indien de luchtdoorstroming in het blootstellingssysteem ontoereikend is om een dynamische luchtdoorstroming van de teststofatmosfeer te verkrijgen. Er zijn voorgeschreven methoden die kunnen worden toegepast om aan te tonen dat de uitgeademde lucht bij de gekozen operationele omstandigheden niet opnieuw wordt ingeademd (2)(11). Het zuurstofgehalte moet ten minste 19 % bedragen en het kooldioxidegehalte niet meer dan 1 %. Als er redenen zijn om aan te nemen dat deze normwaarden niet kunnen worden gehaald, moet de zuurstof- en kooldioxideconcentratie worden gemeten.

▼M4

Temperatuur en relatieve vochtigheid in de kamer

19. De temperatuur in de kamer moet op 22 ± 3 °C worden gehouden. Bij blootstelling via de neus alleen en bij blootstelling van het hele lijf wordt de relatieve vochtigheid in het ademhalingsgebied van de dieren gecontroleerd en bij een blootstellingsduur tot vier uur ten minste drie keer en bij een kortere blootstelling ieder uur geregistreerd. De relatieve vochtigheid wordt idealiter tussen 30 en 70 % gehouden, al zal dit niet altijd haalbaar (bv. wanneer mengsels op waterbasis worden getest) of meetbaar zijn vanwege interferentie tussen de teststof en de testmethode.

Teststof: nominale concentratie

20. Waar mogelijk wordt de nominale concentratie in de blootstellingskamer berekend en geregistreerd. De nominale concentratie is de massa van de gegenereerde teststof gedeeld door het totale luchtvolume dat door het kamersysteem wordt geleid. De nominale concentratie wordt niet gebruikt om de blootstelling van de dieren te karakteriseren, maar een vergelijking tussen de nominale concentratie en de feitelijke concentratie vormt een aanwijzing voor het rendement van het testsysteem en kan bijgevolg worden gebruikt om problemen bij het genereren te ontdekken.

Teststof: feitelijke concentratie

21. De feitelijke concentratie is de concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren in een inhalatiekamer. De feitelijke concentraties kunnen worden verkregen door toepassing van specifieke methoden (bv. rechtstreekse bemonstering of op adsorptie of een chemische reactie gebaseerde methoden, gevolgd door analytische karakterisering) of niet-specifieke methoden, zoals gravimetrische filteranalyse. Gravimetrische analysen zijn alleen aanvaardbaar voor aerosolen van poeders met één component of aerosolen van vloeistoffen met een geringe vluchtigheid en moeten worden ondersteund met passende specifieke karakteriseringen van de teststof voorafgaand aan de studie. De concentratie van aerosolen van poeders met meerdere componenten kan ook door middel van gravimetrische analyse worden bepaald. In dat geval zijn echter analytische gegevens vereist die aantonen dat de samenstelling van het materiaal in de lucht vergelijkbaar is met die van het uitgangsmateriaal. Als deze informatie niet beschikbaar is, kan het nodig zijn in de loop van de studie op gezette tijden een nieuwe analyse van de teststof (idealiter in de toestand in de lucht) uit te voeren. Voor geaerosoliseerde stoffen die kunnen verdampen of sublimeren, moet worden aangetoond dat met de gekozen methoden alle fasen zijn verzameld. In het studieverslag worden de doelconcentratie, de nominale concentratie en de feitelijke concentratie vermeld, maar in statistische analysen voor de berekening van de letale concentratiewaarden wordt uitsluitend gebruikgemaakt van de feitelijke concentraties.

22. Er wordt zo mogelijk één partij van de teststof gebruikt en het testmonster wordt bewaard onder omstandigheden waarbij de zuiverheid, homogeniteit en stabiliteit behouden blijven. Voor aanvang van de studie worden de teststof, met inbegrip van de zuiverheid, en indien technisch mogelijk de identiteit en de hoeveelheden van vastgestelde verontreinigingen en onzuiverheden gekarakteriseerd. Dit kan onder meer met de volgende gegevens worden aangetoond: retentietijd en relatief piekoppervlak, moleculair gewicht op basis van massaspectroscopie of gaschromatografie, of andere schattingen. Hoewel het testlaboratorium niet verantwoordelijk is voor de identiteit van het testmonster, kan het raadzaam zijn dat het testlaboratorium de karakterisering van de opdrachtgever ten minste in beperkte mate bevestigt (bv. kleur, fysische aard enz.).

23. De blootstellingsatmosfeer wordt zo constant mogelijk gehouden en, afhankelijk van de analysemethode, voortdurend en/of met tussenpozen gecontroleerd. Wanneer met tussenpozen wordt bemonsterd, wordt in een studie van vier uur ten minste twee keer een monster van de kameratmosfeer genomen. Als dit vanwege de beperkte luchtdoorstroming of lage concentraties niet mogelijk is, kan één monster gedurende de volledige blootstellingsperiode worden verzameld. Indien significante fluctuaties tussen monsters optreden, worden bij de volgende geteste concentraties vier monsters per blootstelling

▼M4

genomen. Het verschil tussen individuele monsters van de kamerconcentratie en de gemiddelde concentratie mag bij gassen en dampen niet meer dan ± 10 % en bij vloeibare of vaste aerosolen niet meer dan ± 20 % bedragen. De equilibratietijd van de kamer (t_{95}) wordt berekend en geregistreerd. De blootstellingsduur omvat de tijd waarin de teststof wordt gegenereerd en houdt rekening met de tijd die nodig is om t_{95} te bereiken. In GD 39 (2) zijn richtsnoeren voor het schatten van t_{95} opgenomen.

24. Voor zeer complexe mengsels bestaande uit gassen/dampen en aerosolen (bv. verbrandingsatmosferen en teststoffen die zijn ontleend aan doelgerichte eindproducten of apparaten), kan elke fase zich in een inhalatiekamer verschillend gedragen, zodat van elke fase (gas/damp en aerosol) ten minste één indicatorstof (analyt) moet worden gekozen, normaliter de voornaamste werkzame stof in het mengsel. Wanneer de teststof een mengsel is, wordt de analytische concentratie vermeld voor het mengsel, en niet slechts voor de werkzame stof of de component (analyt). Aanvullende informatie over feitelijke concentraties is opgenomen in GD 39 (2).

Teststof: deeltjesgrootteverdeling

25. De deeltjesgrootteverdeling van aerosolen wordt tijdens elke blootstelling van vier uur ten minste twee keer bepaald met behulp van een cascade-impactor of een alternatief instrument, zoals een aerodynamische deeltjesgroottemeter. Indien kan worden aangetoond dat de met een cascade-impactor of een alternatief instrument verkregen resultaten gelijkwaardig zijn, mag het alternatieve instrument gedurende de hele studie worden gebruikt. Parallel aan het primaire instrument wordt een tweede instrument, zoals een gravimetrisch filter of een impinger/gas bubbler gebruikt om de doeltreffendheid van de verzameling met het primaire instrument te bevestigen. De door middel van deeltjesgrootteanalyse en filteranalyse verkregen massaconcentraties moeten in redelijke mate overeenkomen (zie GD 39 (2)). Indien in een vroeg stadium van de studie de gelijkwaardigheid kan worden aangetoond, zijn verdere bevestigende metingen niet nodig. Met het oog op het dierenwelzijn moeten maatregelen worden genomen om zo veel mogelijk te voorkomen dat niet-overtuigende gegevens worden verkregen waardoor herhaling van de blootstelling noodzakelijk is. Voor dampen wordt de deeltjesgrootte bepaald indien de mogelijkheid bestaat dat de dampen condenseren waardoor aerosolvorming optreedt of indien in een dampatmosfeer deeltjes worden gedetecteerd waarbij gemengde fasen kunnen optreden (zie punt 15).

PROCEDURE

26. Hieronder worden twee soorten onderzoek beschreven: het traditionele protocol en het c × t-protocol. Beide protocollen kunnen een verkennende test, een hoofdonderzoek, en/of een limiettest (traditioneel protocol) of tests bij een limietconcentratie (c × t) omvatten. Indien bekend is dat een van beide geslachten een grotere gevoeligheid heeft, kan de onderzoeksleider ervoor kiezen dit onderzoek alleen voor het gevoeligste geslacht uit te voeren. Als andere knaagdiersoorten dan ratten uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan de maximale blootstellingsduur worden aangepast om soortspecifieke symptomen van angst te minimaliseren. Alvorens met het onderzoek te beginnen moeten alle beschikbare gegevens worden bekeken om het gebruik van dieren tot een minimum te beperken. Zo kunnen gegevens die zijn verkregen op grond van hoofdstuk B.52 van deze bijlage (4) een verkennende test wellicht overbodig maken, en wellicht ook aantonen of het ene geslacht gevoeliger is dan het andere (zie GD 39 (2)).

▼M4

TRADITIONEEL PROTOCOL

Algemene overwegingen: traditioneel protocol

27. Bij een traditioneel onderzoek, worden groepen dieren aan een teststof blootgesteld gedurende een vaste periode (doorgaans vier uur) in een kamer voor blootstelling via de neus alleen of voor blootstelling van het hele lijf. Dieren worden blootgesteld aan hetzij een limietconcentratie (limiettest), of stapsgewijs aan ten minste drie concentraties (hoofdonderzoek). Het hoofdonderzoek kan worden voorafgegaan door een verkennende test, tenzij er al enige informatie over de teststof beschikbaar is, bijvoorbeeld uit een eerder uitgevoerd onderzoek volgens hoofdstuk B.52 (zie GD 39 (2)).

Verkennende test: traditioneel protocol

28. Een verkennende test wordt gebruikt om de werkzaamheid van de teststof te schatten en geslachtsafhankelijke verschillen in gevoeligheid aan te tonen, en ter ondersteuning bij de keuze van de blootstellingsconcentratieniveaus voor het hoofdonderzoek of de limiettest. Bij de keuze van concentratieniveaus voor de verkennende test moet alle beschikbare informatie worden gebruikt, met inbegrip van de beschikbare (Q)SAR-gegevens en gegevens over soortgelijke chemische stoffen. Bij elke concentratie mogen ten hoogste drie mannetjes en drie vrouwtjes worden blootgesteld (om geslachtsafhankelijke verschillen vast te stellen kunnen drie dieren per geslacht nodig zijn). Een verkennende test kan betrekking hebben op één concentratie, maar indien nodig kunnen meerdere concentraties worden getest. In een verkennende test mogen niet zo veel dieren en concentraties worden getest dat deze test eerder op een hoofdonderzoek lijkt. Een eerder uitgevoerd onderzoek op grond van hoofdstuk B.52 (4) kan worden gebruikt in plaats van een verkennende test (zie GD 39 (2)).

Limiettest: traditioneel protocol

29. Een limiettest wordt toegepast indien bekend is of verwacht wordt dat de teststof praktisch niet-toxisch is, d.w.z. dat een toxische reactie alleen optreedt boven de in de regelgeving bepaalde limietconcentratie. Bij een limiettest wordt één groep van drie mannetjes en drie vrouwtjes blootgesteld aan de teststof in een limietconcentratie. Informatie over de toxiciteit van de teststof kan afkomstig zijn van kennis omtrent vergelijkbare geteste stoffen, waarbij rekening wordt gehouden met de identiteit en het percentage van de bestanddelen waarvan bekend is dat zij in toxicologisch opzicht relevant zijn. Wanneer er weinig of geen informatie over de toxiciteit van het testmateriaal is of wordt verwacht dat de teststof toxisch is, moet het hoofdonderzoek worden uitgevoerd.

30. De keuze van de limietconcentraties hangt gewoonlijk af van wettelijke voorschriften. Indien Verordening (EG) nr. 1272/2008 wordt toegepast, bedragen de limietconcentraties voor gassen, dampen en aerosolen respectievelijk 20 000 ppm, 20 mg/l en 5 mg/l (of de maximaal haalbare concentratie) (3). Het kan vanuit technisch oogpunt ingewikkeld zijn limietconcentraties van sommige teststoffen te bereiken, vooral als dampen en aerosolen. Wanneer aerosolen worden getest, is het primaire doel een in te ademen deeltjesgrootte te verkrijgen (MMAD van 1-4 μm). Voor de meeste teststoffen is dit mogelijk bij een concentratie van 2 mg/l. Aerosolen mogen alleen bij een hogere concentratie dan 2 mg/l worden getest indien een in te ademen deeltjesgrootte kan worden verkregen (zie GD 39 (2)). In Verordening (EG) nr. 1272/2008 worden tests boven een limietconcentratie met het oog op het dierenwelzijn afgeraden. De limietconcentratie moet alleen worden overwogen wanneer het zeer waarschijnlijk is dat de resultaten van een dergelijke test rechtstreeks van belang zijn om de gezondheid van mensen te beschermen (3), en dit moet in het studieverslag worden gemotiveerd. Als de teststof kan ontploffen, moet worden vermeden dat zich omstandigheden voordoen waarin een explosie kan optreden. Om onnodig gebruik van dieren te voorkomen wordt de limiettest van tevoren een keer zonder dieren uitgevoerd om te waarborgen dat de kameromstandigheden voor een limiettest kunnen worden bereikt.

▼M4

31. Indien bij de limietconcentratie wordt geconstateerd dat er dieren gestorven of stervende zijn, kunnen de resultaten van de limiettest dienen als een verkennende test voor verdere tests bij andere concentraties (zie hoofdonderzoek). Indien de fysische of chemische eigenschappen van een teststof het onmogelijk maken een limietconcentratie te bereiken, moet bij de maximaal haalbare concentratie worden getest. Indien minder dan 50 % sterfte optreedt bij de maximaal haalbare concentratie, zijn geen verdere tests nodig. Als de limietconcentratie niet kon worden bereikt, moet dit in het studieverslag worden toegelicht en met ondersteunende gegevens worden gestaafd. Indien bij de maximaal haalbare concentratie van een damp geen toxiciteit optreedt, kan het nodig zijn de teststof in de vorm van een vloeibare aerosol te gebruiken.

Hoofdonderzoek: traditioneel protocol

32. Een hoofdonderzoek wordt meestal uitgevoerd met vijf mannetjes en vijf vrouwtjes (of vijf dieren van het gevoeligste geslacht, indien dit bekend is) per concentratieniveau, en bij ten minste drie concentratieniveaus. Er moeten voldoende concentratieniveaus worden gebruikt om een robuuste statistische analyse mogelijk te maken. De tijdsduur tussen de blootstelling van de verschillende groepen wordt bepaald door de aanvang, de duur en de ernst van de toxiciteitsverschijnselen. De blootstelling van dieren bij het volgende concentratieniveau wordt uitgesteld totdat een redelijk vertrouwen bestaat dat de eerder geteste dieren zullen overleven. Dit stelt de onderzoeksleider in staat de doelconcentratie voor de volgende blootstellingsgroep aan te passen. Aangezien dit vanwege de afhankelijkheid van geavanceerde technologieën wellicht niet altijd praktisch is bij inhalatieonderzoek, moet de blootstelling van dieren bij het volgende concentratieniveau worden gebaseerd op eerdere ervaringen en wetenschappelijke afwegingen. Voor het testen van mengsels moet GD 39 (2) worden geraadpleegd.

CONCENTRATIE × TIJD-PROTOCOL (C × T-PROTOCOL)

Algemene overwegingen: c × t-protocol

33. Als alternatief voor het traditionele protocol kan een stapsgewijs c × t-onderzoek worden overwogen voor de beoordeling van de inhalatietoxiciteit (12)(13)(14). Bij deze aanpak kunnen de dieren bij verschillende concentratieniveaus en gedurende meerdere perioden van verschillende duur aan een teststof worden blootgesteld. Alle tests worden uitgevoerd in een kamer voor blootstelling via de neus alleen (kamers voor het hele lijf zijn voor dit protocol niet geschikt). Aanhangsel 1 bevat een stroomdiagram van dit protocol. Een simulatieanalyse heeft uitgewezen dat zowel met het traditionele protocol als met het c × t-protocol robuuste LC_{50}-waarden kunnen worden verkregen, maar dat het c × t-protocol doorgaans beter geschikt is voor het verkrijgen van robuuste LC_{01}- en LC_{10}-waarden (15).

34. Een simulatieanalyse heeft aangetoond dat het voor het testen bij vier concentraties en gedurende vijf blootstellingsperioden van verschillende duur in het kader van een hoofdonderzoek doorgaans volstaat om per c × t-interval twee dieren (één van elk geslacht als beide geslachten worden gebruikt, of twee van het gevoeligste geslacht) te gebruiken. Onder bepaalde omstandigheden kan de onderzoeksleider ervoor kiezen twee ratten per geslacht per c × t-interval te gebruiken (15). Door twee dieren per geslacht per concentratie en tijdstip te gebruiken kan de bias en de variabiliteit van de schattingen worden verkleind, het percentage succesvolle schattingen worden verhoogd, en het dekkingspercentage van het betrouwbaarheidsinterval worden verbeterd. Als er echter geen voldoende passende fitting met de gegevens mogelijk is om een schatting te kunnen maken (indien een dier per geslacht of twee dieren van het gevoeligste geslacht worden gebruikt), kan wellicht ook een vijfde blootstellingsconcentratie volstaan. Nadere richtsnoeren voor het bij een c × t-onderzoek te gebruiken aantal dieren en concentraties zijn opgenomen in GD 39 (2).

▼M4

Verkennende test: c × t-protocol

35. Een verkennende test wordt gebruikt om de werkzaamheid van de teststof te schatten, en ter ondersteuning bij de keuze van de blootstellingsconcentratieniveaus voor het hoofdonderzoek. Een verkennende test met ten hoogste drie dieren per geslacht per concentratie (zie aanhangsel III van GD 39 (2) voor nadere bijzonderheden) kan nodig zijn om een geschikte aanvangsconcentratie voor het hoofdonderzoek te kunnen kiezen en het aantal gebruikte dieren te kunnen minimaliseren. Soms is het nodig om drie dieren per geslacht te gebruiken om geslachtsafhankelijke verschillen vast te stellen. Deze dieren moeten gedurende één periode, doorgaans met een duur van 240 minuten, worden blootgesteld. Om te beoordelen of het mogelijk is geschikte testatmosferen tot stand te brengen, moeten voorafgaande tests zonder dieren worden uitgevoerd. Een verkennende test is doorgaans niet nodig als er gegevens over de sterfte beschikbaar zijn uit een onderzoek volgens hoofdstuk B.52 (4). Bij het kiezen van de aanvankelijke doelconcentratie in een onderzoek volgens hoofdstuk B.2 moet de onderzoeksleider rekening houden met de sterftepatronen die zijn waargenomen in al het beschikbare onderzoek volgens hoofdstuk B.52 (4), voor beide geslachten en voor alle geteste concentraties (zie GD 39 (2)).

Beginconcentratie: c × t-protocol

36. De beginconcentratie (blootstellingssessie I) (aanhangsel 1) is ofwel een limietconcentratie, ofwel een door de onderzoeksleider op basis van de verkennende test gekozen concentratie. Groepen van 1 dier per geslacht worden aan deze concentratie blootgesteld gedurende perioden van verschillende duur (bv. 15, 30, 60, 120, of 240 minuten), hetgeen betekent dat er in totaal 10 dieren worden gebruikt (dit wordt „blootstellingssessie I" genoemd) (aanhangsel 1).

37. De keuze van de limietconcentraties hangt gewoonlijk af van wettelijke voorschriften. Indien Verordening (EG) nr. 1272/2008 wordt toegepast, bedragen de limietconcentraties voor gassen, dampen en aerosolen respectievelijk 20 000 ppm, 20 mg/l en 5 mg/l (of de maximaal haalbare concentratie) (3). Het kan vanuit technisch oogpunt ingewikkeld zijn limietconcentraties van sommige teststoffen te bereiken, vooral als dampen en aerosolen. Wanneer aerosolen worden getest, is het doel een in te ademen deeltjesgrootte te verkrijgen (d.w.z. een MMAD van 1-4 μm) bij een limietconcentratie van 2 mg/l. Dat is met de meeste teststoffen mogelijk. Aerosolen mogen alleen bij een hogere concentratie dan 2 mg/l worden getest indien een in te ademen deeltjesgrootte kan worden verkregen (zie GD 39 (2)). In Verordening (EG) nr. 1272/2008 worden tests boven een limietconcentratie met het oog op het dierenwelzijn afgeraden. Tests boven de limietconcentratie moeten alleen worden overwogen wanneer het zeer waarschijnlijk is dat de resultaten van dergelijke tests rechtstreeks van belang zijn om de gezondheid van mensen te beschermen (3), en dit moet in het studieverslag worden gemotiveerd. Als de teststof kan ontploffen, moet worden vermeden dat zich omstandigheden voordoen waarin een explosie kan optreden. Om onnodig gebruik van dieren te voorkomen wordt de test bij de beginconcentratie van tevoren een keer zonder dieren uitgevoerd om te waarborgen dat de kameromstandigheden voor deze concentratie kunnen worden bereikt.

38. Indien bij de beginconcentratie wordt geconstateerd dat er dieren gestorven of stervende zijn, kunnen de resultaten bij deze concentratie als uitgangspunt dienen voor verdere tests bij andere concentraties (zie hoofdonderzoek). Indien de fysische of chemische eigenschappen van een teststof het onmogelijk maken een limietconcentratie te bereiken, moet bij de maximaal haalbare concentratie worden getest. Indien minder dan 50 % sterfte optreedt bij de maximaal haalbare concentratie, zijn geen verdere tests nodig. Als de limietconcentratie niet kon worden bereikt, moet dit in het studieverslag worden toegelicht en met ondersteunende gegevens worden gestaafd. Indien bij de maximaal haalbare concentratie van een damp geen toxiciteit optreedt, kan het nodig zijn de teststof in de vorm van een vloeibare aerosol te gebruiken.

▼M4

Hoofdonderzoek: c × t-protocol

39. De beginconcentratie (blootstellingssessie I) (aanhangsel 1) die tijdens het hoofdonderzoek wordt getest, is ofwel een limietconcentratie, ofwel een door de onderzoeksleider op basis van de verkennende test gekozen concentratie. Indien tijdens of na blootstellingssessie I sterfte is geconstateerd, wordt de minimale blootstelling (c × t) die tot sterfte leidt als leidraad genomen voor het vaststellen van de concentratie en blootstellingsperioden voor blootstellingszitting II. Elke volgende blootstellingsessie hangt af van de sessie die eraan voorafgaat (zie aanhangsel 1).

40. Voor veel teststoffen zullen de resultaten die worden verkregen bij de beginconcentratie, plus drie extra blootstellingssessies met een kleinere tijdraster (d.w.z. de geometrische afstand tussen de blootstellingsperioden, zoals aangegeven door de factor tussen opeenvolgende perioden, doorgaans √2), toereikend zijn om de c × t-sterfteverhouding vast te stellen (15), maar het gebruik van een vijfde blootstellingsconcentratie kan van enig nut zijn (zie aanhangsel 1 en GD 39 (2)). Voor de mathematische behandeling van de resultaten voor het c × t-protocol, zie aanhangsel 1.

WAARNEMINGEN

41. De dieren worden tijdens de blootstellingsperiode veelvuldig klinisch geobserveerd. Na de blootstelling worden op dezelfde dag nog ten minste twee klinische observaties verricht, of meer als de respons van de dieren op de behandeling daartoe aanleiding geeft, en vervolgens gedurende veertien dagen ten minste één keer per dag. De duur van de observatieperiode staat niet vast, maar wordt bepaald op grond van de aard en het aanvangstijdstip van klinische symptomen en de duur van de herstelperiode. Het is belangrijk op welk tijdstip de toxiciteitsverschijnselen verschijnen en verdwijnen, vooral als er een neiging is tot vertraagde toxiciteitsverschijnselen. Alle observaties worden systematisch geregistreerd en van elk dier wordt een apart overzicht bijgehouden. Dieren die stervend worden aangetroffen en dieren die hevige pijn hebben en/of blijvende tekenen van hevige angst vertonen, worden met het oog op het dierenwelzijn op humane wijze gedood. Wanneer onderzoek wordt gedaan naar klinische toxiciteitsverschijnselen, moet erop worden gelet dat een aanvankelijk slecht uiterlijk aspect en voorbijgaande veranderingen in de ademhaling als gevolg van de blootstellingsprocedure, niet worden aangezien voor aan de teststof gerelateerde toxiciteit die het nodig zou maken de dieren voortijdig te doden. Er moet rekening worden gehouden met de beginselen en criteria in de leidraad voor humane eindpunten (GD 19) (7). Wanneer dieren om redenen van dierenwelzijn worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

42. Bij externe observaties van de dieren in de kooien wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en gedragspatronen. Waar mogelijk moet een onderscheid worden gemaakt tussen lokale en systemische effecten. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Een meting van de rectale temperatuur kan ondersteunende gegevens opleveren voor met de behandeling of opsluiting verband houdende reflectoire bradypneu of hypo-/hyperthermie.

Lichaamsgewicht

43. Het gewicht van elk dier wordt tijdens de acclimatiseringsperiode één keer geregistreerd, op dag 0 (de dag van blootstelling) voorafgaand aan de blootstelling en ten minste op de dagen 1, 3 en 7 (en vervolgens iedere week), alsook op het moment waarop het dier sterft of wordt geëuthanaseerd als dit na dag 1 is. Het lichaamsgewicht is erkend als een kritische indicator van toxiciteit en dieren die een blijvende gewichtsafname van ≥ 20 % vertonen ten opzichte van de voor de studie geregistreerde waarde, moeten zorgvuldig worden gevolgd. Aan het einde van de periode na de blootstelling worden de dieren die nog leven, gewogen en op humane wijze gedood.

▼M4

Pathologie

44. Op alle proefdieren, met inbegrip van de dieren die tijdens de test sterven of met het oog op het dierenwelzijn worden geëuthanaseerd en uit het onderzoek worden genomen, wordt macroscopische obductie uitgevoerd. Als het niet mogelijk is onmiddellijk nadat een dood dier is aangetroffen een obductie te verrichten, wordt het dier gekoeld (niet bevroren) bij temperaturen die laag genoeg zijn om de autolyse tot een minimum te beperken. De obductie wordt zo spoedig mogelijk verricht, normaliter binnen één of twee dagen. Alle met het blote oog waarneembare pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd, met bijzondere aandacht voor veranderingen in de luchtwegen.

45. Om de interpretatieve waarde van de studie te vergroten kan worden overwogen aanvullend onderzoek te verrichten dat vooraf in de opzet is opgenomen, zoals bepaling van het longgewicht van overlevende ratten en/of microscopisch onderzoek van de luchtwegen om aanwijzingen voor irritatie te vinden. Ook kunnen de organen worden onderzocht die tekenen van macroscopische pathologische veranderingen vertonen bij dieren die na 24 uur of langer nog leven, alsmede organen waarvan bekend is of verwacht wordt dat zij zijn aangetast. Microscopisch onderzoek van de volledige luchtwegen kan nuttige informatie opleveren voor teststoffen die met water reageren, zoals zuren en hygroscopische teststoffen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

46. Voor elk dier worden de gegevens over het lichaamsgewicht en de obductiebevindingen vermeld. Daarnaast worden de gegevens van de klinische observatie in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat specifieke toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of om redenen van dierenwelzijn is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen.

Testverslag

47. In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen:

Proefdieren en dierhouderij:

— beschrijving van de omstandigheden van de kooi, met inbegrip van: aantal (of verandering in het aantal) dieren per kooi, strooisel, omgevingstemperatuur en relatieve vochtigheid, lichtregime en identificatie van de voeding;

— gebruikte soort/stam en motivering voor het gebruik van een ander soort dan ratten;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— randomiseringsmethode;

— details van de voeder- en waterkwaliteit (waaronder aard en herkomst van het voeder en herkomst van het water);

— beschrijving van de eventuele conditionering voorafgaand aan de test, met inbegrip van voeding, quarantaine en behandeling voor ziekte.

▼M4

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen (met inbegrip van de isomeersamenstelling);

— identificatiegegevens en, indien bekend, CAS-nummer (Chemical Abstracts Service).

Medium:

— motivatie voor het gebruik van het medium en voor de keuze ervan (indien een ander medium dan water wordt gebruikt);

— historische of parallelle gegevens waaruit blijkt dat het medium niet interfereert met de uitkomst van de studie.

Inhalatiekamer:

— beschrijving van de inhalatiekamer met inbegrip van afmetingen en volume;

— herkomst en beschrijving van de apparatuur die voor de blootstelling van dieren en het verkrijgen van de atmosfeer is gebruikt;

— apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid, de deeltjesgrootte en de feitelijke concentratie;

— herkomst van de lucht, behandeling van de aangevoerde/geëxtraheerde lucht en systeem dat voor de conditionering is gebruikt;

— toegepaste methoden voor de kalibratie van de apparatuur voor het verkrijgen van een homogene testatmosfeer;

— drukverschil (positief of negatief);

— blootstellingspoorten per kamer (blootstelling via de neus alleen); locatie van de dieren in het systeem (blootstelling van het hele lijf);

— homogeniteit/stabiliteit van de testatmosfeer in de tijd;

— locatie van temperatuur- en vochtigheidssensoren en bemonstering van de testatmosfeer in de kamer;

— luchtdebiet, luchtdebiet per blootstellingspoort (blootstelling via de neus alleen) of dierbelasting per kamer (blootstelling van het hele lijf);

— informatie over de apparatuur die voor de zuurstof- en kooldioxidemeting is gebruikt, indien van toepassing;

— equilibratietijd van de kamer (t_{95});

— aantal volumeveranderingen per uur;

— meetapparaten (indien van toepassing).

Blootstellingsgegevens:

— motivering van de keuze van de doelconcentratie in de hoofdstudie;

— nominale concentraties (totale massa van de in de inhalatiekamer geleide teststof, gedeeld door het door de kamer geleide luchtvolume);

— feitelijke concentraties van de in het ademhalingsgebied van de dieren verzamelde teststof; voor mengsels die heterogene fysische vormen produceren (gassen, dampen, aerosolen) kan elke vorm afzonderlijk worden geanalyseerd;

▼M4

— alle luchtconcentraties worden in massa-eenheden vermeld (bv. mg/l, mg/m^3 enz.); de volume-eenheden (bv. ppm, ppb enz.) kunnen tevens tussen haakjes worden vermeld;

— deeltjesgrootteverdeling, massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) en geometrische standaardafwijking (σ_g), onder vermelding van de wijze waarop zij zijn berekend. De individuele deeltjesgrootteanalysen worden vermeld.

Testomstandigheden:

— details van de bereiding van de teststof, met inbegrip van details van de procedures die zijn gevolgd om de deeltjesgrootte van vast materiaal te verlagen of oplossingen van de teststof te bereiden. Als de samenstelling van de teststof mogelijk is gewijzigd door mechanische processen, worden de resultaten opgenomen van de analysen die zijn verricht om de samenstelling van de teststof te controleren;

— een beschrijving (bij voorkeur met een schematische voorstelling) van de apparatuur die voor het verkrijgen van de testatmosfeer en de blootstelling van de dieren aan de testatmosfeer is gebruikt;

— details van de toegepaste chemische analysemethode en de validering van die methode (met inbegrip van de efficiëntie van de recovery van de teststof uit het bemonsteringsmedium);

— motivering van de keuze van de testconcentraties.

Resultaten:

— een tabel met de temperatuur, vochtigheid en luchtdoorstroming van de kamer;

— een tabel met de nominale en feitelijke concentratiegegevens van de kamer;

— een tabel met de deeltjesgroottegegevens met inbegrip van gegevens over de verzameling van het analytisch monster, de deeltjesgrootteverdeling en de berekening van de MMAD en σ_g;

— een tabel met gegevens over de respons en het concentratieniveau voor elk dier (bv. dieren met toxiciteitsverschijnselen, met inbegrip van sterfte, en de aard, hevigheid, aanvangstijdstip en duur van de effecten);

— voor elk dier het tijdens de studie bepaalde gewicht; de datum en het tijdstip waarop zij zijn gestorven, indien vóór de geplande euthanasie; en voor elk dier het aanvangstijdstip en het verloop van de toxiciteitsverschijnselen en of ze reversibel waren;

— voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar;

— schattingen van de mortaliteit (bv. LC_{50}, LD_{01}) met inbegrip van de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen en de helling (indien de evaluatiemethode daarin voorziet);

— statistisch verband, met inbegrip van de geschatte waarde van de exponent n ($c \times t$-protocol). De naam van de gebruikte statistische software moet worden vermeld.

▼M4

Bespreking en interpretatie van de resultaten:

— speciale aandacht wordt besteed aan de beschrijving van de methoden die zijn toegepast om te voldoen aan de criteria van deze testmethode, bv. de limietconcentratie of de deeltjesgrootte;

— er wordt aandacht besteed aan de inhaleerbaarheid van deeltjes in het licht van de algemene bevindingen, in het bijzonder als niet aan de deeltjesgroottecriteria kan worden voldaan;

— er wordt een toelichting gegeven als dieren op humane wijze moesten worden gedood omdat zij pijn hadden of tekenen van hevige en voortdurende angst vertoonden, op basis van de criteria in de OESO-leidraad voor humane eindpunten (8);

— indien het testen volgens hoofdstuk B.52 van deze bijlage (4) is gestaakt om over te gaan op deze testmethode B.2, moet dit worden gemotiveerd;

— in de algehele beoordeling van de studie wordt aandacht besteed aan de consistentie van de methoden die voor de bepalingen van de nominale en feitelijke concentratie zijn toegepast, alsmede aan het verband tussen de feitelijke en de nominale concentratie;

— er wordt aandacht besteed aan de waarschijnlijke doodsoorzaak en overheersende werking (systemisch of plaatselijk).

LITERATUUR:

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

(3) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006 (PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1).

(4) Hoofdstuk B.52 van deze bijlage, Acute inhalatietoxiciteit: methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse.

(5) Hoofdstuk B.40 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: test op basis van de transcutane elektrische weerstand (TEW).

(6) Hoofdstuk B.40 bis van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: test met humaan huidmodel.

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

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

DEFINITIE

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M4

Aanhangsel 1

C × t-protocol

1. Als alternatief voor het traditionele protocol kan een stapsgewijs „concentratie × tijd"-onderzoek (c × t-onderzoek) worden overwogen voor de beoordeling van de inhalatietoxiciteit (12)(13)(14). Het wordt bij voorkeur uitgevoerd wanneer specifieke behoeften op het gebied van regelgeving of wetenschap het nodig maken gedurende meerdere perioden van verschillende duur dierproeven uit te voeren, bijvoorbeeld met het oog op het opstellen van rampenbestrijdings- of ruimtelijkeordeningsplannen. Deze aanpak begint meestal met het testen bij een limietconcentratie (blootstellingssessie I), waarbij de dieren worden blootgesteld aan een teststof gedurende vijf perioden van verschillende duur (bv. 15, 30, 60, 120 en 240 minuten), zodat binnen één blootstellingssessie gegevens over meerdere perioden van verschillende duur worden verkregen (zie figuur 1). Indien Verordening (EG) nr. 1272/2008 wordt toegepast, bedragen de limietconcentraties voor gassen, dampen en aerosolen respectievelijk 20 000 ppm, 20 mg/l en 5 mg/l. Deze niveaus mogen slechts worden overschreden wanneer er op grond van wetenschappelijke of regelgevingsoverwegingen behoefte bestaat aan het testen bij deze niveaus (zie punt 37 van de hoofdtekst van hoofdstuk B.2).

2. In situaties waarin er weinig of geen informatie over de toxiciteit van een teststof beschikbaar is, moet een verkennende test worden uitgevoerd waarbij groepen van ten hoogste 3 dieren per geslacht worden blootgesteld aan door de onderzoeksleider gekozen doelconcentraties, doorgaans gedurende 240 minuten.

3. Indien een limietconcentratie is getest tijdens blootstellingssessie I en er minder dan 50 % sterfte is geconstateerd, zijn geen verdere tests nodig. Wanneer er op grond van wetenschappelijke of regelgevingsoverwegingen behoefte bestaat aan het vaststellen van de concentratie/tijdstip/responsverhouding bij hogere niveaus dan de aangegeven limietconcentratie, moet de volgende blootstelling bij een hoger niveau plaatsvinden, bijvoorbeeld bij twee keer de limietconcentratie (d.w.z. 2 L in figuur 1).

4. Wanneer bij de limietconcentratie toxiciteit wordt waargenomen, zijn aanvullende tests (hoofdonderzoek) nodig. Deze aanvullende blootstellingen vinden ofwel bij lagere concentraties (in figuur 1: blootstellingssessies II, III of IV') ofwel bij hogere concentraties gedurende kortere perioden (in figuur 1: blootstellingssessie IV) plaats, waarbij de lengten van de perioden zijn aangepast en minder ver uit elkaar liggen.

5. De test (beginconcentratie en aanvullende concentraties) wordt uitgevoerd met 1 dier/geslacht per concentratie/tijdstip, of 2 dieren van het gevoeligste geslacht per concentratie/tijdstip. Onder bepaalde omstandigheden kan de onderzoeksleider ervoor kiezen om 2 ratten per geslacht per concentratie/tijdstip (of 4 dieren van het gevoeligste geslacht per concentratie/tijdstip) te gebruiken (15). Door 2 dieren per geslacht per concentratie/tijdstip te gebruiken wordt doorgaans de bias en de variabiliteit van de schattingen verkleind, het percentage succesvolle schattingen verhoogd, en het dekkingspercentage van het betrouwbaarheidsinterval verbeterd. Nadere bijzonderheden zijn opgenomen in GD 39 (2).

6. In het ideale geval wordt elke blootstellingssessie binnen één dag uitgevoerd. Dit biedt de gelegenheid om de volgende blootstelling uit te stellen totdat een redelijk vertrouwen bestaat dat de eerder geteste dieren zullen overleven, en het stelt de onderzoeksleider in staat de doelconcentratie en de duur van de verschillende perioden voor de volgende blootstellingssessie aan te passen. Het is aan te raden elke blootstellingssessie te beginnen met de groep die het langst zal worden blootgesteld, bv. de 240 minuten-blootstellingsgroep, gevolgd door de 120 minuten-blootstellingsgroep enz. Indien bijvoorbeeld de dieren in de 240 minuten-groep na 90 minuten sterven of ernstige toxiciteitsverschijnselen vertonen (bv. extreme veranderingen van het ademhalingspatroon, zoals zware ademhaling), zou het niet zinvol zijn om een groep gedurende 120 minuten bloot te stellen, aangezien de sterfte waarschijnlijk 100 % zou bedragen. De onderzoeksleider moet dus kortere blootstellingsperioden kiezen voor die concentratie (bv. 90, 65, 45, 33 en 25 minuten).

▼M4

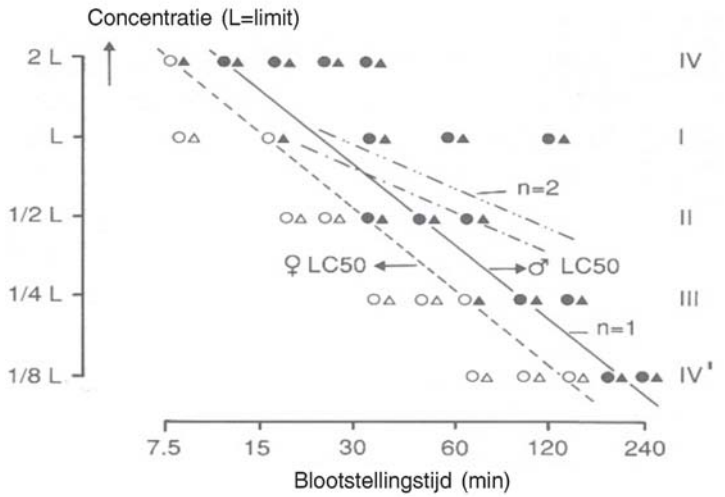
7. De kamerconcentratie moet veelvuldig worden gemeten om de tijdgewogen gemiddelde concentratie voor elke blootstellingsduur te bepalen. Waar mogelijk moet het tijdstip waarop voor elk dier de dood intreedt (in plaats van de blootstellingsduur) worden gebruikt bij de statistische analyse.

8. De resultaten van de eerste vier blootstellingssessies moeten worden onderzocht om vast te stellen of er gegevens ontbreken in de concentratie-tijdcurve (zie figuur 1). Als er geen voldoende passende fitting mogelijk is, kan er een extra blootstelling (vijfde concentratie) worden uitgevoerd. De concentratie en lengten van de blootstellingsperioden voor de vijfde blootstelling moeten zodanig worden gekozen dat de ontbrekende gegevens kunnen worden ingevuld.

9. Alle blootstellingssessies (met inbegrip van de eerste blootstellingssessie) worden om de concentratie-tijd-responsverhouding te berekenen met behulp van statistische analyse (16). Indien mogelijk moeten voor elk c × t-interval de tijdgewogen gemiddelde concentratie en de blootstellingsduur tot het intreden van de dood (indien de dood intreedt tijdens de blootstelling) worden gebruikt.

Figuur 1

Hypothetisch voorbeeld van een concentratie-tijd-sterfteverhouding bij ratten



Open symbolen = overlevende dieren; gesloten symbolen = dode dieren

Driehoeken = vrouwtjes; cirkels = mannetjes

Doorlopende lijn = LC_{50}-waarden (bereik 7,5-240 min) voor mannetjes met n = 1

Streeplijn = LC_{50}-waarden (bereik 7,5-240 min) voor vrouwtjes met n = 1

Punt-streeplijnen = lijn door hypothetische LC_{50}-waarden voor mannetjes en vrouwtjes als n gelijk was geweest aan 2 (12).

Legenda:

Concentratie:

Blootstellingstijd:

▼M4

10. Hieronder volgt een voorbeeld van de stapsgewijze procedure:

Blootstellingssessie I — tests bij de limietconcentratie (zie figuur 1)

— 1 dier/geslacht per concentratie/tijdstip; totaal 10 dieren ([a])

— Doelconcentratie ([b]) = limietconcentratie

— Stel vijf groepen dieren bloot bij deze doelconcentratie gedurende respectievelijk 15, 30, 60, 120 en 240 minuten.

↓

Blootstellingssessie II ([c]) — Hoofdonderzoek

— 1 dier/geslacht per concentratie/tijdstip; totaal 10 dieren

— Stel vijf groepen dieren bloot bij een lagere concentratie ([d]) (1/2 L) gedurende iets langere perioden (een factor √2 uit elkaar gelegen; zie figuur 1).

↓

Blootstellingssessie III — Hoofdonderzoek

— 1 dier/geslacht per concentratie/tijdstip; totaal 10 dieren

— Stel vijf groepen dieren bloot bij een lagere concentratie ([d]) (1/4 L) gedurende iets langere perioden (een factor √2 uit elkaar gelegen; zie figuur 1).

↓

Blootstellingssessie IV' — Hoofdonderzoek

— 1 dier/geslacht per concentratie/tijdstip; totaal 10 dieren

— Stel vijf groepen dieren bloot bij een lagere concentratie ([d]) (1/8 L) gedurende iets langere perioden (een factor √2 uit elkaar gelegen; zie figuur 1).

↓ of

([a]) Indien er geen informatie beschikbaar is over mogelijke geslachtsgebonden gevoeligheid, worden ratten van beide geslachten gebruikt, d.w.z. 1 dier/geslacht per concentratie. Op basis van bestaande informatie, of als tijdens deze blootstellingssessie blijkt dat een van beide geslachten gevoeliger is, worden voor de volgende tests 10 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt (2 dieren per concentratie/tijdstip) bij elk concentratieniveau.

([b]) Indien Verordening (EG) nr. 1272/2008 wordt toegepast, bedragen de limietconcentraties voor gassen, dampen en aerosolen respectievelijk 20 000 ppm, 20 mg/l en 5 mg/l. In geval van verwachte toxiciteit of op basis van de resultaten van de verkennende test moeten lagere aanvangsconcentraties worden gekozen. Wanneer daar op grond van wetenschappelijke of regelgevingsoverwegingen behoefte aan bestaat, kunnen hogere concentraties worden gebruikt.

([c]) In het ideale geval wordt de blootstelling van dieren bij het volgende concentratieniveau uitgesteld totdat een redelijk vertrouwen bestaat dat de eerder behandelde dieren zullen overleven. Dit stelt de onderzoeksleider in staat de doelconcentratie en de duur van de verschillende perioden voor de volgende blootstellingssessie aan te passen.

([d]) De minimale dosis (concentratie × tijd) die tot sterfte heeft geleid tijdens het testen bij de beginconcentratie (eerste blootstellingssessie) wordt als leidraad genomen voor het vaststellen van de volgende combinatie van concentratie en blootstellingsperioden. Doorgaans wordt de concentratie gehalveerd (1/2 L) en wordt een nieuwe tijdspanne voor de blootstelling van de dieren vastgesteld met een nog fijner raster, waarbij de blootstellingsperioden een geometrische reeks met factor 1,4 (√2, zie referentie 11) vormen, met in het midden daarvan de tijdsduur die overeenkomt met het tijdens de eerste blootstelling waargenomen minimale letale concentratieniveau (tijd × concentratie). In de figuur (figuur 1) werd in blootstellingssessie I bij 15 minuten voor het eerst sterfte geconstateerd; de in sessie II gebruikte perioden liggen daarom rond de 30 minuten en duren 15, 21, 30, 42 en 60 minuten. Het wordt sterk aanbevolen na de eerste twee blootstellingen de gegevens in een grafiek op te nemen die lijkt op de bovenstaande, en te controleren of de verhouding tussen concentratie en tijd een hoek van 45 graden vertoont (n = 1), of dat deze minder steil (bv. n = 2) of juist steiler (bv. n = 0,8) verloopt. In de laatstgenoemde gevallen wordt sterk aangeraden de volgende concentraties en perioden dienovereenkomstig aan te passen.

▼M4

Blootstellingssessie IV — Hoofdonderzoek

— 1 dier/geslacht per concentratie/tijdstip; totaal 10 dieren

— Stel vijf groepen dieren bloot bij een hogere concentratie[e] (2 L) gedurende iets kortere perioden (een factor √2 uit elkaar gelegen; zie figuur 1).

Mathematische behandeling van de resultaten voor het c × t-protocol

12. Een c × t-procedure met 4 of 5 blootstellingsconcentraties en vijf perioden van verschillende duur levert respectievelijk 20 of 25 datapunten op. Met deze datapunten kan de c × t-verhouding worden berekend met behulp van statistische analyse (16):

Vergelijking 1:

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

waarbij C = concentratie; t = blootstellingsduur, of

Vergelijking 2:

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

waarbij $n = b_1/b_2$.

Met behulp van van vergelijking 1 kan de LC_{50}-waarde worden berekend voor een periode van een bepaalde duur (bv. 4 uur, 1 uur, 30 minuten, of elke tijdsduur die binnen het geteste bereik valt) door P = 5 te gebruiken (50 % respons). Er zij op gewezen dat de Wet van Haber alleen van toepassing is bij n = 1. De LC_{01} kan worden berekend door P = 2,67 te gebruiken.

[e] In bepaalde gevallen kan het nodig zijn om de concentratie te verhogen (2 L) en een nieuwe tijdspanne met een nog fijner raster vast te stellen, waarbij de blootstellingsperioden een geometrische reeks met factor 1,4 (√2) vormen, met in het midden daarvan de tijdsduur die overeenkomt met het tijdens de eerste blootstelling waargenomen minimale letale concentratieniveau. De minimale blootstellingsduur moet bij voorkeur meer bedragen dan 5 minuten; de maximale blootstellingsduur mag niet meer bedragen dan uur.”.

▼B

B.3. ACUTE DERMALE TOXICITEIT

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij dieren die tijdens het onderzoek stenen en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van nood en pijn vertonen, moeten eventueel op humane wijze worden gedood. Het doseren van teststoffen op een manier waarvan bekend is dat deze als gevolg van bijtende of irriterende eigenschappen pijn en nood veroorzaakt, behoeft niet te worden uitgevoerd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren in hun proefkooien ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde, jong volwassen dieren worden op een willekeurige manier vóór de behandeling in groepen ingedeeld. Ongeveer 24 uur vóór de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren door knippen of scheren verwijderd, bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast, omdat daardoor de doorlaatbaarheid van de huid zou kunnen veranderen. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot een poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Als van een medium gebruik wordt gemaakt, moet rekening worden gehouden met de invloed hiervan op de mate waarin de huid de teststof doorlaat. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt.

1.6.2. **Proefomstandigheden**

1.6.2.1. *Proefdieren*

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten of konijnen. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzakelijkheid hiervan moet worden gerechtvaardigd. De proef dient te worden uitgevoerd met een stam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Per geslacht mag bij het begin van de studie het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

▼B

1.6.2.2. *Aantal en geslacht*

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste 5 knaagdieren worden gebruikt. Zij dienen van hetzelfde geslacht te zijn. Indien wijfjes worden gebruikt, moeten deze nullipaar zijn en niet zwanger. Indien informatie beschikbaar is die aantoont dat eén van beide geslachten duidelijk gevoeliger is, dienen dieren van dit geslacht gebruikt te worden.

Opmerking: In onderzoeken naar acute toxiciteit met dieren van een hogere orde dan knaagdieren, dienen kleinere aantallen in overweging te worden genomen. De doses dienen zorgvuldig te worden uitgekozen, en alle moeite dient te worden gedaan om matig toxische doses niet te boven te gaan. In dergelijke testen dient toediening van letale doses van de teststof te worden vermeden.

1.6.2.3. *Dosisniveaus*

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) dosisniveaus worden toegepast die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. Bij de vaststelling van de dosisniveaus moet rekening worden gehouden met alle mogelijke irriterende of corrosieve effecten. De gegevens moeten voldoende zijn om een dosis/respons-curve te maken en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een LD_{50} te bepalen.

1.6.2.4. *Limiettest*

Een limiettest met een dosis van ten minste 2 000 mg/kg lichaamsgewicht wordt uitgevoerd op een groep van 5 mannetjes en 5 wijfjes, met behulp van de hierboven beschreven testmethode. Indien sterfte wordt vastgesteld die met de teststof verband houdt, moet het uitvoeren van een volledig testprogramma overwogen worden.

1.6.2.5. *Observatieperiode*

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode beschouwd worden, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald, de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, hun duur en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat voor een vertraagde sterfte.

1.6.3. **Uitvoering**

Ieder dier moet individueel in een kooi worden gehuisvest. De teststof wordt gelijkmatig verdeeld over een oppervlak van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen mag het te behandelen oppervlak kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en zo gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de expositietijd van 24 uur door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Het behandelde gedeelte van de huid moet op een geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof langs orale weg opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren, kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren.

▼B

Aan het eind van de expositieperiode wordt de resterende teststof — zo mogelijk met water — van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

De gedane waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd voor ieder individueel dier. Tijdens de eerste dag worden de dieren regelmatig geobserveerd. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht. De andere waarnemingen moeten iedere dag worden verricht, waarbij erop moet worden toegezien dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bijvoorbeeld door necropsie of koeling van dood aangetroffen dieren en door afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren.

Bij het observeren wordt aandacht besteed aan veranderingen van vacht, behandelde huid, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van tremoren, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het einde van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

Bepaling van de toxiciteit bij het andere geslacht

Na het voltooien van de studie voor het ene geslacht, moet ten minste een groep van 5 dieren van het andere geslacht worden blootgesteld aan de stof om te verzekeren dat dit geslacht niet duidelijk gevoeliger is voor de teststof. In bepaalde gevallen kunnen redenen bestaan voor het gebruik van minder dieren. Indien voldoende informatie beschikbaar is om aan te tonen dat dieren van het geteste geslacht duidelijk gevoeliger zijn, mag het testen van het andere geslacht achterwege worden gelaten.

2. **GEGEVENS**

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het tijdstip waarop de dood intreedt bij de individuele dieren, het aantal dieren dat andere intoxicatieverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Het gewicht van ieder individueel dier wordt bepaald kort voordat de teststof wordt aangebracht, en vervolgens één keer iedere week en ten slotte bij zijn dood; veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd, indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Dieren die op humane wijze gedood worden omwille van nood of ongemak en pijn in verband met de stof, worden geregistreerd als gestorven in verband met de stof. De LD_{50} moet door middel van een erkende methode worden bepaald.

Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxicologische effecten.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

▼B

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;

— proefomstandigheden (met vermelding van de wijze waarop de huid is schoongemaakt en het soort verband: occlusief of niet occlusief);

— dosisniveaus (met het eventuele medium en de concentraties);

— het geslacht van de blootgestelde dieren;

— tabellarische gegevens betreffende de effecten per geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef stierf of gedood werd, het aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, het aantal blootgestelde dieren);

— het tijdstip na de blootstelling waarop de dood intreedt, redenen en criteria voor het op humane wijze doden van dieren;

— alle waarnemingen;

— de LD_{50} van het geslacht dat het volledige onderzoek onderging, bepaald na 14 dagen (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);

— 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de LD_{50} (waar dit gegeven kan worden);

— dosis/sterfte-curve met helling (indien dit bij de gebruikte bepalingsmethode mogelijk is);

— bevindingen bij de necropsie;

— eventuele histopathologische bevindingen;

— resultaten van de test die eventueel op het andere geslacht werd uitgevoerd;

— bespreking van de resultaten (speciale aandacht dient besteed te worden aan het effect dat het op humane wijze doden van dieren tijdens de proeven zou kunnen hebben op de berekende LD_{50});

— interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. **LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

▼B

B.4. **ACUTE TOXICITEIT: HUIDIRRITTATIE/CORROSIE**

1. **METHODE**

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 404 (2002) van de OESO.

1.1. INLEIDING

Bij de samenstelling van deze bijgewerkte methode is bijzondere aandacht besteed aan mogelijke verbeteringen met het oog op het welzijn van de dieren en aan de evaluatie van alle bestaande informatie over de teststof om onnodige tests bij proefdieren te vermijden. In deze methode wordt de aanbeveling opgenomen de bestaande relevante gegevens op bewijskracht te analyseren, alvorens de beschreven *in-vivo* test op corrosie/irritatie van de stof wordt uitgevoerd. Wanneer er onvoldoende gegevens beschikbaar zijn, kunnen ze worden aangevuld door een sequentiële teststrategie te volgen (1). De aanbevolen teststrategie omvat de uitvoering van gevalideerde en erkende *in-vitro* tests en is als bijlage bij deze methode opgenomen. Bovendien wordt aanbevolen bij de voorlopige *in-vivo* test de drie testgaasjes waar mogelijk niet tegelijkertijd maar achtereenvolgens aan te brengen.

In het belang van zowel wetenschappelijke kwaliteit als het dierenwelzijn moeten er geen *in-vivo* tests worden uitgevoerd voordat alle beschikbare gegevens over de mogelijke huidcorrosie/irritatie door de stof zijn geëvalueerd op bewijskracht. Hierbij gaat het bijvoorbeeld om de resultaten van eerdere studies bij mensen en/of proefdieren, gegevens over corrosie/irritatie door een of meer qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen, gegevens waaruit blijkt dat de stof sterk zuur of sterk alkalisch is (2)(3), en resultaten van gevalideerde en erkende *in-vitro*- of *ex-vivo* tests (4)(5)(5a). Door een dergelijke analyse zijn er minder *in-vivo* tests nodig op huidcorrosie/irritatie door stoffen waarvoor al voldoende bewijsmateriaal bestaat uit andere onderzoeken met deze twee eindpunten.

Een aanbevolen sequentiële teststrategie, waarin de uitvoering van gevalideerde en erkende *in-vitro*- of *ex-vivo* tests op corrosie/irritatie is opgenomen, is als bijlage bij deze methode opgenomen. De strategie is ontwikkeld tijdens een OESO-workshop (6), met algemene stemmen door de deelnemers aanbevolen en als aanbevolen teststrategie opgenomen in het „Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances" (GHS) (7). Hoewel deze sequentiële teststrategie geen integrerend onderdeel van testmethode B 4 is, wordt aanbevolen deze teststrategie te volgen alvorens *in-vivo* tests uit te voeren. Voor nieuwe stoffen is het de aanbevolen stapsgewijze testbenadering om wetenschappelijk verantwoorde gegevens over corrosie/irritatie door de stof te verkrijgen. Wanneer er voor bestaande stoften onvoldoende gegevens over de huidcorrosie/irritatie beschikbaar zijn, moet de strategie worden gebruikt om ontbrekende gegevens aan te vullen. Voor het gebruik van een andere teststrategie of -procedure of de beslissing om geen stapsgewijze testbenadering te volgen moet een motivering worden gegeven.

Als bij een bewijskrachtanalyse niet kan worden geconcludeerd of er sprake is van corrosie of irritatie, moet overeenkomstig de sequentiële teststrategie een *in-vivo* test worden overwogen (zie de bijlage).

▼B

1.2. DEFINITIES

Huidirritatie: het ontstaan van een omkeerbare beschadiging van de huid na het aanbrengen van een teststof gedurende maximaal 4 uur.

Huidcorrosie: het ontstaan van een onomkeerbare beschadiging van de huid, namelijk zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof gedurende maximaal 4 uur. Corrosie-reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloedkorsten en, tegen het eind van de observatieperiode van 14 dagen, ontkleuring door bleking van de huid, gebieden met volledige haaruitval en littekens. Voor de beoordeling van twijfelachtige letsels moet histopathologie worden overwogen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in een dosis op de huid van een proefdier aangebracht; de onbehandelde huid van het proefdier wordt als controle gebruikt. De mate van irritatie/corrosie wordt op bepaalde tijdstippen afgelezen en ingeschaald en wordt nader beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de studie moet voldoende zijn om te kunnen beoordelen of de waargenomen effecten reversibel of irreversibel van aard zijn.

Dieren die gedurende een fase van de test voortdurend tekenen van ernstig ongerief en/of hevige pijn vertonen, moeten op humane wijze worden gedood en de stof dient dienovereenkomstig te worden beoordeeld. Voor criteria voor de beslissing om stervende en hevig lijdende dieren op humane wijze te doden wordt verwezen naar referentie (8).

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Voorbereiding van de *in-vivo* test**

1.4.1.1. *Keuze van de diersoort*

Als proefdier wordt de voorkeur gegeven aan het albinokonijn en er worden gezonde jonge volwassen konijnen gebruikt. Wanneer er een andere soort wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

1.4.1.2. *Voorbereiding van de dieren*

Ongeveer 24 uur voor de test wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de dieren door kort afknippen verwijderd. Er moet op worden gelet dat de huid niet wordt geschaafd. Alleen dieren met een gezonde en gave huid mogen worden gebruikt.

Sommige konijnenstammen hebben plekken met dichte haargroei, die in bepaalde perioden van het jaar meer op de voorgrond treden. De test mag niet op deze plekken met dichte haargroei worden uitgevoerd.

1.4.1.3. *Huisvesting en voeding*

De dieren worden in aparte kooien gehuisvest. De temperatuur in de proefdierruimte dient 20 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

▼B

1.4.2. **Testprocedure**

1.4.2.1. *Het aanbrengen van de teststof*

De teststof wordt aangebracht op een klein huidoppervlak (ongeveer 6 cm^2) en de plek wordt bedekt met een gaasje dat met behulp van niet-irriterend plakband op zijn plaats wordt gehouden. Wanneer de stof niet direct kan worden aangebracht (bijvoorbeeld bij vloeistoffen of bepaalde pasta's), wordt de teststof eerst op het gaasje aangebracht en wordt dit daarna op de huid bevestigd. Het gaasje moet gedurende de blootstellingsperiode door middel van een geschikt semi-occlusief verband in licht contact met de huid blijven. Als de teststof op het gaasje wordt aangebracht, moet dit zodanig op de huid worden bevestigd dat er een goed contact en een uniforme verdeling van de stof op de huid is. Er moet tevens voor worden gezorgd dat het gaasje voor het dier onbereikbaar is en dat inslikken of inademen van de teststof onmogelijk is.

Vloeibare stoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. Bij een proef met vaste stoffen (die indien nodig eventueel kunnen worden verpoederd) moet de teststof met een zo klein mogelijke hoeveelheid water (of indien nodig een ander geschikt medium) worden bevochtigd om voor een goed contact met de huid te zorgen. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moet een eventuele invloed van het medium op de irritatie van de huid door de teststof minimaal zijn.

Aan het einde van de blootstellingsperiode, die normaal gesproken 4 uur bedraagt, moeten de resten van de teststof zo mogelijk met water of met een geschikt oplosmiddel worden verwijderd zonder de bestaande respons of de intacte epidermis te wijzigen.

1.4.2.2. *Dosisniveau*

Een dosis van 0,5 ml vloeistof of 0,5 g vaste stof of pasta wordt op het testgedeelte van de huid aangebracht.

1.4.2.3. *Voorlopige test (in-vivo test op huidirritatie/corrosie met één dier)*

Het is zeer wenselijk dat de *in-vivo* test in eerste instantie met één dier wordt uitgevoerd, vooral wanneer wordt vermoed dat de stof corrosie kan veroorzaken. Dit is in overeenstemming met de sequentiële teststrategie (zie bijlage 1).

Wanneer een stof op basis van een bewijskrachtanalyse als corrosief wordt beschouwd, zijn er geen verdere dierproeven nodig. Bij de meeste stoffen waarvan wordt vermoed dat ze corrosief zijn, zijn verdere *in-vivo* tests normaal gesproken niet nodig. Wanneer aanvullende gegevens nodig worden geacht omdat het bewijsmateriaal onvoldoende is, kunnen echter met de volgende aanpak beperkte dierproeven worden uitgevoerd. Bij het dier worden achtereenvolgens maximaal drie testgaasjes aangebracht. Het eerste gaasje wordt na drie minuten verwijderd. Als er geen ernstige huidreactie wordt waargenomen, wordt een tweede gaasje aangebracht dat na een uur wordt verwijderd. Als de waarnemingen in deze fase erop wijzen dat het niet onmenselijk is de blootstelling tot vier uur te verlengen, wordt een derde gaasje aangebracht, dat na vier uur wordt verwijderd, en wordt de reactie ingeschaald.

Als er na een van de drie achtereenvolgende blootstellingen een corrosiereactie wordt waargenomen, wordt de test onmiddellijk gestaakt. Als er na de verwijdering van het laatste gaasje geen corrosiereactie wordt waargenomen, wordt het dier gedurende 14 dagen geobserveerd tenzij er vóór die tijd al corrosie ontstaat.

▼B

Wanneer er niet wordt verwacht dat de teststof corrosie veroorzaakt maar deze wel irriterend kan zijn, wordt er één gaasje gedurende vier uur op één dier aangebracht.

1.4.2.4. *Bevestigende test (in-vivo test op huidirritatie/corrosie met meer dieren)*

Als er bij de voorlopige test geen corrosiereactie wordt waargenomen, moet de irritatie of negatieve reactie worden bevestigd met nog eens twee dieren die elk gedurende vier uur aan één gaasje worden blootgesteld. Als er bij de voorlopige test irritatie wordt waargenomen, kan de bevestigende test op sequentiële wijze worden uitgevoerd of door nog eens twee dieren tegelijkertijd bloot te stellen. Wanneer in een uitzonderlijk geval de voorlopige test niet wordt uitgevoerd, kunnen twee of drie dieren met één gaasje worden behandeld dat na vier uur wordt verwijderd. Wanneer er twee dieren worden gebruikt die beide dezelfde reactie vertonen, is verder testen niet nodig. Als de reactie verschilt, wordt ook het derde dier getest. Er kunnen extra dieren nodig zijn om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties.

1.4.2.5. *Observatieperiode*

De duur van de observatieperiode moet voldoende zijn om volledig te kunnen beoordelen of de waargenomen effecten reversibel zijn. Het experiment moet echter worden beëindigd zodra het dier voortdurend tekenen van hevige pijn of ernstig ongerief vertoont. Om te bepalen of de effecten reversibel zijn, moeten de dieren maximaal 14 dagen na de verwijdering van de gaasjes worden geobserveerd. Als al vóór het verstrijken van de 14 dagen wordt geconstateerd dat de effecten reversibel zijn, wordt het experiment op dat moment beëindigd.

1.4.2.6. *Klinische observatie en inschaling van de huidreacties*

Alle dieren worden op tekenen van erytheem en oedeem onderzocht en de respons wordt 60 minuten en vervolgens 24, 48 en 72 uur na de verwijdering van het gaasje ingeschaald. Bij de voorlopige test bij één dier wordt de huid ook onmiddellijk na de verwijdering van het gaasje onderzocht. De huidreactie wordt in een van de categorieën in de tabel ingeschaald en geregistreerd. Als er sprake is van een beschadiging van de huid die na 72 uur niet als irritatie of corrosie kan worden geïdentificeerd, kan het nodig zijn de observatie tot dag 14 voort te zetten om te bepalen of de effecten reversibel zijn. Naast de observatie van irritatie worden ook alle lokale toxische effecten, zoals ontvetting van de huid, en alle systemische schadelijke effecten (zoals effecten op klinische toxiciteitsverschijnselen en het lichaamsgewicht) volledig beschreven en geregistreerd. Om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties moet histopathologisch onderzoek worden overwogen.

De inschaling van huidreacties is per definitie subjectief. Om harmonisatie bij de inschaling van huidreacties te bevorderen en ter ondersteuning van de testlaboratoria en de personen die bij het uitvoeren en het interpreteren van de observatie betrokken zijn, moet het personeel dat de observatie uitvoert afdoende zijn opgeleid in het gebruikte scoresysteem (zie de tabel). Een geïllustreerde leidraad voor de inschaling van huidirritatie en ander letsel kan nuttig zijn (9). De inschaling van de huidreacties moet blind gebeuren.

2. **GEGEVENS**

2.1. VERMELDING VAN DE RESULTATEN

De resultaten van het onderzoek worden in het eindverslag in tabelvorm vermeld en hierin worden alle onder punt 3.1 vermelde gegevens opgenomen.

▼B

2.2. EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

De scores voor de huidirritatie worden in samenhang met de aard en ernst van het letsel en de vraag of dit al dan niet reversibel is, beoordeeld. De individuele scores vormen geen absolute norm voor de irriterende eigenschappen van een materiaal, aangezien ook andere effecten van het testmateriaal worden beoordeeld. De individuele scores moeten veeleer als referentiewaarden worden beschouwd, die in combinatie met alle andere observaties tijdens het onderzoek moeten worden geëvalueerd.

Bij de beoordeling van de irritatiereactie moet rekening worden gehouden met de reversibiliteit van het huidletsel. Wanneer reacties als haaruitval (beperkt gebied), hyperkeratose, hyperplasie en schilfering tot het einde van de observatieperiode van 14 dagen blijven bestaan, moet de teststof als irriterend worden beschouwd.

3. **RAPPORTACE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Motivering voor *in-vivo* test: bewijskrachtanalyse van reeds bestaande testgegevens, zoals de resultaten van een sequentiële teststrategie:

— een beschrijving van de relevante gegevens die van eerdere tests beschikbaar zijn;

— de gegevens die bij elke fase van de teststrategie verkregen zijn;

— een beschrijving van de uitgevoerde *in-vitro* tests met een gedetailleerde beschrijving van de procedures en de resultaten die met test/referentiestoffen verkregen zijn;

— een bewijskrachtanalyse voor de uitvoering van het in-vivo-onderzoek.

Teststof:

— identificatiegegevens (bv. het CAS-nr., de herkomst, de zuiverheid, bekende verontreinigingen en het chargenummer);

— de fysische aard en de fysisch chemische eigenschappen (bv. de pH, de vluchtigheid, de oplosbaarheid en de stabiliteit),

— bij een mengsel: de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte.

Medium:

— identificatiegegevens, de concentratie (indien van toepassing) en het gebruikte volume;

— een motivering voor de keuze van het medium.

Proefdieren:

— de gebruikte soort/stam en een motivering indien andere dieren dan het albinokonijn worden gebruikt;

— het aantal dieren van elk geslacht;

— het gewicht van elk dier aan het begin en het eind van de test;

— de leeftijd aan het begin van het onderzoek;

— de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.

▼B

Testomstandigheden:

— de techniek voor de voorbereiding van de plaats waarop het gaasje wordt aangebracht;

— een gedetailleerde beschrijving van het gebruikte verbandmateriaal en de verbandtechniek;

— gedetailleerde gegevens over het bereiden, het aanbrengen en het verwijderen van de teststof.

Resultaten:

— een tabel met de score van de irritatie/corrosie reactie voor elk dier op elk observatietijdstip;

— beschrijvingen van alle waargenomen letsels;

— een beschrijving in woorden van de aard en de ernst van de waargenomen irritatie of corrosie met eventuele histopathologische bevindingen;

— een beschrijving van andere schadelijke lokale (bijvoorbeeld ontvetting van de huid) en systemische effecten naast de huidirritatie of corrosie.

Bespreking van de resultaten.

4. **REFERENTIES**

(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. *In Vitro*, 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., 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. Toxicology *in Vitro* 12, pp.483-524.

(5a) Testmethode B 40: Huidcorrosie.

(6) OECD (1996). OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop onHarmonization 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.

[op verzoek verkrijgbaar bij het OESO secretariaat].

▼B

Tabel I:

INSCHALING VAN DE HUIDREACTIES

Vorming van erytheem en korsten	
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

Maximale score 4

Vorming van oedeem	
Geen oedeem	0
Zeer licht oedeem (nauwelijks waarneembaar)	1
Licht oedeem (de randen van het gebied zijn goed zichtbaar door duidelijke zwelling)	2
Matig oedeem (ongeveer 1 mm zwelling)	3
Ernstig oedeem (meer dan 1 mm zwelling tot buiten het blootstellingsgebied)	4

Maximale score. 4

Om duidelijkheid te krijgen omtrent moeilijk te interpreteren reacties kan histopathologisch onderzoek worden uitgevoerd.

▼B

BIJLAGE

Een sequentiële teststrategie voor huidirritatie en -corrosie

ALGEMENE OVERWEGINGEN

In het belang van verantwoorde wetenschap en het welzijn van dieren is het belangrijk dat het onnodig gebruik van dieren wordt vermeden en dat tests waarvan hevige reacties bij dieren worden verwacht, tot een minimum worden beperkt. Alle informatie over een stof die relevant is voor de mogelijke huidirritatie/corrosie door die stof moet worden geëvalueerd voordat een in-vivotest wordt overwogen. Wellicht bestaat er al voldoende bewijsmateriaal om een teststof qua mogelijke huidirritatie of -corrosie in te delen zonder dat er tests bij proefdieren behoeven te worden uitgevoerd. Daarom zal het gebruik van een bewijskrachtanalyse en een sequentiële teststrategie de noodzaak van in-vivotests tot een minimum beperken, vooral als er van de stof hevige reacties worden verwacht.

Het gebruik van een bewijskrachtanalyse voor de evaluatie van bestaande informatie over huidirritatie en -corrosie door stoffen wordt aanbevolen om te bepalen of ander aanvullend onderzoek dan in-vivohuidonderzoek moet worden uitgevoerd om te helpen bij de bepaling van deze mogelijke effecten. Wanneer nader onderzoek nodig is, wordt aanbevolen de sequentiële teststrategie te gebruiken om de relevante experimentele gegevens te verkrijgen. Voor stoffen die nog niet zijn getest, moet de sequentiële teststrategie worden gebruikt om de gegevens te vergaren die nodig zijn om de mogelijke huidirritatie/corrosie te bepalen. De in deze bijlage beschreven teststrategie is tijdens een OESO-workshop (1) ontwikkeld en later bevestigd en opgenomen in het „Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances”, die de steun heeft gekregen van de 28e gezamenlijke vergadering van het Comité chemische stoffen en de Werkgroep chemische stoffen in november 1998 (2).

Hoewel deze sequentiële teststrategie geen integrerend onderdeel van testmethode B.4 is, vormt zij de aanbevolen aanpak voor de bepaling van de kenmerken qua huidirritatie/corrosie. Deze aanpak houdt zowel een optimale gedragscode als een ethische referentie voor in-vivotests op huidirritatie/corrosie in. De testmethode bevat een leidraad voor de uitvoering van de in-vivotest en geeft een overzicht van de factoren die vóór het begin van een dergelijke test in aanmerking moeten worden genomen. De strategie levert een benadering voor de evaluatie van bestaande gegevens over de eigenschappen van teststoffen inzake huidirritatie/corrosie en een trapsgewijze aanpak voor het vergaren van relevante gegevens over stoffen waarvoor nader onderzoek nodig is of waarvoor nog geen onderzoek is uitgevoerd. Ook wordt aanbevolen onder bepaalde omstandigheden gevalideerde en erkende in-vitro- of ex-vivotests op huidirritatie/corrosie uit te voeren.

BESCHRIJVING VAN DE EVALUATIE EN DE TESTSTRATEGIE

Alvorens te beginnen met tests als onderdeel van de sequentiële teststrategie (zie figuur), moet alle beschikbare informatie worden geëvalueerd om te bepalen of in-vivohuidonderzoek nodig is. Hoewel de evaluatie van individuele parameters (bijvoorbeeld een extreme pH) significante informatie kan opleveren, moet rekening worden gehouden met alle bestaande informatie. Alle relevante gegevens over de effecten van de betrokken stof of analoge verbindingen moeten bij het nemen van een beslissing over de bewijskracht worden geëvalueerd en er moet een motivering voor de beslissing worden gegeven. De nadruk moet in eerste instantie liggen op bestaande gegevens over de effecten van de stof bij mens en dier en vervolgens op de resultaten van in-vitro- of ex-vivotests. Waar mogelijk moet in-vivo-onderzoek aan corrosieve stoffen worden vermeden. Bij de teststrategie spelen de volgende factoren een rol:

▼B

Evaluatie van bestaande gegevens over de effecten bij mens en dier (stap 1). In de eerste plaats moet worden gekeken naar bestaande gegevens over de effecten bij de mens, zoals klinisch of bedrijfsgeneeskundig onderzoek en ziektegevallen, en/of gegevens van dierproeven, bijvoorbeeld van onderzoek naar huidtoxiciteit bij eenmalige of herhaalde blootstelling, omdat deze informatie opleveren die rechtstreeks verband houdt met huideffecten. Bij stoffen waarvan bekend is dat ze irritatie of corrosie veroorzaken en stoffen waarvoor duidelijk is aangetoond dat dit niet het geval is, behoeven geen in-vivotests te worden uitgevoerd.

Analyse van structuuractiviteit-relaties (SAR) (stap 2). Er moet worden gekeken naar de resultaten van tests met qua structuur verwante stoffen, indien deze beschikbaar zijn. Wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn over de effecten van qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen bij mens en/of dier om te kunnen concluderen dat deze huidcorrosie/irritatie kunnen veroorzaken, mag worden aangenomen dat de te evalueren teststof tot dezelfde reacties zal leiden. In dat geval behoeft de stof wellicht niet te worden getest. Negatieve gegevens van onderzoek met qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen vormen in het kader van de sequentiële teststrategie niet een afdoende bewijs dat de stof geen corrosie of irritatie veroorzaakt. Voor de bepaling van de potentie voor zowel huidcorrosie als -irritatie moeten gevalideerde en erkende SAR-methoden worden gebruikt.

Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit (stap 3). Stoffen met een extreme pH van bijvoorbeeld $< 2{,}0$ en $\geq 11{,}5$ kunnen hevige lokale effecten hebben. Als een stof op basis van een extreme pH als corrosief voor de huid wordt aangeduid, kan ook rekening worden gehouden met zijn zuur/alkalireserve (of buffercapaciteit) (3)(4). Als de buffercapaciteit erop wijst dat een stof wellicht niet corrosief voor de huid is, moeten er nadere tests worden uitgevoerd om dit te bevestigen, waarbij bij voorkeur een gevalideerde en erkende *in-vitro*- of *ex-vivo*test moet worden gebruikt (zie de stappen 5 en 6).

Huidtoxiciteit (slap 4). Als van een stof is aangetoond dat deze via de huid zeer toxisch is, is een in-vivo-onderzoek naar huidirritatie/corrosie wellicht niet uitvoerbaar, omdat de normaal gesproken gebruikte hoeveelheid teststof al groter kan zijn dan de zeer toxische dosis en derhalve tot gevolg kan hebben dat de dieren sterven of hevig lijden. Wanneer er al onderzoek naar de huidtoxiciteit bij albinokonijnen tot de limietdosis van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht of meer is uitgevoerd en er geen huidirritatie of -corrosie is waargenomen, zijn verdere tests op huidirritatie/corrosie bovendien wellicht niet nodig. Bij de evaluatie van acute huidtoxiciteit bij eerder uitgevoerd onderzoek moet er op een aantal aspecten worden gelet. Zo kan de gerapporteerde informatie over huidletsel onvolledig zijn. De tests en observaties kunnen bij een andere soort dan het konijn zijn uitgevoerd en de gevoeligheid kan van soort tot soort sterk verschillen. Het is ook mogelijk dat de stof op de dieren is aangebracht in een vorm die niet geschikt is voor de beoordeling van huidirritatie/corrosie, bijvoorbeeld omdat de stof voor de test op huidtoxiciteit is verdund (5). Wanneer er echter goed opgezette en uitgevoerde onderzoeken op huidtoxiciteit bij konijnen zijn verricht, kunnen negatieve resultaten als voldoende bewijs worden beschouwd dat de stof geen corrosie of irritatie veroorzaakt.

Resultaten van in-vitro of ex-vivotests (stappen 5 en 6). Stoffen waarvan met een gevalideerde en erkende *in-vitro* of *ex-vivo*test (6)(7), die voor de beoordeling van deze specifieke effecten is opgezet, is aangetoond dat ze corrosieve of ernstig irriterende eigenschappen hebben, behoeven niet bij dieren te worden getest. Er kan worden aangenomen dat dergelijke stoffen *in vivo* vergelijkbare hevige effecten veroorzaken.

▼B

In-vivotest bij konijnen (stappen 7 en 8). Wanneer op grond van de bewijskracht wordt besloten over te gaan tot in-vivotests, dient eerst een voorlopige test met één dier te worden gedaan. Als de resultaten van deze test erop wijzen dat de stof corrosief voor de huid is, dienen er geen verdere tests te worden uitgevoerd. Als er bij de voorlopige test geen corrosief effect wordt waargenomen, moet de irritatiereactie of de negatieve respons worden bevestigd met ten hoogste nog eens twee dieren gedurende een blootstellingsperiode van vier uur. Als er bij de voorlopige test een irritatiereactie wordt waargenomen, kan de bevestigingstest sequentieel of door gelijktijdige blootstelling van de twee dieren worden uitgevoerd.

REFERENTIES

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/tests/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://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) 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 Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) pp 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996). Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.

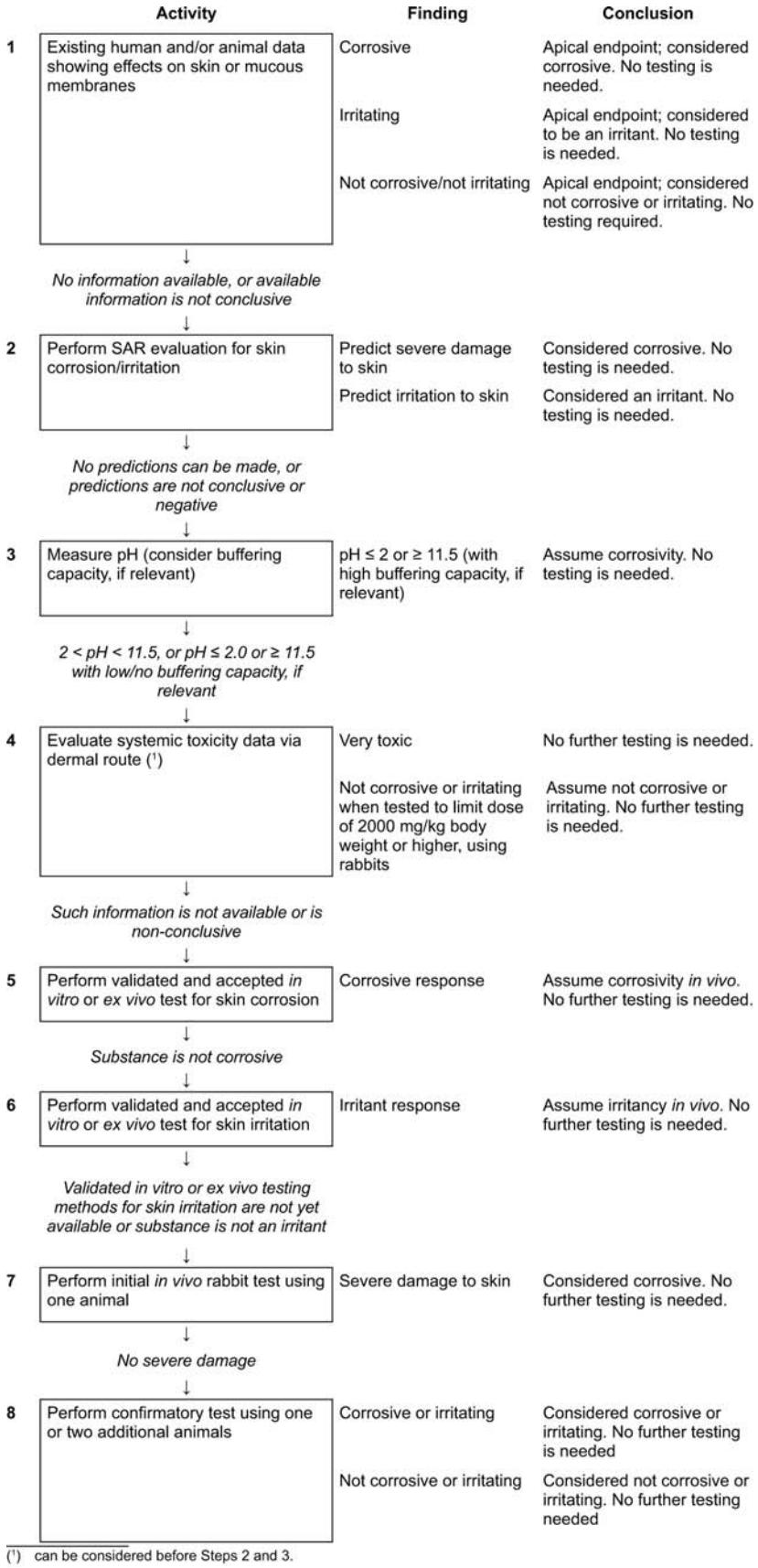
(6) Testmethode B.40.

(7) 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. Toxicology in Vitro 12, pp.483-524.

▼B

Figuur

TEST- EN EVALUATIESTRATEGIE VOOR HUIDIRRITATIE/CORROSIE



(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼M7

B.5. ACUTE OOGIRRITATIE/-CORROSIE

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 405 (2012) van de OESO. De testrichtlijnen van de OESO voor het testen van chemische stoffen worden periodiek herzien om te waarborgen dat ze de beste wetenschappelijke methoden weerspiegelen. Bij eerdere herzieningen van deze testrichtlijn is bijzondere aandacht besteed aan mogelijke verbeteringen via de evaluatie van alle bestaande informatie over de teststof om onnodige tests bij proefdieren te vermijden en zodoende rekening te houden met de bezorgdheid omtrent het welzijn van dieren. In TG 405 (vastgesteld in 1981 en bijgewerkt in 1987, 2002 en 2012) is de aanbeveling opgenomen de bestaande relevante gegevens op bewijskracht te analyseren (1), alvorens de beschreven in-vivotest op acute oogirritatie/-corrosie wordt uitgevoerd. Wanneer er onvoldoende gegevens beschikbaar zijn, wordt aanbevolen deze aan te vullen door een sequentiële teststrategie te volgen (2) (3). De aanbevolen teststrategie omvat de uitvoering van gevalideerde en erkende in-vitrotests en is als supplement bij deze methode opgenomen. Voor de toepassing van Verordening (EG) nr. 1907/2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH) ([1]) is in het relevante ECHA-richtsnoer (21) ook een geïntegreerde teststrategie opgenomen. Dierproeven mogen uitsluitend worden uitgevoerd als ze noodzakelijk worden geacht, nadat eerst de beschikbare alternatieve methoden zijn overwogen, en het gebruik ervan passend wordt geacht. Ten tijde van het opstellen van deze bijgewerkte testmethode zijn er gevallen bekend waarin het gebruik van deze testmethode hoe dan ook noodzakelijk is of vereist is uit hoofde van bepaalde regelgevingskaders.

De laatste bijwerking richtte zich vooral op het gebruik van analgetica en anesthetica en was niet van invloed op het basisconcept en de structuur van de testrichtlijn. ICCVAM ([2]) en een onafhankelijk internationaal wetenschappelijk peer review panel heeft de bruikbaarheid en de beperkingen van het routinematig gebruik van lokale anesthetica, systemische analgetica en humane eindpunten tijdens in-vivotests betreffende de veiligheid ten aanzien van oogirritatie (12) beoordeeld. De beoordeling leidde tot de conclusie dat het gebruik van lokale anesthetica en systemische analgetica pijn en nood grotendeels of volledig kan voorkomen zonder dat het de uitkomst van de test beïnvloedt, en tot de aanbeveling om deze stoffen altijd te gebruiken. Deze testmethode houdt rekening met deze beoordeling. Lokale anesthetica, systemische analgetica en humane eindpunten moeten routinematig worden gebruikt tijdens het uitvoeren van in-vivotests op acute oogirritatie/-corrosie. Uitzonderingen op hun gebruik moeten worden gemotiveerd. De in deze methode beschreven verfijningen zullen pijn en nood bij dieren in de meeste testsituaties waarbij in-vivotests op de veiligheid voor ogen nog noodzakelijk zijn, aanzienlijk verminderen of voorkomen.

Evenwichtige preventieve pijnbestrijding moet omvatten: i) routinematige voorbehandeling met een lokaal anestheticum (bv. proparacaïne of tetracaïne) en een systemische analgeticum (bv. buprenorfine), ii) schema voor routinematige nabehandeling met systemische analgetica (bv. buprenorfine en meloxicam), iii) geplande observatie, monitoring en registratie van dieren voor wat betreft klinische tekenen van pijn en/of nood, en iv) geplande observatie, monitoring en registratie van de aard, ernst en progressie van alle oogverwondingen. Verdere details zijn te vinden in de hieronder beschreven bijgewerkte procedures. Na toediening van

([1]) Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie. PB L 304 van 22.11.2007, blz. 1.

([2]) US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

▼M7

de teststof mogen geen aanvullende lokale anesthetica of analgetica worden toegepast, om verstoring van het onderzoek te vermijden. Analgetica met ontstekingsremmende activiteit (bv. meloxicam) mogen niet lokaal worden toegepast, en de systemisch gebruikte doses mogen effecten op het oog niet verstoren.

De definities zijn opgenomen in het aanhangsel bij deze testmethode.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

In het belang van zowel wetenschappelijke kwaliteit als het dierenwelzijn mogen in-vivotests pas worden overwogen nadat alle beschikbare gegevens over de mogelijke oogcorrosie/-irritatie door de chemische stof zijn geëvalueerd op bewijskracht. Hierbij gaat het bijvoorbeeld om de resultaten van eerdere studies bij mensen en/of proefdieren, gegevens over oogcorrosie/irritatie door een of meer qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen, gegevens waaruit blijkt dat de chemische stof sterk zuur of sterk alkalisch is (4) (5), en resultaten van gevalideerde en erkende in-vitro- of ex-vivotests op huidcorrosie en oogcorrosie/-irritatie (6) (13) (14) (15) (16) (17). De studies kunnen al vóór de bewijskrachtanalyse zijn uitgevoerd, maar dit kan ook naar aanleiding van deze analyse gebeuren.

Voor bepaalde chemische stoffen kan uit een dergelijke analyse blijken dat er een in-vivo-onderzoek naar een mogelijke oogcorrosie/-irritatie door de chemische stof nodig is. In al dergelijke gevallen wordt bij voorkeur, voordat wordt overwogen om de in-vivo-oogtest te gebruiken, eerst een onderzoek naar de in vitro en/of in vivo corrosieve effecten van de chemische stof op de huid uitgevoerd en geëvalueerd in overeenstemming met de sequentiële teststrategie in testmethode B.4 (7) of de geïntegreerde teststrategie beschreven in ECHA-richtsnoer (21).

Een sequentiële teststrategie, waarin de uitvoering van gevalideerde in-vitro- of ex-vivotests op oogcorrosie/-irritatie is opgenomen, is als supplement bij deze testmethode en, voor de toepassing van REACH, in ECHA-richtsnoer (21) opgenomen. Aanbevolen wordt om een dergelijke teststrategie te volgen alvorens in-vivotests uit te voeren. Voor nieuwe chemische stoffen wordt een stapsgewijze testbenadering aanbevolen om wetenschappelijk verantwoorde gegevens over corrosie/-irritatie door de chemische stof te verkrijgen. Wanneer er voor bestaande chemische stoffen onvoldoende gegevens over de huid- en oogcorrosie/-irritatie beschikbaar zijn, kan de strategie worden gebruikt om ontbrekende gegevens aan te vullen. Voor het gebruik van een andere teststrategie of -procedure of de beslissing om geen stapsgewijze testbenadering te volgen moet een motivering worden gegeven.

PRINCIPE VAN DE IN-VIVOTEST

Na voorbehandeling met een systemisch analgeticum en inductie van passende lokale anesthetica, wordt de te testen chemische stof in één dosis aangebracht op een van de ogen van het proefdier; het onbehandelde oog dient als controle. De mate van oogirritatie/-corrosie wordt geëvalueerd door op bepaalde tijdstippen het letsel aan de conjunctiva, de cornea en de iris in te schalen. Ook andere effecten in het oog en schadelijke systemische effecten worden beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de studie moet voldoende zijn om te kunnen beoordelen of de effecten reversibel of irreversibel van aard zijn.

Dieren die in enig stadium van de test blijk geven van ernstige nood en/of hevige pijn of letsel vertonen dat overeenkomt met de in deze testmethode beschreven humane eindpunten (zie punt 26), worden op humane wijze gedood en de chemische stof wordt dienovereenkomstig beoordeeld. Criteria voor de beslissing om stervende en hevig lijdende dieren op humane wijze te doden zijn te vinden in een richtlijn van de OESO (8).

▼M7

VOORBEREIDING VAN DE IN-VIVOTEST

Keuze van de diersoort

Als proefdier wordt de voorkeur gegeven aan het albinokonijn, en er worden gezonde jonge volwassen dieren gebruikt. Wanneer er een andere stam of soort wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

Voorbereiding van de dieren

Beide ogen van ieder voorlopig voor de test geselecteerd proefdier worden binnen 24 uur vóór het begin van de test onderzocht. Dieren die aan oogirritatie, oogaandoeningen of een reeds bestaand cornealetsel lijden, mogen niet worden gebruikt.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

De dieren worden in aparte kooien gehuisvest. De temperatuur in de proefdierruimte dient voor konijnen 20 °C (± 3 °C) te zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % zijn en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Een buitensporig hoge lichtintensiteit moet worden vermeden. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

TESTPROCEDURE

Gebruik van lokale anesthetica en systemische analgetica

De volgende procedures worden aanbevolen om pijn en nood in procedures voor tests betreffende de veiligheid voor de ogen te vermijden of tot een minimum te beperken. In plaats daarvan mogen ook alternatieve procedures worden gebruikt waarvan is vastgesteld dat zij pijn en nood even goed of beter voorkomen of verminderen.

— Zestig minuten vóór aanbrenging van de teststof (TCA) wordt buprenorfine 0,01 mg/kg toegediend door subcutane injectie (SC) om een therapeutisch niveau van systemische analgetica te bereiken. Van buprenorfine en andere vergelijkbare opioïde analgetica die systemisch worden toegediend, is niet bekend of wordt niet verwacht dat zij oogreacties wijzigen (12).

— Vijf minuten vóór TCA worden op elk oog een of twee druppels van een lokaal ooganestheticum (bv. 0,5 % proparacaïnehydrochloride of 0,5 % tetracaïnehydrochloride) aangebracht. Om mogelijke verstoring van het onderzoek te vermijden, wordt aanbevolen een lokaal anestheticum te gebruiken dat geen conserveermiddelen bevat. Bij elk dier dient het oog dat niet wordt behandeld met een teststof, maar met lokale anesthetica, als controle. Als wordt verwacht dat de teststof in aanmerkelijke mate pijn en nood zal veroorzaken, wordt de stof doorgaans niet in vivo getest. In geval van twijfel of wanneer tests noodzakelijk is, moet echter worden overwogen om vóór TCA om de 5 minuten extra lokaal anestheticum toe te dienen. Gebruikers moeten zich ervan bewust zijn dat het meermaals toedienen van lokale anesthetica mogelijk kan leiden tot een lichte toename van de ernst van door de chemische stof geïnduceerde letsels en/of de tijd die het kost totdat deze weer zijn verdwenen.

— Acht uur na TCA worden buprenorfine 0,01 mg/kg SC en meloxicam 0,5 mg/kg SC toegediend om een voortdurend therapeutisch niveau van systemische analgetica te bereiken. Hoewel er geen gegevens zijn waaruit blijkt dat meloxicam ontstekingsremmende effecten op het oog heeft wanneer het eenmaal daags SC wordt toegediend, mag meloxicam niet eerder dan 8 uur na TCA worden toegediend om mogelijke verstoring van het onderzoek te vermijden (12).

— Na de eerste behandeling 8 uur na TCA, wordt buprenorfine 0,01 mg/kg SC om de 12 uur toegediend, in combinatie met meloxicam 0,5 mg/kg SC om de 24 uur, totdat de oogletsels zijn verdwenen en er geen klinische tekenen van

▼M7

pijn en/of nood meer zijn. Er zijn preparaten voor gereguleerde afgifte van analgetica verkrijgbaar die kunnen worden overwogen om de frequentie van de dosering van analgetica te verlagen.

— „Reddingsanalgetica" moeten onmiddellijk na TCA worden gegeven als preventieve analgetica en lokale anesthetica ontoereikend zijn. Als een dier tijdens het onderzoek tekenen van pijn en nood vertoont, wordt onmiddellijk een „reddingsdosis" buprenorfine 0,03 mg/kg SC gegeven en wordt deze, indien nodig, om de 8 uur herhaald, in plaats van 0,01 mg/kg SC om de 12 uur. Meloxicam 0,5 mg/kg SC wordt om de 24 uur toegediend in combinatie met de „reddingsdosis" buprenorfine, maar niet eerder dan 8 uur na TCA.

Aanbrenging van de teststof

De teststof wordt bij elk dier aangebracht in de conjunctivaalzak van één oog, waarbij het onderste ooglid voorzichtig van de oogbol wordt weggetrokken. Vervolgens worden de oogleden ongeveer één seconde zachtjes dichtgehouden om verlies van het materiaal te voorkomen. Het andere oog, dat niet behandeld wordt, fungeert als controle.

Irrigatie

De ogen van de proefdieren mogen gedurende ten minste 24 uur na het indruppelen van de teststof niet worden uitgewassen, tenzij het om een vaste stof gaat (zie punt 18) of wanneer er sprake is van onmiddellijke corrosieve of irriterende effecten. Na 24 uur mogen de ogen eventueel worden uitgewassen.

Het gebruik van een satellietgroep om de invloed van het uitwassen te onderzoeken wordt niet aanbevolen, tenzij dit wetenschappelijk verantwoord is. Als er een satellietgroep nodig is, dienen hiervoor twee konijnen te worden gebruikt. De omstandigheden van het uitwassen worden zorgvuldig gedocumenteerd, bv. het tijdstip van uitwassen, de samenstelling en temperatuur van de uitwasoplossing, en duur, volume en snelheid van aanbrenging.

Dosisniveau

(1) *Vloeibare teststoffen*

Bij vloeibare teststoffen wordt een dosis van 0,1 ml gebruikt. Er mogen geen sproeipompjes worden gebruikt om de chemische stof rechtstreeks in het oog te brengen. De vloeistof wordt na het sproeien opgevangen en vervolgens wordt 0,1 ml in het oog gedruppeld.

(2) *Vaste teststoffen*

Bij het testen van vaste stoffen, pasta's en vaste deeltjes wordt een hoeveelheid met een volume van 0,1 ml of een gewicht van ten hoogste 100 mg gebruikt. De teststof wordt tot een fijn poeder vermalen. Alvorens het volume te meten wordt het vaste materiaal licht ingeklonken, bijvoorbeeld door tegen de houder te tikken. Als de vaste chemische stof op het eerste observatietijdstip (1 uur na de behandeling) nog niet door fysiologische mechanismen uit het oog van het proefdier is verwijderd, kan het oog met fysiologisch zout of gedestilleerd water worden uitgewassen.

(3) *Aerosol-teststoffen*

Aanbevolen wordt alle sproeivloeistoffen en aerosolen op te vangen voordat ze in het oog worden gedruppeld. Er wordt alleen een uitzondering gemaakt voor chemische stoffen in spuitbussen onder druk, die niet kunnen worden opgevangen omdat ze verdampen. In deze gevallen wordt het oog opengehouden en wordt de teststof aan het oog toegediend door in één keer gedurende ongeveer één seconde vanaf een afstand van 10 cm recht voor het oog te spuiten. Deze afstand kan afhankelijk van de druk van de nevel en de inhoud worden aangepast. Er moet voor worden gezorgd dat het oog niet door de druk van de nevel wordt beschadigd. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn na te gaan of een „mechanische" beschadiging van het oog door de druk van de nevel mogelijk is.

▼M7

De dosis uit een spuitbus kan door een simulatie als volgt worden geraamd: de chemische stof wordt door een opening die zo groot is als het oog van een konijn en recht voor het papier wordt gehouden, op een weegpapiertje gespoten. De gewichtstoename van het papier wordt gebruikt voor een benadering van de hoeveelheid die in het oog wordt gespoten. Bij vluchtige stoffen kan de dosis worden geraamd door een opvangbakje voor en na de verwijdering van de teststof te wegen.

Voorlopige test (in-vivotest op oogirritatie/-corrosie met één dier)

Het is zeer wenselijk dat de in-vivotest in eerste instantie met één dier wordt uitgevoerd (zie het supplement bij deze testmethode: Een sequentiële teststrategie voor oogirritatie en -corrosie). Op basis van observaties moet het mogelijk zijn de ernst en reversibiliteit vast te stellen voordat verder wordt gegaan naar een bevestigende test bij een tweede dier.

Als de resultaten van deze test erop wijzen dat de chemische stof bij gebruik van de beschreven procedure corrosief of hevig irriterend is voor het oog, dienen er geen verdere tests op oogirritatie te worden uitgevoerd.

Bevestigende test (in-vivotest op oogirritatie met meer dieren)

Als er bij de voorlopige test geen corrosiereactie of hevige irritatie wordt waargenomen, moet de irritatie of negatieve reactie worden bevestigd met nog eens twee dieren. Als er bij de voorlopige test hevige irritatie wordt waargenomen, wordt aanbevolen de bevestigende test op sequentiële wijze bij één dier tegelijk uit te voeren en de twee andere dieren niet tegelijkertijd bloot te stellen. Als er bij het tweede dier corrosieve of hevig irriterende effecten optreden, wordt de test niet voortgezet. Als de resultaten van het tweede dier voldoende zijn om een gevarenindeling te maken, dienen geen verdere test te worden uitgevoerd.

Observatieperiode

De duur van de observatieperiode moet voldoende zijn om de omvang en de reversibiliteit van de waargenomen effecten volledig te kunnen beoordelen. Het experiment moet echter worden beëindigd zodra het dier tekenen van hevige pijn of ernstige nood vertoont (8). Om te bepalen of de effecten reversibel zijn, moeten de dieren normaal gesproken gedurende 21 dagen na de toediening van de teststof worden geobserveerd. Als al vóór het verstrijken van de 21 dagen wordt geconstateerd dat de effecten reversibel zijn, wordt het experiment op dat moment beëindigd.

Klinische observatie en inschaling van de oogreacties

De ogen worden één uur na TCA, en daarna ten minste dagelijks, uitvoerig beoordeeld op de aanwezigheid of afwezigheid van oogletsels. Dieren worden in de eerste 3 dagen meerdere keren per dag beoordeeld om ervoor te zorgen dat besluiten tot beëindiging tijdig worden genomen. Proefdieren worden gedurende de hele duur van de studie routinematig beoordeeld op klinische tekenen van pijn en/of nood (bv. herhaald krabben of wrijven van de ogen, buitensporig knipperen, buitensporig tranen) (9) (10) (11), ten minste tweemaal daags, met een minimum van 6 uur tussen de observaties, of vaker, indien nodig. Dit is nodig om i) dieren adequaat te beoordelen op tekenen van pijn en nood, teneinde onderbouwde beslissingen te kunnen nemen over de noodzaak om de dosering van analgetica te verhogen, en ii) dieren te beoordelen op tekenen van vastgestelde humane eindpunten, om onderbouwde beslissingen te kunnen nemen over de vraag of het aangewezen is om dieren op humane wijze te doden, en ervoor te zorgen dat dergelijke beslissingen tijdig worden genomen. Fluoresceïnekleuring wordt routinematig toegepast, en er wordt een spleetlampbiomicroscoop gebruikt wanneer dit passend wordt geacht (bv. beoordeling van de diepte van een verwonding bij ulceratie van de cornea) als hulpmiddel bij de detectie en meting van oogbeschadigingen, en om te beoordelen of is voldaan aan vastgestelde eindpuntcriteria voor

▼M7

humane euthanasie. Digitale foto's van waargenomen letsels kunnen worden verzameld als referentie en om een permanent dossier van de omvang van oogschade op te bouwen. De dieren worden niet langer dan nodig voor de test ingezet zodra er definitieve informatie is verkregen. Dieren die tekenen van hevige pijn of ernstige nood vertonen, worden onverwijld op humane wijze gedood en de chemische stof wordt dienovereenkomstig beoordeeld.

Dieren die na de indruppeling de volgende oogletsels ontwikkelen, worden op humane wijze gedood (zie tabel 1 voor een beschrijving van de klassen oogletsel): perforatie van de cornea, significante ulceratie van de cornea en stafyloom; bloed in de voorste oogkamer; klasse 4 troebelheid van de cornea; afwezigheid van een lichtreflex (iris-reactie klasse 2) die gedurende 72 uur aanhoudt; ulceratie van de conjunctivae; necrose van de conjunctivae of het knipvlies; of loslatend dood weefsel. De reden hiervoor is dat dergelijk oogletsel doorgaans niet reversibel is. Het wordt tevens aanbevolen de volgende oogletsels te gebruiken als humane eindpunten om studies vóór het einde van de geplande observatieperiode van 21 dagen te beëindigen. Deze oogletsels worden beschouwd als een voorteken van hevige irritatie of corrosie en verwondingen waarvan niet wordt verwacht dat ze vóór het einde van de observatieperiode van 21 dagen volledig zijn hersteld: grote diepte van verwonding (bv. ulceratie van de cornea die dieper gaat dan de oppervlakkige lagen van het stroma), destructie van de limbus > 50 % (blijkend uit bleking van het ooglidweefsel), en ernstige ooginfectie (afscheiding van pus). Een combinatie van: vascularisatie van het corneale oppervlak (d.w.z. pannus); geen afname van de oppervlakte van fluoresceïneverkleuring in de loop van de tijd op basis van een dagelijkse beoordeling; en/of het ontbreken van re-epithelisatie 5 dagen na aanbrenging van de teststof kunnen ook worden overwogen als potentieel bruikbare criteria die van invloed zijn op het klinische besluit om de studie vroegtijdig te beëindigen. Deze bevindingen afzonderlijk zijn echter onvoldoende om vroegtijdige beëindiging van de studie te rechtvaardigen. Wanneer eenmaal ernstige oogeffecten zijn vastgesteld, dient een behandelend of gekwalificeerd dierenarts met deskundigheid op het gebied van proefdieren of personeel dat is opgeleid om klinisch letsel vast te stellen, te worden geraadpleegd voor een klinisch onderzoek om te bepalen of de combinatie van deze effecten vroegtijdige beëindiging van de studie rechtvaardigt. De score van de oogreactie (conjunctivae, cornea en iris) wordt verkregen en geregistreerd op 1, 24, 48 en 72 uur na aanbrenging van de teststof (zie tabel 1). Wanneer de dieren geen oogletsel ontwikkelen, ag de test niet eerder dan 3 dagen na de indruppeling worden beëindigd. Dieren met oogletsel dat niet ernstig is, moeten worden geobserveerd tot het letsel verdwijnt of gedurende 21 dagen; op dat tijdstip wordt de test dan afgesloten. Observaties moeten ten minste bij 1 uur, 24 uur, 48 uur, 72 uur, 7 dagen, 14 dagen en 21 dagen plaatsvinden en worden opgetekend om de toestand van de letsels en de reversibiliteit of irreversibileit ervan vast te stellen. Frequentere observaties moeten plaatsvinden als dit nodig is om vast te stellen of het proefdier uit humane overwegingen moet worden geëuthanaseerd of vanwege negatieve resultaten uit de studie moet worden verwijderd.

Bij ieder onderzoek moeten de oogletsels (tabel 1) worden beoordeeld en opgetekend. Ook andere effecten in het oog (bv. pannus, verkleuring, veranderingen in de voorste kamer) en schadelijke systemische effecten worden gerapporteerd.

Het onderzoek van de reacties kan worden vergemakkelijkt met behulp van een binoculaire loep, een hand-spleetlamp, een biomicroscoop of andere geschikte instrumenten. Na de registratie van de observaties na 24 uur kunnen de ogen nader worden onderzocht met behulp van fluoresceïne.

De inschaling van oogreacties is per definitie subjectief. Om harmonisatie bij de inschaling van oogreacties te bevorderen en ter ondersteuning van de testlaboratoria en de personen die bij het uitvoeren en het interpreteren van de observatie betrokken zijn, moet het personeel dat de observatie uitvoert afdoende zijn opgeleid in het gebruikte scoringsysteem.

▼M7

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de resultaten

De scores voor de oogirritatie worden in samenhang met de aard en ernst van het letsel en de vraag of dit al dan niet reversibel is, beoordeeld. De individuele scores vormen geen absolute norm voor de irriterende eigenschappen van een chemische stof, aangezien ook andere effecten van de teststof worden beoordeeld. De individuele scores moeten veeleer als referentiewaarden worden beschouwd en zijn alleen zinvol wanneer ze worden ondersteund door een volledige beschrijving en evaluatie van alle observaties.

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Motivering voor in-vivotest: een bewijskrachtanalyse van reeds bestaande testgegevens, zoals de resultaten van een sequentiële teststrategie:

— een beschrijving van de relevante gegevens die van eerdere tests beschikbaar zijn;

— de gegevens die bij elke stap van de teststrategie verkregen zijn;

— een beschrijving van de uitgevoerde in-vitrotests met een gedetailleerde beschrijving van de procedures en de resultaten die met test/referentiestoffen verkregen zijn;

— een beschrijving van het uitgevoerde in-vivo-onderzoek op huidirritatie/corrosie met de verkregen resultaten;

— een bewijskrachtanalyse voor de uitvoering van het in-vivo-onderzoek.

Teststof:

— identificatiegegevens (bv. chemische naam en, indien beschikbaar, het CAS-nummer, de zuiverheid, bekende verontreinigingen, de herkomst en het chargenummer);

— de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de pH, de vluchtigheid, de oplosbaarheid, de stabiliteit en de reactiviteit met water);

— in geval van een mengsel worden de bestanddelen geïdentificeerd, met inbegrip van identificatiegegevens van de bestanddelen (bv. chemische namen en, indien beschikbaar, CAS-nummers) en hun concentraties;

— opgebrachte dosis.

Medium:

— identificatiegegevens, de concentratie (indien van toepassing) en het gebruikte volume;

— een motivering voor de keuze van het medium.

Proefdieren:

— de gebruikte soort/stam en een motivering indien andere dieren dan het albinokonijn worden gebruikt;

— de leeftijd van elk dier aan het begin van het onderzoek;

— het aantal dieren van elk geslacht in de test- en controlegroep (indien deze nodig is);

— het gewicht van elk dier aan het begin en het eind van de test;

— de herkomst, de huisvesting, de voeding enz.

▼M7

Anesthetica en analgetica:

— doses en tijdstippen waarop lokale anesthetica en systemische analgetica werden toegediend;

— als een lokaal anestheticum wordt gebruikt, de identificatiegegevens, de zuiverheid, het type en de potentiële interactie met teststof.

Resultaten:

— een beschrijving van de methode die is gebruikt om de irritatie op elk observatietijdstip in te schalen (bv. handspleetlamp, biomicroscoop of fluoresceïne);

— een tabel met de gegevens van de irritatie/corrosiereactie voor elk dier op elk observatietijdstip tot het moment waarop elk dier uit de test wordt genomen;

— een beschrijving in woorden van de ernst en de aard van de waargenomen irritatie of corrosie;

— een beschrijving van alle andere in het oog waargenomen letsels (bijvoorbeeld vascularisatie, pannusvorming, verkleving en verkleuring);

— een beschrijving van schadelijke lokale effecten buiten het oog en schadelijke systemische effecten, dossiers van klinische tekenen van pijn en nood, digitale foto's en eventuele histopathologische bevindingen.

Bespreking van de resultaten

Interpretatie van de resultaten

Een extrapolatie van de resultaten van het onderzoek naar oogirritatie bij proefdieren naar de mens heeft slechts een beperkte geldigheid. In veel gevallen is het albinokonijn gevoeliger voor stoffen die oogirritatie of -corrosie veroorzaken dan de mens.

Bij de interpretatie van de resultaten moet ervoor worden gezorgd dat irritatie ten gevolge van secundaire infectie wordt uitgesloten.

LITERATUUR

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

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

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

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

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

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

(7) Hoofdstuk B.4 van deze bijlage, *Acute huidirritatie/corrosie*.

▼M7

(8) OESO (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 nr. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, mei/juni, 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 nr. 10-7514, Research Triangle Park, NC, VS: National Institute of Environmental Health Sciences.

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

(13) Hoofdstuk B.40 van deze bijlage, *In-vitrohuidcorrosie: test op basis van de transcutane elektrische weerstand (TEW)*.

(14) Hoofdstuk B.40 bis van deze bijlage, *In-vitrohuidcorrosie: test met humaan huidmodel*.

(15) OESO (2006), *Test nr. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OESO, Parijs.

(16) Hoofdstuk B.47 van deze bijlage, *Bovine Corneal Opacity and Permeability- (BCOP-)testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is*.

(17) Hoofdstuk B.48 van deze bijlage, Isolated Chicken Eye-testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is.

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

(19) VN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Genève: United Nations Publications.

(20) EG (2008), Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006. Publicatieblad van de Europese Unie L 353, blz. 1-1355.

(21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, hoofdstuk R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_-r7a_en.pdf

▼M7

Tabel 1

Inschaling van het oogletsel

Hoornvlies	Rang
Troebelheid: dichtheidsgraad (wordt afgelezen in het gebied met de grootste dichtheid) (*)	
Geen ulceratie of troebelheid	0
Verspreide of diffuse troebele gebieden (meer dan een lichte vertroebeling van de normale glans); details van de iris duidelijk zichtbaar	1
Gemakkelijk te onderscheiden doorschijnend gebied; details van de iris enigszins vervaagd	2
Parelmoerachtig gebied; details van de iris niet zichtbaar; omvang van de pupil nauwelijks zichtbaar	3
Troebele cornea; iris niet zichtbaar door de troebelheid	4
Maximale score: 4	
Iris	
Normaal	0
Duidelijk verdiepte rugae, congestie, zwelling, matige hyperemie rond de cornea; of injectie; iris reageert op licht (een trage reactie wordt als een effect beschouwd)	1
Bloeding, macroscopische destructie of geen reactie op licht	2
Maximale score: 2	
Conjunctivae	
Roodheid (geldt voor palpebrale en bulbaire conjunctivae; niet voor cornea en iris)	
Normaal	0
Hyperemie in sommige bloedvaten (geïnjecteerd)	1
Diffuse karmozijnrode kleur; individuele vaten niet gemakkelijk zichtbaar	2
Diffuse dieprode kleur	3
Maximale score: 3	
Chemosis	
Zwelling (geldt voor oogleden en/of knipvliezen)	
Normaal	0
Iets meer zwelling dan normaal	1
Duidelijke zwelling met gedeeltelijk uitpuilende oogleden	2
Zwelling met ongeveer half gesloten oogleden	3
Zwelling met meer dan half gesloten oogleden	4
Maximale score: 4	

(*) Er moet worden aangegeven welk gebied van de cornea troebel is

▼M7

Aanhangsel

DEFINITIES

Bewijskracht(proces): het proces waarbij de sterke en zwakke punten van een verzameling gegevens worden gebruikt om tot een conclusie te komen die niet evident hoeft te zijn op basis van de afzonderlijke gegevens.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Niet-irriterend: een stof die niet is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van EPA-klasse I, II of III; of als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 1, 2, 2A of 2B; of van EU-klasse 1 of 2 (17) (18) (19).

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Trapsgewijs testen: een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende tests niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze sequentiële testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

Voor de ogen corrosieve stof: (a) een chemische stof die irreversibele weefselschade veroorzaakt aan de ogen; (b) een chemische stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 1, EPA-klasse I of EU-klasse 1 (17) (18) (19).

Voor de ogen hevig irriterende stof: (a) een chemische stof die weefselschade aan het oog veroorzaakt die meer dan 21 dagen na aanbrenging aanhoudt of die ernstige fysische gezichtsvermindering teweegbrengt; (b) een chemische stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 1, EPA-klasse I of EU-klasse 1 (17) (18) (19).

Voor de ogen irriterende stof: (a) een chemische stof die een reversibele wijziging in het oog teweegbrengt; (b) een chemische stof die is ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van EPA-klasse II of III; of als voor de ogen irriterende stof van GHS-klasse 2, 2A of 2B; of van EU-klasse 2 (17) (18) (19).

Zuur/alkalireserve: Voor zure preparaten is dit de hoeveelheid (g) natriumhydroxide/100 g preparaat die nodig is om een bepaalde pH te produceren. Voor alkalische preparaten is het de hoeveelheid (g) natriumhydroxide die overeenkomt met het g zwavelzuur/100 g preparaat dat nodig is om een bepaalde pH te produceren (Young *et al*. 1988).

▼M7

SUPPLEMENT BIJ TESTMETHODE B.5 ([1])

EEN SEQUENTIËLE TESTSTRATEGIE VOOR OOGIRRITATIE EN -CORROSIE

Algemene overwegingen

In het belang van verantwoorde wetenschap en het welzijn van dieren is het belangrijk dat het onnodig gebruik van dieren wordt vermeden en dat tests waarvan hevige reacties bij dieren worden verwacht, tot een minimum worden beperkt. Alle informatie over een chemische stof die relevant is voor de mogelijke oogirritatie/corrosie door die stof moet worden geëvalueerd voordat een in-vivotest wordt overwogen. Wellicht bestaat er al voldoende bewijsmateriaal om een teststof qua mogelijke oogirritatie of -corrosie in te delen zonder dat er tests bij proefdieren behoeven te worden uitgevoerd. Daarom zal het gebruik van een bewijskrachtanalyse en een sequentiële teststrategie de noodzaak van in-vivotests tot een minimum beperken, vooral als er van de chemische stof hevige reacties worden verwacht.

Er wordt aanbevolen dat een bewijskrachtanalyse wordt gebruikt om bestaande informatie over oogirritatie en -corrosie door chemische stoffen te evalueren en om te bepalen of ander aanvullend onderzoek dan in-vivo-oogonderzoek moet worden uitgevoerd om te helpen bij de bepaling van deze mogelijke effecten. Wanneer nader onderzoek nodig is, wordt aanbevolen de sequentiële teststrategie te gebruiken om de relevante experimentele gegevens te verkrijgen. Voor stoffen die nog niet zijn getest, moet de sequentiële teststrategie worden gebruikt om de gegevens te vergaren die nodig zijn om de oogcorrosie/-irritatie te bepalen. De voorlopige-teststrategie die in dit supplement wordt beschreven, werd in een OESO-workshop ontwikkeld (1). Later is zij bevestigd en opgenomen in het „Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances", die de steun heeft gekregen van de 28e gezamenlijke vergadering van het Comité chemische stoffen en de Werkgroep chemische stoffen in november 1998 (2), en in 2011 is bijgewerkt door een deskundigengroep van de OESO.

Hoewel deze teststrategie geen integrerend onderdeel van testmethode B.5 is, vormt zij de aanbevolen aanpak voor de bepaling van de eigenschappen qua oogirritatie/-corrosie. Deze aanpak houdt zowel een optimale gedragscode als een ethische referentie voor in-vivotests op oogirritatie/-corrosie in. De testmethode bevat een leidraad voor de uitvoering van de in-vivotest en geeft een overzicht van de factoren die vóór het overwegen van een dergelijke test in aanmerking moeten worden genomen. De sequentiële teststrategie levert een bewijskrachtbenadering voor de evaluatie van bestaande gegevens over de eigenschappen van chemische stoffen inzake oogirritatie/-corrosie en een trapsgewijze aanpak voor het vergaren van relevante gegevens over chemische stoffen waarvoor nader onderzoek nodig is of waarvoor nog geen onderzoek is uitgevoerd. De strategie omvat de uitvoering eerst van gevalideerde en erkende in-vitro- of ex-vivotests en daarna van testmethode B.4-onderzoeken onder specifieke omstandigheden (3) (4).

Beschrijving van de stapsgewijze teststrategie

Alvorens te beginnen met tests als onderdeel van de sequentiële teststrategie (zie figuur), moet alle beschikbare informatie worden geëvalueerd om te bepalen of in-vivo-oogonderzoek nodig is. Hoewel de evaluatie van individuele parameters (bv. een extreme pH) significante informatie kan opleveren, moet alle bestaande

([1]) Voor het gebruik van een geïntegreerde teststrategie voor oogirritatie onder de REACH-verordening, zie ook ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, hoofdstuk R.7a: Endpoint specific guidance http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

informatie worden geëvalueerd. Alle relevante gegevens over de effecten van de betrokken chemische stof en de qua structuur analoge verbindingen moeten bij het nemen van een beslissing over de bewijskracht worden geëvalueerd en er moet een motivering voor de beslissing worden gegeven. De nadruk moet in eerste instantie liggen op bestaande gegevens over de effecten van de chemische stof bij mens en dier en vervolgens op de resultaten van in-vitro- of ex-vivotests. Waar mogelijk moet in-vivo-onderzoek aan corrosieve chemische stoffen worden vermeden. Bij de teststrategie spelen de volgende factoren een rol:

Evaluatie van bestaande gegevens over de effecten bij mens en/of dier en/of in-vitrogegevens van gevalideerde en internationaal erkende methoden (stap 1).

In de eerste plaats moet worden gekeken naar bestaande gegevens over de effecten bij de mens, zoals klinisch en bedrijfsgeneeskundig onderzoek en ziektegevallen, en/of gegevens van oogonderzoek bij proefdieren en/of in-vitrogegevens van gevalideerde en internationaal erkende methoden voor oogirritatie/-corrosie, omdat deze informatie opleveren die rechtstreeks verband houdt met oogeffecten. Vervolgens moeten de beschikbare gegevens van onderzoek bij mens en/of dier naar huidcorrosie/-irritatie, en/of in-vitro-onderzoek van gevalideerde en internationaal erkende methoden voor huidcorrosie, worden geëvalueerd. Chemische stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief of hevig irriterend voor het oog zijn, mogen niet in de ogen van dieren worden gedruppeld en dit geldt ook voor chemische stoffen met corrosieve of hevig irriterende effecten op de huid; deze chemische stoffen moeten ook als corrosief en/of irriterend voor het oog worden beschouwd. Ook chemische stoffen waarvoor bij eerder uitgevoerd oogonderzoek afdoende is aangetoond dat ze niet corrosief en niet irriterend zijn, dienen niet meer in in-vivo-oogonderzoek te worden getest.

Analyse van structuuractiviteitrelaties (SAR) (stap 2).

Er moet worden gekeken naar de resultaten van tests met qua structuur verwante chemische stoffen, indien deze beschikbaar zijn. Wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn over de effecten van qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen bij mens en/of dier om te kunnen concluderen dat deze oogcorrosie/-irritatie kunnen veroorzaken, mag worden aangenomen dat de teststof tot dezelfde reacties zal leiden. In dat geval behoeft de stof wellicht niet te worden getest. Negatieve gegevens van onderzoek met qua structuur verwante stoffen of mengsels van dergelijke stoffen vormen in het kader van de sequentiële teststrategie geen afdoende bewijs dat de chemische stof geen corrosie of irritatie veroorzaakt. Voor de bepaling van de potentie voor zowel huidcorrosie en -irritatie als oogcorrosie en -irritatie moeten gevalideerde en erkende SAR-methoden worden gebruikt.

Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit (stap 3).

Chemische stoffen met een extreme pH van bijvoorbeeld $\leq$2,0 of $\geq$11,5 kunnen hevige lokale effecten hebben. Als een chemische stof op basis van een extreme pH als corrosief of irriterend voor het oog wordt aangeduid, kan ook rekening worden gehouden met zijn zuur/alkalireserve (buffercapaciteit) (5) (6) (7). Als de buffercapaciteit erop wijst dat een chemische stof wellicht niet corrosief voor het oog is (bv. chemische stoffen met een extreme pH en lage zuur/alkalireserve), moeten er nadere tests worden uitgevoerd om dit te bevestigen, waarbij bij voorkeur een gevalideerde en erkende in-vitro- of ex-vivotest moet worden gebruikt (zie punt 10).

Overweging van andere bestaande informatie (stap 4).

In deze fase moet alle beschikbare informatie over systemische toxiciteit via de huid worden geëvalueerd. Ook de acute huidtoxiciteit van de teststof moet in de overwegingen worden betrokken. Als er is aangetoond dat de teststof via de huid zeer toxisch is, behoeft deze wellicht niet in het oog te worden getest. Hoewel er niet noodzakelijkerwijs een verband is tussen acute huidtoxiciteit en oogirritatie/-corrosie, kan worden aangenomen dat een stof die via de huid zeer toxisch is,

▼M7

ook bij indruppelen in het oog hoge toxiciteit zal vertonen. Deze gegevens kunnen ook tussen de stappen 2 en 3 worden bezien.

Evaluatie van huidcorrosie door de chemische stof indien ook vereist voor regelgevingsdoeleinden (stap 5).

De potentiële huidcorrosiviteit en het hevig-irriterende karakter moeten eerst worden geëvalueerd overeenkomstig testmethode B.4 (4) en het bijbehorende supplement (8), met inbegrip van het gebruik van gevalideerde en internationaal erkende in-vitrotestmethoden voor huidcorrosie (9) (10) (11). Als blijkt dat de chemische stof huidcorrosie of hevige huidirritatie veroorzaakt, kan deze ook worden beschouwd als een stof die oogcorrosie of hevige oogirritatie veroorzaakt. Dit betekent dat er dan geen verdere test behoeft te worden uitgevoerd. Als de chemische stof niet corrosief of hevig irriterend is voor de huid, moet er een in-vitro- of ex-vivotest op oogirritatie worden uitgevoerd.

Resultaten van in-vitro- of ex-vivotests (stap 6).

Chemische stoffen waarvan met een in-vitro- of ex-vivotest (12) (13), die specifiek voor de beoordeling van oogcorrosie/-irritatie is gevalideerd en internationaal erkend, is aangetoond dat ze corrosieve of hevig irriterende eigenschappen hebben, behoeven niet bij dieren te worden getest. Er kan worden aangenomen dat dergelijke chemische stoffen in vivo vergelijkbare hevige effecten veroorzaken. Als er geen gevalideerde en erkende in-vitro/ex-vivotests beschikbaar zijn, wordt stap 6 overgeslagen en wordt direct doorgegaan naar stap 7.

In-vivotest bij konijnen (stappen 7 en 8).

Wanneer wordt overgegaan tot in-vivo-oogtests, dient eerst een voorlopige test met één dier te worden gedaan. Als de resultaten van deze test erop wijzen dat de chemische stof hevig irriterend of corrosief voor de ogen is, dienen er geen verdere tests te worden uitgevoerd. Als er bij deze test geen corrosief of hevig irriterend effect wordt waargenomen, wordt er een bevestigende test met nog eens twee dieren uitgevoerd. Afhankelijk van de resultaten van de bevestigende test kunnen verdere tests nodig zijn. [Zie testmethode B.5.]

▼M7

TEST- EN EVALUATIESTRATEGIE VOOR OOGIRRITATIE/-CORROSIE

	Activiteit	Bevinding	Conclusie
1	Bestaande gegevens bij mens en/of dier, en/of in-vitrogegevens van gevalideerde en internationaal erkende methoden waaruit effecten op de ogen blijken	Ernstige oogbeschadiging	Apicaal eindpunt; als corrosief voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
		Oogirritatie	Apicaal eindpunt; als irriterend voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
		Niet corrosief/niet irriterend voor de ogen	Apicaal eindpunt; als niet corrosief en niet irriterend voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
	Bestaande gegevens bij mens en/of dier, en/of in-vitrogegevens van gevalideerde en internationaal erkende methoden waaruit corrosieve effecten op de huid blijken	Huidcorrosie	Als corrosief voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
	Bestaande gegevens bij mens en/of dier, en/of in-vitrogegevens van gevalideerde en internationaal erkende methoden waaruit hevig irriterende effecten op de huid blijken	Hevige huidirritatie	Als irriterend voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
	↓		
	Geen informatie beschikbaar of geen conclusie mogelijk		
	↓		
2	SAR voor oogcorrosie/-irritatie uitvoeren	Prognose ernstige oogbeschadiging	Als corrosief voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
		Prognose oogirritatie	Als irriterend voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
	SAR voor huidcorrosie overwegen	Prognose huidcorrosie	Als corrosief voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
	↓		
	Prognose onmogelijk, twijfelachtig of negatief		
	↓		
3	pH meten (eventueel rekening houden met buffercapaciteit)	pH £ 2 of 11,5 (eventueel met hoge buffercapaciteit)	Als corrosief voor de ogen beschouwd. Geen tests nodig.
	↓		
	2< pH < 11,5, of eventueel pH£ 2,0 of 11,5 met geringe/geen buffercapaciteit		
	↓		
4	Bestaande gegevens over systemische toxiciteit via de huid overwegen	Zeer toxisch bij concentraties die in het oog zouden worden getest.	Chemische stof zou te toxisch zijn om te testen. Geen tests nodig.

▼M7

	Activiteit	Bevinding	Conclusie
	↓		
	Informatie niet beschikbaar of chemische stof niet zeer toxisch		
	↓		
5	Experimenteel het potentieel voor huidcorrosie beoordelen volgens de teststrategie in hoofdstuk B.4 van deze bijlage, indien ook vereist voor regelgevingsdoeleinden	Corrosie of hevige irritatie	Als corrosief voor de ogen beschouwd. Geen verdere tests nodig.
	↓		
	Chemische stof is niet corrosief of hevig irriterend voor de huid		
	↓		
6	Gevalideerde en erkend in-vitro- of ex-vivo-oogtest(s) uitvoeren	Corrosie of hevige irritatie	Als corrosief of hevig irriterend voor de ogen beschouwd, mits de uitgevoerde test(s) kunnen worden gebruikt om corrosieve/hevig irriterende stoffen te identificeren en de chemische stof binnen het toepassingsgebied van de test(s) valt. Geen verdere tests nodig.
		Irritatiereactie	Als irriterend voor de ogen beschouwd, mits de uitgevoerde test(s) kunnen worden gebruikt om corrosieve stoffen, hevig irriterende stoffen en irriterende stoffen juist te identificeren en de chemische stof binnen het toepassingsgebied van de test(s) valt. Geen verdere tests nodig.
		Geen irritatiereactie	Als niet irriterend voor de ogen beschouwd, mits de uitgevoerde test(s) kunnen worden gebruikt om niet irriterende stoffen juist te identificeren, om deze juist te onderscheiden van chemische stoffen die irriterend, hevig irriterend, of corrosief voor de ogen zijn, en de chemische stof binnen het toepassingsgebied van de test(s) valt. Geen verdere tests nodig.
	↓		
	Gevalideerde en erkende in-vitro- of ex-vivo-oogtest(s) onbruikbaar om tot een conclusie te komen		
	↓		

▼M7

	Activiteit	Bevinding	Conclusie
7	Voorlopige in-vivo-oogtest bij konijnen met één dier uitvoeren	Ernstige oogbeschadiging	Als corrosief voor de ogen beschouwd. Geen verdere tests nodig.
	↓		
	Geen ernstige beschadiging of geen reactie		
	↓		
8	Bevestigende test uitvoeren met een of twee extra dieren	Corrosief of irriterend	Als corrosief of irriterend voor de ogen beschouwd. Geen verdere tests nodig.
		Niet corrosief of irriterend	Als niet irriterend en niet corrosief voor de ogen beschouwd. Geen verdere tests nodig.

LITERATUUR

(1) OESO (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Gehouden in Solna, Zweden, 22 — 24 januari 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

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

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

(4) Hoofdstuk B.4 van deze bijlage, Acute huidirritatie/corrosie.

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

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

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

(8) Supplement bij hoofdstuk B.4 van deze bijlage, Een sequentiële teststrategie voor huidirritatie en -corrosie.

(9) Hoofdstuk B.40 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: test op basis van de transcutane elektrische weerstand (TEW).

(10) Hoofdstuk B.40 bis van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: test met humaan huidmodel.

(11) OESO (2006), *Test nr. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OESO, Parijs.

▼**M7**

(12) Hoofdstuk B.47 van deze bijlage, Bovine Corneal Opacity and Permeability- (BCOP-)testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is.

(13) Hoofdstuk B.48 van deze bijlage, Isolated Chicken Eye-testmethode voor de identificatie van i) chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken en ii) chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is.

▼B

B.6. **SENSIBILISATIE VAN DE HUID**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Opmerkingen:

De gevoeligheid en het vermogen van een test om stoffen op te sporen met potentieel huidsensibiliserende eigenschappen bij de mens zijn belangrijk in een systeem voor de classificatie van toxische stoffen ten behoeve van de volksgezondheid.

Er bestaat géén universele testmethode waarmee alle stoffen die de menselijke huid kunnen sensibiliseren, adequaat kunnen worden geïdentificeerd en die voor alle stoffen toepasbaar is.

Bij de keuze van een test moet rekening worden gehouden met factoren zoals de fysische kenmerken van een stof, met inbegrip van het vermogen om de huid binnen te dringen.

Er zijn twee soorten tests ontwikkeld die gebruik maken van cavia's: het type waarbij een adjuvans wordt gebruikt en waarbij een verhoogde allergische reactie wordt opgewekt door het oplossen of suspenderen van de teststof in Freunds compleet adjuvans (FCA), en tests waarbij geen adjuvans wordt gebruikt.

Proeven met adjuvans voorspellen een eventueel huidsensibiliserend effect van een stof bij mensen wellicht nauwkeuriger dan methoden die geen gebruik maken van Freunds compleet adjuvans; zij verdienen dan ook de voorkeur.

De maximalisatietest met cavia's is een algemeen toegepaste test waarbij een adjuvans gebruikt wordt. Alhoewel verschillende andere methoden kunnen worden gebruikt om het huidsensibiliserend vermogen van een stof aan te tonen, wordt de maximalisatietest beschouwd als de adjuvanstechniek die de voorkeur heeft.

Voor veel soorten chemicaliën worden tests waarbij geen adjuvans wordt gebruikt (de Buehlertest heeft de voorkeur) als minder gevoelig beschouwd.

In bepaalde gevallen kunnen er goede redenen zijn om de Buehlertest te verkiezen, met lokale applicatie in plaats van intradermale injectie zoals in de maximalisatietest met cavia's. Voor het gebruik van de Buehlertest dient een wetenschappelijke motivering te worden gegeven.

De maximalisatietest met cavia's en de Buehlertest worden hier beschreven. Andere methoden mogen worden gebruikt op voorwaarde dat zij goed zijn gevalideerd en wetenschappelijk verantwoord zijn.

Indien een erkende screeningtest werd uitgevoerd en daarbij een positief resultaat werd geconstateerd, mag de teststof als een potentieel sensibiliserende stof worden aangemerkt en is het niet nodig ook nog een test met cavia's uit te voeren. Indien een dergelijke test evenwel tot een negatief resultaat heeft geleid, moet een caviatest worden uitgevoerd overeenkomstig de onder deze testmethode beschreven procedure.

Zie ook algemene inleiding deel B.

▼B

1.2. DEFINITIES

Huidsensibilisatie (allergische contactdermatitis): is een door een immuunrespons veroorzaakte huidreactie op een stof. Bij mensen kan de reactie de vorm aannemen van jeuk, erytheem, oedeem (waterzucht), pukkels, blaasjes, blaren of een combinatie hiervan. Bij andere soorten kunnen de reacties anders zijn en kan alleen erytheem of oedeem optreden.

Inductieblootstelling: een experimentele blootstelling van een proefdier aan een teststof met de bedoeling een hypersensitieve toestand te induceren.

Inductieperiode: een periode van ten minste een week na de inductieblootstelling, gedurende welke een hypersensitieve toestand ontwikkeld kan worden.

Provocatieblootstelling een experimentele blootstelling — na de inductieperiode — van een voorheen reeds blootgesteld proefdier aan een teststof, om vast te stellen of het dier een hypersensitieve reactie vertoont.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

De gevoeligheid en de betrouwbaarheid van de gebruikte technieken moet iedere zes maanden worden vastgesteld door het gebruik van stoffen waarvan bekend is dat ze lichte tot matige huidsensibiliserende eigenschappen hebben.

Bij een goed uitgevoerde test kan een reactie van ten minste 30 % worden verwacht bij een adjuvanstest en van ten minste 15 % bij een niet-adjuvanstest, bij gebruikmaking van zwakke/middelsterke sensibilisatoren.

De volgende stoffen genieten de voorkeur:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-naam	Triviale naam
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldehyde	α-hexylcinnamaldehyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-thiol (mercaptobenzothiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	norcaïne

Er kunnen omstandigheden zijn waarbij andere referentiestoffen, die aan bovenstaande eisen voldoen, kunnen worden gebruikt; dit moet wetenschappelijk verantwoord worden.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De proefdieren worden eerst aan de teststof blootgesteld door een intradermale injectie en/of epidermale toepassing (inductieblootstelling). Na een rustperiode van 10 tot 14 dagen (inductieperiode), tijdens welke een immuunreactie op gang kan komen, worden de dieren blootgesteld aan een provocatiedosis. De omvang en intensiteit van de cutane reactie op de provocatieblootstelling bij de proefdieren wordt vergeleken met die van de controlegroep die een blanco behandeling ondergaat bij de industrie maar wél de provocatiedosis toegediend krijgt.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

Als het nodig wordt geacht om de teststof te verwijderen, moet dit gebeuren met behulp van water of een ander geschikt oplosmiddel zonder dat de optredende reactie daardoor wordt beïnvloed of de opperhuid daardoor wordt geschonden.

▼B

1.5.1. *Maximalisatietest met cavia's (GPMT)*

1.5.1.1. Voorbereiding

Gezonde jonge volwassen albinocavia's worden ten minste 5 dagen voor het begin van de test geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden. Voor de test worden de dieren op aselecte wijze verdeeld over de behandelingsgroepen. Verwijdering van het haar gebeurt door middel van knippen, scheren of eventueel door chemische ontharing, afhankelijk van de gebruikte testmethode. Er dient op te worden gelet dat de huid niet beschadigd wordt. De dieren worden gewogen vóór het begin en aan het einde van de test.

1.5.1.2. Proefomstandigheden

1.5.1.2.1. Proefdieren

Er wordt gebruik gemaakt van stammen albinocavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

1.5.1.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Minimaal 10 dieren worden gebruikt voor de behandelde groep en ten minste vijf voor de controlegroep. Als er minder dan 20 testcavia's en 10 controlecavia's worden gebruikt en het niet mogelijk is om vast te stellen of de teststof sensibiliserende eigenschappen heeft, wordt ten sterkste aangeraden om meer dieren te testen zodat een totaal van ten minste 20 testdieren en 10 controledieren wordt bereikt.

1.5.1.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof die voor iedere inductie wordt gebruikt moet systemisch goed te verdragen zijn en gelijk zijn aan de hoogste concentratie die lichte tot matige huidirritatie veroorzaakt. De concentratie die voor de provocatieblootstelling wordt gebruikt moet de hoogste niet-irriterende dosis zijn. Indien noodzakelijk, kunnen de juiste concentraties worden vastgesteld aan de hand van een verkennende studie bij twee of drie proefdieren. Hierbij kan worden overwogen gebruik te maken van met FCA behandelde proefdieren.

1.5.1.3. Procedure

1.5.1.3.1. Inductie

Dag 0 — Testgroep

In de onthaarde schouderstreek worden drie paar injecties van 0,1 ml gegeven, zó dat van ieder paar er één aan elke zijde ligt:

Injectie 1: een 1:1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing;

Injectie 2: de teststof in een geschikt vehiculum en in de geschikte concentratie;

Injectie 3: de teststof in de gekozen concentratie, opgelost in een l:l-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing.

Voor injectie 3 worden de in water oplosbare teststoffen in water opgelost vóór het mengen met FCA. In vet oplosbare of onoplosbare stoffen worden in FCA gesuspendeerd vóór het mengen met water. De uiteindelijke concentratie van de teststof moet gelijk zijn aan die welke voor injectie 2 wordt gebruikt.

▼B

De injecties 1 en 2 worden dicht bij elkaar en het dichtst bij het hoofd toegediend en injectie 3 aan de staartzijde van het testgebied.

Dag 0 — Controlegroep

Op dezelfde plaatsen als bij de proefdieren worden drie paar intradermale injecties van 0,1 ml toegediend:

Injectie 1: een 1:1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing;

Injectie 2: het onverdunde vehiculum;

Injectie 3: een 50 %-formulering (gewicht/volume) van het vehiculum in een 1:1-mengsel (volumeverhouding) van FCA en water of fysiologische zoutoplossing.

Dag 5-7 — Testgroep en controlegroep

Als de te onderzoeken stof geen huidirritatie geeft wordt het testgebied ongeveer 24 uur vóór de plaatselijke inductiebehandeling na knippen en/of scheren behandeld met 0,5 ml van een 10 %-formulering van natriumlaurylsulfaat in vaseline om een plaatselijke irritatie op te wekken.

Dag 6-8 — Testgroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Een filtreerpapier (2 cm × 4 cm) wordt gedrenkt met de teststof in een geschikt vehiculum en door middel van een occlusief verband gedurende 48 uur op het testgebied aangebracht. De keuze van het vehiculum moet worden verantwoord. Vaste stoffen worden verpulverd en in een geschikt vehiculum opgenomen. Vloeistoffen kunnen, zo nodig, onverdund worden aangebracht.

Dag 6-8 — Controlegroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Op dezelfde wijze als bij de testgroep wordt alleen het vehiculum aangebracht en gedurende 48 uur met het testgebied in contact gehouden door een occlusief verband.

1.5.1.3.2. Provocatie

Dag 20-22 — Testgroep en controlegroep

Beide flanken van de dieren uit de testgroep en de controlegroep worden onthaard. Op één flank van de behandelde dieren wordt een gaasje of cupje met de teststof aangebracht en, waar nodig, een gaasje of cupje met alleen het vehiculum op de andere flank. Door middel van een occlusief verband wordt het gaasje gedurende 24 uur met de huid in contact gehouden.

1.5.1.3.3. Observatie en scoring; testgroep en controlegroep

— Ongeveer 21 uur nadat het gaasje is verwijderd, wordt het provocatiegebied gereinigd en zo nodig zorgvuldig geknipt en/of geschoren en onthaard.

— Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 48 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.

— Ongeveer 24 uur na deze waarneming wordt een tweede waarneming gedaan (72 uur na aanvang provocatie) en eveneens geregistreerd.

Aangeraden wordt om de proefdieren en controledieren „blind” (d.w.z. zonder te weten of het test- of controledieren betreft) te scoren.

Als het nodig blijkt om opheldering te verkrijgen over de resultaten van de eerste provocatie kan na ongeveer een week een tweede provocatie (d.w.z. een herprovocatie) worden overwogen met, zo nodig, een nieuwe controlegroep. Herprovocatie kan ook plaatsvinden bij de oorspronkelijke controlegroep.

▼B

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen, waaronder ook systemische reacties, die het gevolg zijn van de inductie- en provocatieprocedures moeten worden geobserveerd en geregistreerd volgens de scoreschaal van Magnusson/Kligman (zie aanhangsel). Andere technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden toegepast om klaarheid te verschaffen omtrent onduidelijke reacties.

1.5.2. *Buehlertest*

1.5.2.1. Voorbereiding

Gezonde jonge volwassen albinocavia's worden ten minste 5 dagen voor het begin van de test geacclimatiseerd aan de laboratoriumomstandigheden. Voor de test worden de dieren op aselecte wijze verdeeld over de behandelingsgroepen. Verwijdering van het haar gebeurt door middel van knippen, scheren of eventueel door chemische ontharing, afhankelijk van de gebruikte testmethode. Er dient op te worden gelet dat de huid niet beschadigd wordt. De dieren worden gewogen vóór het begin en aan het eind van de test.

1.5.2.2. Proefomstandigheden

1.5.2.2.1. Proefdieren

Er wordt gebruik gemaakt van stammen albinocavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

1.5.2.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Voor de behandelde groep worden minimaal 20 dieren gebruikt en voor de controlegroep ten minste 10.

1.5.2.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof die voor iedere inductie wordt gebruikt moet de hoogste zijn die lichte maar geen excessieve huidirritatie geeft. De concentratie die voor de provocatieblootstelling wordt gebruikt moet de hoogste niet-irriterende dosis zijn. Indien noodzakelijk, kunnen de juiste concentraties worden vastgesteld aan de hand van een verkennende studie bij twee of drie proefdieren.

Als de teststoffen in water oplosbaar zijn verdient water of een verdunde, niet-irriterende oplossing van een surfactans de voorkeur als vehiculum. Bij andere teststoffen wordt de voorkeur gegeven aan 80 % alcohol/water bij de inductie en aan aceton bij de provocatie.

1.5.2.3. Procedure

5.5.2.3.1. Inductie

Dag 0 — Testgroep

Eén flank wordt onthaard. Het testgaasje moet doordrenkt zijn met de teststof in een geschikt vehiculum (de keuze van het vehiculum moet worden verantwoord; vloeibare teststoffen kunnen eventueel onverdund worden aangebracht).

Het testgaasje wordt op het testgebied aangebracht en daarmee gedurende 6 uur in contact gehouden door een occlusieve pleister of een cupje en een geschikt verband.

▼B

Het testgaasje moet afdekkend zijn. Er kan gebruik worden gemaakt van een rond of vierkant wattenschijfje met een oppervlakte van ongeveer 4-6 cm^2. Om een goede afdekking te garanderen kan een passende voorziening worden gebruikt waardoor de bewegingsvrijheid van de dieren wordt beperkt. Bij gebruik van een zwachtel alléén kan herhaalde blootstelling nodig zijn.

Dag 0 — Controlegroep

Een flank wordt onthaard. Op dezelfde wijze als bij de testgroep wordt nu alleen het vehiculum aangebracht. Het testgaasje wordt op het testgebied aangebracht en daarmee gedurende 6 uur in contact gehouden door een occlusieve pleister of een cupje en een geschikt verband. Als kan worden aangetoond dat een blanco controlegroep niet nodig is, kunnen niet-behandelde dieren als controlegroep worden gebruikt.

Dag 6-8 en 13-15 — Testgroep en controlegroep

Hetzelfde testoppervlak van dezelfde flank ondergaat, na eventuele verwijdering van de beharing, op dag 6-8 en nogmaals op dag 13-15 dezelfde blootstelling als op dag 0.

1.5.2.3.2. Provocatie

Dag 27-29 — Testgroep en controlegroep

De onbehandelde flank van de test- en controledieren wordt onthaard. Een occlusieve pleister of een cupje met de juiste hoeveelheid teststof in de maximale niet-irriterende concentratie, wordt aangebracht op het achterste deel van de flank van de testdieren en van de controledieren.

Indien dit wenselijk is wordt op het voorste gedeelte van de onbehandelde flank van zowel de testdieren als de controledieren een occlusieve pleister of een cupje met alleen het vehiculum aangebracht. De pleisters of cupjes worden gedurende 6 uur op hun plaats gehouden door een geschikt verband.

1.5.2.3.3. Observatie en scoring

— Ongeveer 21 uur nadat de pleister is verwijderd wordt het provocatiegebied onthaard.

— Ongeveer 3 uur hierna (ongeveer 30 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd volgens de in het aanhangsel vermelde scores.

— Ongeveer 24 uur na de 30-uurswaarneming wordt een tweede waarneming van de huidreacties gedaan (ongeveer 54 uur na aanvang van de provocatie) en worden de resultaten weer geregistreerd.

Aangeraden wordt om de testdieren en controledieren „blind” (d.w.z. zonder te weten of het test-of controledieren betreft) te scoren.

Als het nodig blijkt om opheldering te verkrijgen over de resultaten van de eerste provocatie kan na ongeveer een week een tweede provocatie (d.w.z. een herprovocatie) overwogen worden met, zo nodig, een nieuwe controlegroep. Herprovocatie kan ook plaatsvinden bij de oorspronkelijke controlegroep.

▼B

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen, waaronder ook systemische reacties, die het gevolg zijn van de inductie- en provocatieprocedures moeten worden geobserveerd en geregistreerd volgens de schaal van Magnusson/Kligman (zie aanhangsel). Andere technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden toegepast om klaarheid te verschaffen omtrent onduidelijke reacties.

2. **GEGEVENS (GPMT EN BUEHLERTEST)**

Alle gegevens moeten in tabelvorm worden samengevat, waarbij voor ieder dier de bij iedere controle waargenomen huidreacties worden vermeld.

3. **RAPPORTAGE (GPMT EN BUEHLERTEST)**

Wanneer vóór de proef met cavia's een screeningstest wordt uitgevoerd, moet een beschrijving van of verwijzing naar de test in kwestie (bijvoorbeeld de Local Lymph Node Assay (LI.NA) of de Mouse Ear Swelling Test (MEST)) worden gegeven en moeten bijzonderheden over de procedure worden verstrekt. Verder moeten de resultaten worden gerapporteerd die met de teststof en de referentiestof zijn verkregen.

Verslag van de proefnemingen (GPMT en Buehlertest)

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

Proefdieren:

— gebruikte caviastam;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, behuizing, dieet, enz.;

— gewicht van ieder dier bij het begin van de proefneming.

Proefomstandigheden:

— gebruikte techniek bij het prepareren van het te behandelen oppervlak;

— bijzonderheden met betrekking tot het pleister- of gaasmateriaal en de wijze van aanbrengen;

— resultaten van de voorstudie met conclusies over de inductie- en provocatieconcentraties die bij de test moeten worden gebruikt;

— bijzonderheden over de bereiding van de teststof, het toedienen en het verwijderen hiervan;

— motivering van de keuze van het vehiculum;

— concentraties van vehiculum en teststof die gebruikt zijn bij de inductie en de provocatie en de totale hoeveelheid teststof die gebruikt is voor inductie en provocatie.

Resultaten:

— een samenvatting van de resultaten van de meest recente gevoeligheids- en betrouwbaarheidscontrole (zie 1.3), met inbegrip van informatie over gebruikte teststof, concentratie en vehiculum;

▼B

— resultaten voor ieder dier afzonderlijk, inclusief scores;

— beschrijving van de aard en de intensiteit van de waargenomen effecten;

— eventuele histopathologische bevindingen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 406 van de OESO

▼B

Aanhangsel

TABEL

Magnusson/Kligman-scoreschaal voor de evaluatie van reacties op de provocatiepleister

0 = geen zichtbare verandering

1 = discontinu of vlekkerig erytheem

2 = matig en aaneengesloten erytheem

3 = ernstig erytheem met zwelling

▼M4

B.7. TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 407 (2008) van de OESO (TG 407). De oorspronkelijke testrichtlijn TG 407 werd in 1981 vastgesteld. In 1995 werd een herziene versie vastgesteld, met als doel aanvullende informatie te verkrijgen met behulp van de in het onderzoek gebruikte dieren, met name over neurotoxiciteit en immunotoxiciteit.

2. In 1998 is de OESO een actie gestart om bestaande testrichtlijnen te herzien en nieuwe testrichtlijnen te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars (8), en heeft zij daaraan een hoge prioriteit toegekend. Een onderdeel van deze actie was het bijwerken van de bestaande OESO-richtlijn voor „toxiciteitsonderzoek (oraal) op knaagdieren bij herhaalde toediening (28 dagen)" (TG 407) door er geschikte parameters in op te nemen om de endocriene werking van teststoffen vast te kunnen stellen. Deze procedure ging gepaard met een uitgebreid internationaal programma voor het testen van de relevantie en praktische uitvoerbaarheid van de aanvullende parameters, de mate waarin met deze parameters de (anti)oestrogene, (anti)androgene, en (anti)thyreoïde werking van stoffen kan worden vastgesteld, de intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en de interferentie tussen de nieuwe parameters en die welke in de vroegere TG 407 waren voorgeschreven. De vele gegevens die daarbij zijn verkregen, zijn bijeengebracht en in detail geëvalueerd in een uitgebreid OESO-verslag (9). Deze bijgewerkte testmethode B.7 (gelijkwaardig met TG 407) is het resultaat van de ervaringen en resultaten van het internationale testprogramma. Met deze testmethode kunnen bepaalde met het endocrien systeem samenhangende effecten in de context van andere toxicologische effecten worden geplaatst.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

3. Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een chemische stof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests eerst informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Deze testmethode heeft tot doel de effecten van toxiciteit op een zeer grote verscheidenheid aan potentiële doelwitten te onderzoeken. Zij levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde blootstelling gedurende een relatief beperkte periode, met inbegrip van effecten op het zenuwstelsel, het immuunsysteem en het endocrien systeem. Met betrekking tot deze specifieke eindpunten moet zij de identificatie mogelijk maken van potentieel neurotoxische stoffen, die in dit opzicht nader verdienen te worden onderzochtt, en stoffen die de fysiologie van de schildklier verstoren. Ook kan zij gegevens opleveren over stoffen die van invloed zijn op de mannelijke en/of vrouwelijke voortplantingsorganen van jonge volwassen dieren en een indicatie geven van de immunologische effecten.

4. De resultaten van deze testmethode B.7 moeten worden gebruikt voor de identificatie van de gevaren en het beoordelen van risico's. De resultaten die worden verkregen met de parameters die met het endocriene systeem te maken hebben, moeten worden gezien in samenhang met het conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen (11). De methode omvat het basale toxiciteitsonderzoek bij herhaalde toediening dat kan worden gebruikt voor stoffen waarvoor een onderzoek van 90 dagen niet gerechtvaardigd is (bv. als het productievolume binnen bepaalde grenzen blijft), of ter voorbereiding op een langetermijnsonderzoek. De blootstellingstijd bedraagt 28 dagen.

▼M4

5. Het internationale programma voor de validering van geschikte parameters om de mogelijke endocriene werking van een teststof vast te stellen, heeft aangetoond dat de kwaliteit van de met behulp van deze testmethode B.7 verkregen gegevens sterk zal afhangen van de ervaring waarover het testlaboratorium beschikt. Het gaat daarbij met name om de histopathologische bepaling van cyclische veranderingen in de vrouwelijke voortplantingsorganen en de bepaling van het gewicht van de kleine hormoonafhankelijke organen die moeilijk te ontleden zijn. Er zijn richtsnoeren ontwikkeld voor histopathologisch onderzoek (19). Deze zijn beschikbaar op de openbare website van de OESO over de testrichtsnoeren. Zij zijn bedoeld om de pathologen te helpen bij hun onderzoek en om de gevoeligheid van de bepalingen te helpen vergroten. Van diverse parameters werd vastgesteld dat zij als indicator kunnen dienen van met het endocrien systeem samenhangende toxiciteit; deze zijn in de testmethode opgenomen. Parameters waarvoor onvoldoende gegevens beschikbaar waren om het nut ervan te kunnen vaststellen of waarvan tijdens het valideringsprogramma slechts in geringe mate kon worden aangetoond dat zij zouden kunnen helpen bij de opsporing van hormoonontregelaars, worden voorgesteld als facultatieve eindpunten (zie aanhangsel 2).

6. Op grond van de tijdens het valideringsproces verkregen gegevens moet worden benadrukt dat deze bepaling onvoldoende gevoelig is om alle stoffen met (anti)androgene of (anti)oestrogene werking te kunnen identificeren (9). De testmethode wordt niet uitgevoerd in het levensstadium dat het gevoeligst is voor hormoonontregeling. Met de testmethode zijn tijdens het valideringsproces desondanks stoffen geïdentificeerd die de schildklierfunctie in sterke of lichte mate beïnvloeden, alsmede sterk of matig endocrien werkzame stoffen die via de oestrogeen- of androgeenreceptoren werken, maar in de meeste gevallen konden endocrien werkzame stoffen die de oestrogeen- of androgeenreceptoren in lichte mate beïnvloeden niet worden geïdentificeerd. Daarom kan de methode niet als screeningtest voor endocriene activiteit worden omschreven.

7. Het ontbreken van effecten die verband houden met deze werkingswijzen kan derhalve niet als bewijs worden beschouwd voor het ontbreken van effecten op het endocrien systeem. Wat de met het endocrien systeem samenhangende effecten betreft, moet de karakterisering van stoffen derhalve niet worden gebaseerd op de resultaten van deze testmethode alleen, maar moeten deze resultaten gebruikt worden in een benadering met meervoudige bewijsvoering („weight of evidence”-benadering), waarin alle bestaande gegevens over een stof worden benut om de mogelijke endocriene werking ervan te karakteriseren. Voor de besluitvorming over regelgeving inzake endocriene werking (karakterisering van stoffen) moet daarom een brede benadering worden gevolgd, die niet slechts leunt op de resultaten van de toepassing van deze testmethode.

8. Erkend wordt dat alle procedures waarbij dieren worden gebruikt, aan de plaatselijke normen voor de verzorging van dieren moeten voldoen; bij de beschrijvingen van de verzorging en behandeling hieronder gaat het om minimale prestatienormen, die door de lokale regelgeving worden vervangen indien deze strikter is. De OESO heeft nadere richtsnoeren voor de humane behandeling van dieren opgesteld (14).

9. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

10. De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks zorgvuldig geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden geëuthanaseerd, wordt obductie verricht. Dieren die aan het eind van het onderzoek nog in leven zijn, worden geëuthanaseerd en ook hierop wordt obductie verricht. Een onderzoek van 28 dagen levert informatie op over de effecten van herhaalde orale blootstelling en kan erop

▼M4

wijzen dat verdere langetermijnonderzoeken nodig zijn. Ook kan het informatie opleveren over de te kiezen concentraties voor langetermijnonderzoek. Met de met behulp van deze testmethode verkregen gegevens kan de toxiciteit van de teststof worden gekarakteriseerd, een indicatie van de dosis-responsverhouding worden gegeven en het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (No-Observed Adverse Effect Level, NOAEL) worden bepaald.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

11. De voorkeur wordt gegeven aan ratten, hoewel andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt. Indien de in deze testmethode B.7 gespecificeerde parameters worden onderzocht bij een andere knaagdiersoort moet dit uitvoerig worden gemotiveerd. Hoewel het vanuit biologisch oogpunt aannemelijk is dat andere soorten op vergelijkbare wijze op toxische stoffen reageren als de rat, kan het gebruik van kleinere soorten leiden tot een hogere variabiliteit als gevolg van technische moeilijkheden bij het ontleden van kleinere organen. In het internationale valideringsprogramma voor de detectie van hormoonontregelaars zijn alleen ratten gebruikt. Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. De toediening moet zo snel mogelijk na het spenen beginnen maar in ieder geval voordat de dieren negen weken oud zijn. Per geslacht mag bij het begin van het onderzoek het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Als een herhaalde orale toediening wordt uitgevoerd als inleiding op een studie van langere duur, moeten de dieren in beide studies bij voorkeur tot dezelfde stam behoren en dezelfde oorsprong hebben.

Huisvesting en voeding

12. Alle procedures moeten in overeenstemming zijn met de plaatselijke normen voor de verzorging van proefdieren. De temperatuur in de proefdierruimte moet 22 °C (± 3 °C) zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof in het voer wordt toegediend. De dieren moeten in kleine groepen van hetzelfde geslacht worden gehuisvest; dieren kunnen individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Indien de dieren in groepen in kooien worden ondergebracht, mogen per kooi niet meer dan vijf dieren worden gehuisvest.

13. Het voeder moet regelmatig op verontreinigingen worden onderzocht. Een monster van het voedsel moet worden bewaard totdat het verslag is afgerond.

Voorbereiding van de dieren

14. Gezonde jonge volwassen dieren worden willekeurig ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien worden zodanig opgesteld dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooien tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie en blijven voordat de behandeling begint minimaal vijf dagen in hun kooi om in het laboratorium te acclimatiseren.

Voorbereiding van de doses

15. De teststof kan via een maagsonde, met de voeding of met het drinkwater worden toegediend. De wijze van de orale toediening hangt af van het doel van het onderzoek en van de fysische/chemische/toxicokinetische eigenschappen van de teststof.

▼M4

16. Indien nodig wordt de teststof opgelost of gesuspendeerd in een geschikt medium. Aanbevolen wordt eerst te bezien of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/suspensie in olie (bv. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel een ander medium. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn. De stabiliteit van de teststof in het medium moet worden bepaald.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

17. Op ieder dosisniveau moeten ten minste tien dieren (vijf mannetjes en vijf vrouwtjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te euthanaseren, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden geëuthanaseerd. Er moet worden overwogen een aanvullende satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) op te nemen in de controlegroep en de groep met het hoogste dosisniveau, voor observatie van reversibiliteit, persistentie of vertraagd tot uiting komen van toxische effecten gedurende ten minste 14 dagen na de behandeling.

Dosering

18. In het algemeen moeten er ten minste drie testgroepen en één controlegroep worden gebruikt, maar als er op grond van de beoordeling van andere gegevens bij toediening van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag geen effecten worden verwacht, kan er een limiettest worden uitgevoerd. Als er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, kan een bereikbepalingonderzoek worden uitgevoerd (bij dieren van dezelfde stam en dezelfde herkomst) om de orde van grootte van de te gebruiken doses te helpen bepalen. Afgezien van de toediening van de teststof worden de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld als de dieren in de testgroepen. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden.

19. De dosisniveaus moeten worden gekozen in het licht van de bestaande gegevens over toxiciteit en (toxico)kinetica van de teststof en verwante stoffen. Het hoogste dosisniveau moet zo worden gekozen dat toxische effecten optreden, maar geen sterfte of ernstig lijden. Daarna moet een dalende reeks dosisniveaus worden gekozen teneinde een eventuele doseringsgerelateerde respons en het laagste dosisniveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (No-Observed Adverse Effect Level, NOAEL) aan te tonen. Intervallen van een factor twee of vier zijn vaak optimaal om de dalende dosisniveaus vast te stellen en het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor tien) tussen de doseringen te gebruiken.

20. Bij algemene toxiciteit (bv. verminderd lichaamsgewicht, effecten op lever, hart, longen of nieren enz.) of andere veranderingen die mogelijk geen toxische reacties zijn (bv. verminderde voedselinname, leververgroting), moeten de waargenomen effecten op immunologische, neurologische of endocriene eindpunten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd.

Limiettest

21. Als volgens de hier beschreven procedures een test wordt uitgevoerd met één dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag — of, in het geval van toediening via het voer of het drinkwater, het equivalente percentage in het voer of het drinkwater (berekend overeenkomstig het lichaamsgewicht) — en er geen waarneembare toxische effecten optreden, en deze ook niet kunnen worden verwacht op grond van gegevens betreffende chemische stoffen met verwante structuur, is het niet noodzakelijk een volledige test met drie dosisniveaus te doen. De limiettest is van toepassing, behalve wanneer vanwege de verwachte blootstelling van de mens een hoger dosisniveau nodig wordt geacht.

▼M4

Toediening van de doses

22. De dieren krijgen gedurende een periode van 28 dagen, zeven dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Indien de teststof via een maagsonde aan het dier wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. Het maximale vloeistofvolume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat: in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Behalve bij irriterende of bijtende stoffen, die normaal gesproken bij hogere concentraties hevigere effecten hebben, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er op alle dosisniveaus hetzelfde volume wordt toegediend.

23. Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Wanneer de teststof in het voer wordt toegediend, kan een constante concentratie in het voer (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Wanneer een stof met een sonde wordt toegediend, moet de dosis elke dag op een vergelijkbaar tijdstip worden toegediend en indien nodig worden aangepast om een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier te houden. Wanneer een onderzoek met herhaalde toediening als voorbereiding op een langdurig onderzoek wordt gebruikt, moet bij beide onderzoeken een vergelijkbare voeding worden gebruikt.

Waarnemingen

24. De dieren moeten 28 dagen worden geobserveerd. Dieren uit een satellietgroep die bestemd is voor vervolgwaarnemingen moeten ten minste 14 dagen zonder behandeling worden geobserveerd om de persistentie van de toxische effecten c.q. het herstel alsmede het eventuele optreden van vertraagde toxiciteit te kunnen waarnemen.

25. Algemene klinische waarnemingen moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met in achtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. De gezondheidstoestand van de dieren moet worden geregistreerd. De dieren moeten ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte.

26. Alle dieren worden eenmaal voor de eerste blootstelling nauwkeurig klinisch onderzocht (om intra-individuele vergelijking mogelijk te maken) en vervolgens ten minste eenmaal per week. Dit onderzoek moet buiten de kooi op een vaste onderzoekplaats en bij voorkeur steeds op hetzelfde moment van de dag worden uitgevoerd. De gegevens moeten zorgvuldig worden opgetekend, bij voorkeur met behulp van scoringssystemen die door het testlaboratorium expliciet zijn gedefinieerd. Er moet zo veel mogelijk worden gezorgd dat variaties in de testomstandigheden minimaal zijn en dat de waarnemers niet weten welke behandeling een gegeven dier heeft ondergaan. Tekenen waarop moet worden gelet, zijn onder meer (maar niet alleen): veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding, en onwillekeurige reacties zoals traanvorming, rechtopstaan van het haar, verandering van de pupilgrootte of een ongewoon ademhalingspatroon. Ook verandering in gang, houding en reactiviteit op vastpakken, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotiep gedrag (bijvoorbeeld overmatige lichaamsverzorging, herhaaldelijk ronddraaien) of bizar gedrag (bijvoorbeeld zelfverminking, achteruitlopen) moeten worden opgetekend (2).

27. Gedurende de vierde week van de blootstelling moet de sensorische reactiviteit op stimuli van verschillende aard (2) (bv. auditief, visueel of proprioceptief) (3)(4)(5) worden bepaald en moet een bepaling van de grijpkracht (6) en de motorische activiteit (7) plaatsvinden. Meer informatie over de procedures die kunnen worden gevolgd, is te vinden in de desbetreffende literatuur. Er kunnen evenwel ook andere dan de genoemde procedures worden toegepast.

▼M4

28. Als de studie wordt verricht bij wijze van inleidend onderzoek voor daaropvolgend subchronisch onderzoek van 90 dagen, kunnen functionele observaties in de vierde week achterwege worden gelaten. In dat geval moeten de functionele observaties in het bedoelde vervolgonderzoek plaatsvinden. Daar staat echter tegenover dat de beschikbaarheid van gegevens betreffende functionele observaties uit het onderzoek met herhaalde toediening, de keuze van de dosisniveaus voor het daaropvolgende subchronische onderzoek ten goede kan komen.

29. Bij wijze van uitzondering kunnen functionele waarnemingen ook achterwege worden gelaten bij groepen die anders tekenen van toxiciteit vertonen in een mate die aanzienlijk zou interfereren met de uitvoering van de functionele test.

30. Tijdens de necropsie kan de oestruscyclus van alle vrouwtjes worden vastgesteld (facultatief) door vaginale uitstrijkjes te nemen. Deze observaties leveren informatie op over de fase van de oestruscyclus op het moment waarop de dieren zijn gedood, en kunnen van pas komen bij de histologische evaluatie van oestrogeengevoelige weefsels (zie de richtsnoeren voor histopathologie (19)).

Lichaamsgewicht en consumptie van voer en water

31. Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet ook het waterverbruik ten minste wekelijks worden gemeten.

Hematologie

32. Aan het eind van de testperiode moeten de volgende onderzoeken worden verricht: bepaling van hematocriet en hemoglobinegehalte, telling van de erytrocyten, totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de bloedplaatjes en meting van de stollingstijd en het stollingsvermogen. Indien de teststof of de vermeende metabolieten ervan oxiderende eigenschappen hebben, of hiervan een vermoeden bestaat, moeten andere bepalingen worden uitgevoerd, zoals van de methemoglobineconcentratie en de Heinz-lichaampjes.

33. De bloedmonsters moeten worden genomen net vóór of tijdens het euthanaseren van de dieren; er moet worden genoteerd uit welk lichaamsdeel. De monsters moeten onder de juiste omstandigheden worden bewaard. Gedurende de nacht voordat zij geëuthanaseerd worden, mogen dieren geen voedsel krijgen ([1]).

Klinische biochemie

34. Om belangrijke toxische effecten op de weefsels en met name op de nieren en de lever te onderzoeken moet klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht op bloedmonsters van alle dieren, met uitzondering van de dieren die stervend zijn aangetroffen en/of zijn geëuthanaseerd vóór het beëindigen van het onderzoek. Deze monsters moeten juist vóór het euthanaseren of als onderdeel van de procedure hiervoor worden genomen. Onderzoek van plasma of serum moet omvatten: natrium, kalium, glucose, totaal cholesterol, ureum, creatinine, totaal proteïne en albumine, ten minste twee enzymen die een indicatie geven van hepatocellulaire effecten (zoals alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, alkalische fosfatase, gamma-glutamyltranspeptidase en glutamaatdehydrogenase), en galzuren. Bepaling van andere enzymen (van hepatische of andere oorsprong) en bilirubine kan onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie geven.

35. Als optie kunnen tijdens de laatste week van het onderzoek de volgende urineonderzoeken worden verricht, waarbij op regelmatige tijdstippen urinemonsters moeten worden genomen: uitzien, volume, osmolaliteit of soortelijk gewicht, pH, eiwit, glucose en bloed/bloedcellen.

([1]) Voor een aantal metingen in serum en plasma, met name voor glucose, is het aan te bevelen de nacht ervoor de dieren voedsel te onthouden. De voornaamste reden is dat de toegenomen variabiliteit die onvermijdelijk het gevolg is van niet-vasten, subtiele effecten maskeert en de interpretatie bemoeilijkt. Aan de andere kant kan het 's nachts onthouden van voedsel echter interfereren met het algemene metabolisme van de dieren en, met name in voedingsonderzoeken, de dagelijkse blootstelling aan de teststof verstoren. Als men de dieren een nacht laat vasten, moeten de klinisch-biochemische bepalingen verricht worden na de functionele observaties in week 4 van de studie.

▼M4

36. Bovendien moet worden overwogen plasma- of serummarkers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. Andere onderzoeken die moeten worden uitgevoerd als van de teststof bekend is, of vermoed wordt, dat zij de desbetreffende metabolische profielen beïnvloedt, zijn: calcium, fosfaat, triglyceriden, specifieke hormonen, en cholesterinase. Deze moeten voor chemische stoffen in bepaalde klassen of per geval geïdentificeerd worden.

37. Hoewel bij de internationale evaluatie van de endocriene eindpunten geen duidelijke voordelen van de bepaling van schildklierhormonen (T_3, T_4) en TSH konden worden aangetoond, kan het nuttig zijn monsters van serum of plasma te bewaren voor het meten van T_3, T_4 en TSH (facultatief) als er aanwijzingen zijn voor een effect op de hypofyse-schildklieras. Deze monsters kunnen worden ingevroren bij – 20 °C voor opslag. De volgende factoren kunnen van invloed zijn op de variabiliteit en de absolute concentraties van de hormoonbepalingen:

— tijdstip waarop de dieren worden gedood, vanwege de schommelingen in de hormoonconcentraties gedurende de dag;

— wijze waarop de dieren worden gedood: onnodige stress bij de dieren, waardoor de hormoonconcentraties kunnen worden beïnvloed, moet worden voorkomen;

— testkits voor hormoonbepalingen, die verschillende standaardkrommen kunnen hebben.

Histopathologisch onderzoek maakt een betrouwbaardere definitieve identificatie van stoffen met thyreoïde werking mogelijk dan bepaling van de hormoonniveaus.

38. Plasmamonsters die specifiek voor hormoonbepaling zijn bedoeld, moeten telkens op hetzelfde moment van de dag worden genomen. Het verdient aanbeveling speciale aandacht te schenken aan bepalingen van T_3-, T_4- en TSH-niveaus die het gevolg zijn van histopathologische veranderingen van de schildklier. De verschillende in de handel verkrijgbare „assay kits” kunnen verschillende numerieke waarden opleveren bij de analyse van hormoonconcentraties. Als gevolg daarvan kunnen wellicht geen prestatiecriteria op basis van uniforme historische gegevens worden gegeven. In plaats daarvan moeten de laboratoria zich inspannen om de variatiecoëfficiënten voor T_3 en T_4 lager dan 25, en voor TSH lager dan 35, te houden. Alle concentraties worden geregistreerd in ng/ml.

39. In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden moet worden overwogen de hematologische en klinisch-biochemische variabelen te bepalen, bij voorkeur bij een groep dieren die niet in de testgroepen zijn opgenomen, of anders voordat met de toediening wordt begonnen.

PATHOLOGIE

Macroscopische obductie

40. Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische obductie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Lever, nieren, bijnieren, testes, epididymides, prostaat + zaadblaasjes met coagulans afscheidende klieren als geheel, thymus, milt, hersenen en hart van alle dieren (afgezien van de dieren die stervend zijn aangetroffen en/of zijn geëuthanaseerd vóór het beëindigen van het onderzoek) moeten zo nodig ontdaan worden van aanhechtend weefsel, en ze moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Het prostaatcomplex moet voorzichtig worden ontdaan van aanhechtend weefsel om te voorkomen dat de met vloeistof gevulde zaadblaasjes lek raken. Als alternatief kunnen zaadblaasjes en prostaat na de fixatie worden ontdaan van aanhechtend weefsel en gewogen.

▼M4

41. Daarnaast kunnen facultatief twee andere weefsels worden gewogen, zo snel mogelijk na de sectie om uitdroging te voorkomen: gepaarde ovaria (nat gewicht) en uterus, inclusief cervix (richtsnoeren voor het verwijderen en prepareren van baarmoederweefsel voor gewichtsmeting zijn opgenomen in OESO TG 440 (18)).

42. Het gewicht van de schildklier (facultatief) kan na de fixatie worden bepaald. Aanhechtend weefsel moet zeer voorzichtig en pas na fixatie worden verwijderd, om beschadiging van de weefsels te voorkomen. Weefselbeschadigingen kunnen de histopathologische analyse negatief beïnvloeden.

43. De volgende weefsels moeten in een fixeermiddel worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek (zie punt 47) geschikt is: elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (representatieve delen waaronder cerebrum, cerebellum en pons), ruggenmerg, oog, maag, dunne en dikke darm (inclusief Peyerse platen), lever, nieren, bijnieren, milt, hart, thymus, schildklier, luchtpijp en longen (conserveren door opblazen met een fixatief en dan onderdompelen), geslachtsklieren (testes en ovaria), secundaire geslachtsorganen (uterus en cervix, epididymides, prostaat + zaadblaasjes met coagulans uitscheidende klieren), vagina, urineblaas, lymfeklieren [naast de meest proximale afvoerende lymfeklier moet ook een andere lymfeklier worden uitgenomen, afhankelijk van de ervaringen van het laboratorium (15)), perifere zenuwen (nervus ischiadicus of nervus tibialis), bij voorkeur dicht bij de spier, skeletspier en bot, met beenmerg (een coupe, of in plaats daarvan een direct op een objectglaasje aangebracht stukje beenmergaspiraat). Aanbevolen wordt de testes te fixeren door middel van onderdompeling in Bouin-oplossing of gemodificeerde Davidson-oplossing (16)(17). De tunica albuginea moet voorzichtig en ondiep met een naald worden ingeprikt op de beide polen van het orgaan, zodat het fixatief snel kan binnendringen. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof wordt verondersteld dat ze kunnen worden aangetast, moeten worden bewaard.

44. De volgende weefsels kunnen nuttige aanwijzingen geven voor met het endocrien systeem samenhangende effecten: geslachtsklieren (ovaria en testes), secundaire geslachtsorganen (uterus inclusief cervix, epididymides, zaadblaasjes met coagulans afscheidende klieren, dorsolaterale en ventrale prostaat), vagina, hypofyse, mannelijke borstklier, schildklier en bijnier. Er bestaat onvoldoende documentatie over veranderingen in de mannelijke borstklieren, maar deze parameter zou kan erg gevoelig kunnen zijn voor stoffen met oestrogene werking. De observatie van niet in de lijst van punt 43 opgenomen organen/weefsels is facultatief (zie aanhangsel 2).

45. In de richtsnoeren voor histopathologisch onderzoek (19) zijn nadere gegevens opgenomen over de sectie, de fixatie, het snijden van coupes en de histopathologie van endocriene weefsels.

46. In het kader van het internationale testprogramma zijn enkele aanwijzingen gevonden dat subtiele endocriene effecten van stoffen die de homeostase van geslachtshormonen in beperkte mate kunnen beïnvloeden, kunnen worden herkend aan verstoring van de synchronisatie van de oestruscyclus in verschillende weefsels, en niet zozeer door uitgesproken histopathologische veranderingen in de vrouwelijke geslachtsorganen. Hoewel dergelijke effecten niet eenduidig konden worden aangetoond, wordt aanbevolen rekening te houden met aanwijzingen voor mogelijke asynchronie van de oestruscyclus bij het interpreteren van de histopathologie van de ovaria (folliculaire, thecale en granulosacellen), uterus, cervix en vagina. Indien de door middel van vaginale uitstrijkjes vastgestelde fase van de cyclus wordt beoordeeld, kan deze ook in de vergelijking worden betrokken.

▼M4

Histopathologie

47. Bij alle dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht.

48. Elk macroscopisch waarneembaar letsel moet worden onderzocht.

49. Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

50. Voor elk dier worden apart gegevens verstrekt. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of om redenen van dierenwelzijn is geëuthanaseerd en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van de aanvang, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren met letsel, het type letsel en de ernst ervan, en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt.

51. Waar mogelijk moeten getalsmatige resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. Het gebruik van meerdere t-tests moet worden voorkomen door vergelijking van het effect over een dosisbereik. De statistische methoden moeten gedurende de opzet van het onderzoek worden gekozen.

52. Voor de kwaliteitscontrole wordt voorgesteld historische controlegegevens te verzamelen en variatiecoëfficiënten te berekenen voor numerieke gegevens, met name voor de parameters die verband houden met het opsporen van hormoonontregelaars. Deze gegevens kunnen voor vergelijkingsdoeleinden worden gebruikt wanneer daadwerkelijk uitgevoerd onderzoek wordt geëvalueerd.

Testverslag

53. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en fysisch-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens.

Medium (indien van toepassing):

— motivering voor de keuze van het medium, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren:

— gebruikte soort/stam;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, huisvesting, voeding enz.;

— gewicht van elk dier aan het begin van de test;

— motivering voor het gebruik van een ander soort dan ratten.

Testomstandigheden:

— motivering voor de keuze van de dosisniveaus;

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof, de bereiding van het voer en de bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

▼**M4**

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;

— omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

Facultatieve onderzochte eindpunten

— lijst van facultatieve onderzochte eindpunten.

Resultaten:

— lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;

— waar van toepassing, voedselverbruik en waterverbruik;

— gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosisniveau, met inbegrip van toxiciteitsverschijnselen;

— aard, ernst en duur van (al dan niet reversibele) klinische waarnemingen;

— bepalingen van de sensorische activiteit, grijpkracht en motorische activiteit;

— uitgevoerde hematologische onderzoeken en de relevante referentiewaarden;

— uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en de relevante referentiewaarden;

— lichaamsgewicht ten tijde van het euthanaseren en gegevens over het gewicht van de organen;

— obductiebevindingen;

— een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— indien beschikbaar, absorptiegegevens;

— statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten

Conclusies

▼M4

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Androgene werking: het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk androgeen hormoon (bv. testosteron) te werken.

Antiandrogene werking: het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk androgeen hormoon (bv. testosteron) te onderdrukken.

Antioestrogene werking: het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk oestrogeen hormoon (bv. 17ß-oestradiol) te onderdrukken.

Antithyreoïde werking: het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme de werking van een natuurlijk schildklierhormoon (bv. T_3) te onderdrukken.

Dosering: een algemene term die de dosis en de frequentie en de duur van de toediening omvat.

Dosis: de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht van de teststof per eenheid lichaamsgewicht van het proefdier per dag (bv. mg/kg lichaamsgewicht/dag), of als constante voedingsconcentratie.

Manifeste toxiciteit: een algemene term die duidelijke toxiciteitsverschijnselen beschrijft die optreden na de toediening van de teststof. Deze verschijnselen moeten een beoordeling van de gevaren mogelijk maken en van een zodanige aard zijn dat verwacht mag worden dat bij een hogere toegediende dosis ernstige toxische verschijnselen en waarschijnlijk sterfte optreden.

NOAEL: afkorting van „No-Observed Adverse Effect Level”, het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld. Dit is het hoogste dosisniveau waarbij nog geen aan de behandeling gebonden nadelige effecten worden vastgesteld.

Oestrogene werking is het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk oestrogeen hormoon (bv. 17ß-oestradiol) te werken.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

Thyreoïde werking: het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme als een natuurlijk schildklierhormoon (bv. T_3) te werken.

Validatie: een wetenschappelijke procedure die is ontworpen om de operationele vereisten en beperkingen van een testmethode te beschrijven en de betrouwbaarheid en relevantie ervan voor een bepaald doel aan te tonen.

▼M4

Aanhangsel 2

Aanbevolen eindpunten voor het opsporen van hormoonontregelaars met deze testmethode B.7

Verplichte eindpunten	Facultatieve eindpunten
Gewicht	
— Testes	— Eierstokken
— Epididymides	— Uterus inclusief cervix
— Bijnieren	— Schildklier
— Prostaat + zaadblaasjes met coagulans uitscheidende klieren	
Histopathologie	
— Geslachtsklieren:	— Vaginale uitstrijkjes
— Testes en	— Mannelijke borstklier
— Eierstokken	— Hypofyse
— Secundaire geslachtsorganen:	
— Epididymides,	
— Prostaat + zaadblaasje met coagulans uitscheidende klieren	
— Uterus inclusief cervix	
— Bijnieren	
— Schildklier	
— Vagina	
Hormoonmeting	
	— T_3-, T_4-niveau in bloedsomloop
	— TSH-niveau in bloedsomloop

LITERATUUR:

(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. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 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. SUBACUTE INHALATIETOXICITEIT: ONDERZOEK VAN 28 DAGEN

SAMENVATTING

Deze herziene testmethode B.8 is ontworpen om de toxiciteit van een teststof via de inhalatieweg na herhaalde blootstelling gedurende een beperkte periode (28 dagen) volledig te karakteriseren, en gegevens op te leveren voor kwantitatieve beoordelingen van de inhalatierisico's. Groepen van ten minste 5 mannelijke en 5 vrouwelijke knaagdieren worden gedurende 28 dagen 6 uur per dag blootgesteld aan a) de teststof bij drie of meer concentraties, b) gefilterde lucht (negatieve controle) en/of c) het medium (mediumcontrole). De dieren worden doorgaans vijf dagen per week blootgesteld, maar zeven dagen per week is ook toegestaan. Er worden altijd zowel mannetjes als vrouwtjes getest, maar zij kunnen bij verschillende concentratieniveaus worden blootgesteld indien bekend is dat een van beide geslachten gevoeliger is voor een bepaalde teststof. Deze methode geeft de onderzoeksleider de flexibiliteit om satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen), bronchoalveolaire lavage, neurologische tests en aanvullende klinisch-pathologische en histopathologische beoordelingen in het onderzoek op te nemen, om de toxiciteit van een teststof beter te kunnen karakteriseren.

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 412 (2009) van de OESO. Testrichtlijn 412 (TG 412), de oorspronkelijke testrichtlijn voor subacute inhalatie, werd in 1981 vastgesteld (1). Deze testmethode B.8 (die gelijkwaardig is aan de herziene versie van TG 412) is bijgewerkt om haar in overeenstemming te brengen met de stand van de wetenschap en om te voldoen aan de huidige en toekomstige regelgevingsbehoeften.

2. Met deze methode kunnen nadelige effecten na herhaalde dagelijkse blootstelling aan een teststof door inhalatie gedurende 28 dagen worden gekarakteriseerd. De gegevens uit het onderzoek van 28 dagen naar subacute inhalatietoxiciteit kunnen worden gebruikt voor kwantitatieve risicobeoordelingen (indien niet gevolgd door een onderzoek van 90 dagen naar subchronische inhalatietoxiciteit (hoofdstuk B.29 van deze bijlage)). De gegevens kunnen ook informatie opleveren over de te kiezen concentraties voor langetermijnonderzoek, zoals het onderzoek van 90 dagen naar subchronische inhalatietoxiciteit. Deze testmethode is niet specifiek bedoeld voor het testen van nanomaterialen. De in de context van deze testmethode gebruikte definities zijn opgenomen in het laatste deel van dit hoofdstuk en in leidraad GD 39 (2).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

3. Het testlaboratorium moet alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen voordat het onderzoek wordt uitgevoerd. Dit komt de kwaliteit van het onderzoek ten goede en zorgt ervoor dat het gebruik van dieren tot een minimum wordt beperkt. Voor de keuze van geschikte testconcentraties kan onder meer gebruik worden gemaakt van informatie over de identiteit, chemische structuur en fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de resultaten van eventuele in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests; de voorgenomen toepassing(en) en de potentiële blootstelling van de mens; de beschikbare (Q)SAR-gegevens en toxicologische gegevens over chemische stoffen met een verwante structuur; en aan tests op acute inhalatietoxiciteit ontleende gegevens. In het geval van verwachte of in de loop van het onderzoek waargenomen neurotoxiciteit, kan de onderzoeksleider ervoor kiezen om geschikte evaluaties op te nemen, zoals een „functional observational battery" (FOB) en meting van de motorische activiteit. Hoewel de timing van de blootstellingen ten opzichte van specifiek onderzoek een kritieke factor kan vormen, mogen deze nieuwe activiteiten niet interfereren met de basisopzet van het onderzoek.

▼M4

4. Verdunningen van bijtende of irriterende teststoffen kunnen worden getest bij concentraties die de gewenste mate van toxiciteit opleveren (zie GD 39 (2)). Bij blootstelling van dieren aan deze materialen, moeten de doelconcentraties laag genoeg zijn om geen hevige pijn en angst te veroorzaken, maar wel toereikend zijn om de concentratie/responscurve uit te breiden tot niveaus die stroken met de wetenschappelijke en regelgevingsdoelstellingen van de test. Deze concentraties moeten per geval worden gekozen, bij voorkeur op basis van een adequaat opgezet bereikbepalingonderzoek dat informatie oplevert over het kritische eindpunt, eventuele irritatiedrempelwaarden en het moment van optreden (zie de punten 11 tot en met 13). De keuze voor een bepaalde concentratie moet worden gemotiveerd.

5. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevige en voortdurende angst vertonen, moeten op humane wijze worden gedood. Stervende dieren worden op dezelfde wijze beschouwd als dieren die tijdens de test sterven. De OESO-leidraad inzake humane eindpunten (3) bevat criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

6. Er worden gezonde jonge volwassen knaagdieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Als een andere soort wordt gebruikt, moet dit worden gemotiveerd.

Voorbereiding van de dieren

7. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Op de dag waarop zij willekeurig worden ingedeeld, moeten de jonge volwassen dieren zeven tot negen weken oud zijn en een lichaamsgewicht hebben dat niet meer dan 20 % afwijkt van het gemiddelde gewicht voor elk geslacht. De dieren worden willekeurig gekozen, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren en vóór het begin van de test gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

Dierhouderij

8. De dieren moeten individueel worden onderscheiden, indien mogelijk met behulp van onderhuidse transponders, om de waarnemingen te vergemakkelijken en verwarring te voorkomen. De temperatuur van de ruimte waar de proefdieren verblijven, moet 22 ± 3 °C zijn. De relatieve vochtigheid wordt idealiter tussen 30 en 70 % gehouden, maar wanneer water als medium wordt gebruikt, zal dit niet altijd mogelijk zijn. Voor en na de blootstelling worden de dieren over het algemeen groepsgewijs in kooien ondergebracht, waarbij zij naar geslacht en concentratie worden gescheiden; het aantal dieren per kooi mag echter niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord en moet zodanig worden gekozen dat er zo min mogelijk dieren verloren gaan als gevolg van kannibalisme en gevechten. Wanneer de dieren uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan acclimatisatie voor de fixeerbuizen noodzakelijk zijn. De fixeerbuizen mogen geen onnodige lichamelijke, thermische of immobilisatiestress voor de dieren opleveren. De immobilisatie kan van invloed zijn op fysiologische eindpunten zoals de lichaamstemperatuur (hyperthermie) en/of het ademminuutvolume. Als er generieke gegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat geen significante veranderingen als gevolg van de immobilisatie optreden, is geen voorafgaande gewenning aan de fixeerbuizen noodzakelijk. Dieren die met hun hele lijf aan een aerosol worden blootgesteld, worden tijdens de blootstelling individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij het testaerosol filteren door de vacht van hun kooigenoten. Er kan gebruik worden gemaakt van gebruikelijk en gecertificeerd laboratoriumvoeder, behalve tijdens de blootstelling, met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater uit de waterleiding. Er wordt kunstlicht gebruikt met een cyclus van 12 uur licht/12 uur donker.

▼M4

Inhalatiekamers

9. Bij de keuze van de inhalatiekamer wordt rekening gehouden met de aard van de teststof en het doel van de test. Blootstelling via de neus alleen heeft de voorkeur (hieronder vallen blootstelling via de kop alleen, blootstelling via de neus alleen en blootstelling via de snuit alleen). Blootstelling via de neus alleen heeft over het algemeen de voorkeur voor studies van vloeibare of vaste aerosolen en voor dampen die kunnen condenseren tot aerosolen. Speciale doelstellingen van de studie kunnen beter worden verwezenlijkt door blootstelling van het hele lijf, maar dit moet in het studieverslag worden gemotiveerd. Om bij gebruik van een kamer voor het hele lijf te zorgen voor een stabiele atmosfeer, mag het totale „volume" van de testdieren niet meer dan 5 % van het volume van de kamer innemen. De technische principes voor blootstelling via de neus alleen en blootstelling van het hele lijf, alsook de specifieke voor- en nadelen ervan, zijn uiteengezet in GD 39 (2).

TOXICITEITSONDERZOEK

Limietconcentraties

10. Anders dan bij acuut onderzoek zijn er bij onderzoek van 28 dagen naar subacute inhalatietoxiciteit geen vastgestelde limietconcentraties. Bij het vaststellen van de maximale geteste concentratie moet rekening worden gehouden met: 1) de maximaal haalbare concentratie, 2) het niveau waaraan mensen in het ongunstigste geval zouden worden blootgesteld („worst case"), 3) de noodzaak een toereikende zuurstoftoevoer in stand te houden, en/of 4) overwegingen met het oog op dierenwelzijn. Indien geen op reële gegevens gebaseerde grenswaarden beschikbaar zijn, kunnen de limietwaarden voor acute-toxiciteitsonderzoek van Verordening (EG) nr. 1272/2008 (13) worden gebruikt (d.w.z. tot een maximale concentratie van 5 mg/l voor aerosolen, 20 mg/l voor dampen en 20 000 ppm voor gassen); zie GD 39 (2). Als het nodig is deze limietwaarden te overschrijden voor het testen van gassen of zeer vluchtige teststoffen (bv. koelmiddelen), moet dit worden gemotiveerd. De limietconcentratie moet tot onmiskenbare toxiciteit leiden zonder onnodige stress bij de dieren te veroorzaken of hun levensduur te beïnvloeden (3).

Bereikbepalingonderzoek

11. Alvorens te beginnen met het hoofdonderzoek, kan het nodig zijn een bereikbepalingonderzoek uit te voeren. Een bereikbepalingonderzoek is uitgebreider dan een verkennende test, omdat het zicht niet beperkt tot de keuze van de concentratie. De tijdens een bereikbepalingonderzoek opgedane kennis kan ervoor helpen zorgen dat het hoofdonderzoek succesvol verloopt. Een bereikbepalingonderzoek kan bijvoorbeeld technische informatie opleveren met betrekking tot analysemethoden, deeltjesgroottebepaling, het herkennen van toxische mechanismen, klinisch-pathologische en histopathologische gegevens, en schattingen van mogelijke NOAEL- en MTC-concentraties in het hoofdonderzoek. De onderzoeksleider kan ervoor kiezen het bereikbepalingonderzoek te gebruiken om de drempelwaarde voor irritatie van de luchtwegen (bv. door middel van histopathologisch onderzoek van de luchtwegen, het testen van de longfunctie, of bronchoalveolaire lavage), de hoogste concentratie die zonder onnodige stress door de dieren wordt verdragen en de parameters waarmee de toxiciteit van een teststof het best kan worden gekarakteriseerd, te bepalen.

12. Een bereikbepalingonderzoek kan één of meer concentratieniveaus omvatten. Bij elk concentratieniveau worden ten hoogste drie mannetjes en drie vrouwtjes blootgesteld. Een bereikbepalingonderzoek duurt ten minste vijf dagen en doorgaans niet langer dan veertien dagen. In het testverslag moet de keuze van de concentraties voor het hoofdonderzoek worden gemotiveerd. Het hoofdonderzoek heeft tot doel een verband tussen concentratie en respons aan te tonen op basis van wat naar verwachting het gevoeligste eindpunt zal zijn. De lage concentratie is bij voorkeur de concentratie waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld („no-observed adverse effect"), de hoge concentratie moet tot onmiskenbare toxiciteit leiden zonder onnodige stress bij de dieren te veroorzaken of hun levensduur te beïnvloeden (3).

▼M4

13. Bij het kiezen van de concentratieniveaus voor het bereikbepalingonderzoek moet met alle beschikbare informatie rekening worden gehouden, met inbegrip van structuur-activiteitrelaties en gegevens over vergelijkbare stoffen (zie punt 3). Een bereikbepalingonderzoek kan de vanuit mechanistisch oogpunt als meest gevoelig beschouwde eindpunten bevestigen of weerleggen, bv. cholinesteraseremming door organofosfaten, vorming van methemoglobine door voor erytrocyten toxische stoffen, schildklierhormonen (T_3, T_4) voor thyreotoxische stoffen, eiwit, LDH, of neutrofielen in bronchoalveolaire lavage voor onschadelijke, slecht oplosbare deeltjes of longirritatie veroorzakende aerosolen.

Hoofdonderzoek

14. Het hoofdonderzoek naar subacute toxiciteit omvat doorgaans drie concentratieniveaus en, waar nodig, parallelle negatieve controles (luchtcontroles) en/of mediumcontroles (zie punt 17). Voor de keuze van geschikte blootstellingsniveaus moet gebruik worden gemaakt van alle beschikbare gegevens, met inbegrip van de resultaten van onderzoek naar systemische toxiciteit, metabolisme en kinetiek (er moet speciaal op worden gelet dat hoge concentratieniveaus waardoor kinetische processen worden verzadigd, worden vermeden). Elke testgroep bestaat uit ten minste tien knaagdieren (vijf mannetjes en vijf vrouwtjes) die over een periode van vier weken gedurende vijf dagen per week telkens zes uur per dag aan de teststof worden blootgesteld (de totale duur van het onderzoek is 28 dagen). De dieren mogen ook zeven dagen per week worden blootgesteld (bv. bij het testen van geneesmiddelen die worden geïnhaleerd). Indien bekend is dat een van beide geslachten gevoeliger is voor een bepaalde teststof, kunnen beide geslachten bij verschillende concentratieniveaus worden blootgesteld om het verband tussen concentratie en respons nauwkeuriger te kunnen bepalen, zoals beschreven in punt 15. Als andere knaagdiersoorten dan ratten uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan de maximale blootstellingsduur worden aangepast om soortspecifieke symptomen van angst te minimaliseren. Indien een blootstellingsduur van minder dan 6 uur/dag wordt gebruikt, of er onderzoek naar blootstelling van het hele lijf met een lange tijdsduur (bv. 22 uur/dag) moet worden verricht, moet dit worden gemotiveerd (zie GD 39 (2)). Tijdens de blootstellingsperiode krijgen de dieren geen voeder, tenzij de blootstelling langer duurt dan 6 uur. Tijdens een blootstelling van het hele lijf kan de dieren water worden gegeven.

15. De gekozen doelconcentraties moeten het mogelijk maken de doelorganen te identificeren en een duidelijk verband tussen concentratie en respons aan te tonen:

— het hoge concentratieniveau moet toxische effecten veroorzaken, maar niet tot aanhoudende verschijnselen of sterfte leiden die een deugdelijke evaluatie belemmeren;

— het (de) tussenliggende concentratieniveau(s) moet(en) zodanig zijn verdeeld dat een gradatie in toxische effecten tussen de lage en hoge concentratie wordt verkregen;

— het lage concentratieniveau moet weinig of geen tekenen van toxiciteit opleveren.

Satellietonderzoek (reversibiliteitsonderzoek)

16. Een satellietonderzoek (reversibiliteitsonderzoek) kan worden gebruikt voor observatie van reversibiliteit, persistentie of vertraagd tot uiting komen van toxiciteit gedurende een geschikte periode van ten minste 14 dagen na de behandeling. Satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen) bestaan uit vijf mannetjes en vijf vrouwtjes die gelijktijdig met de proefdieren in het hoofdonderzoek worden blootgesteld. Satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen) moeten bij het hoogste concentratieniveau aan de teststof worden blootgesteld en waar nodig moeten er parallelle luchtcontroles en/of mediumcontroles zijn (zie punt 17).

▼M4

Controledieren

17. De dieren voor de parallelle negatieve controle (luchtcontrole) worden op identieke wijze behandeld als de dieren in de testgroepen, behalve dat zij worden blootgesteld aan gefilterde lucht in plaats van aan de teststof. Wanneer voor het verkrijgen van de testatmosfeer water of een andere stof wordt gebruikt, moet in plaats van een negatieve controlegroep (luchtcontrolegroep) een mediumcontrolegroep in het onderzoek worden opgenomen. Waar mogelijk moet water worden gebruikt als het medium. Wanneer water wordt gebruikt als het medium moeten de controledieren worden blootgesteld aan lucht met dezelfde relatieve luchtvochtigheid als voor de blootgestelde groepen wordt gebruikt. De keuze van een geschikt medium vindt plaats op basis van een correct uitgevoerde voorstudie of van historische gegevens. Als de toxiciteit van een medium niet goed bekend is, kan de onderzoeksleider ervoor kiezen zowel een negatieve controle (luchcontrole) als een mediumcontrole te gebruiken, maar dit wordt sterk afgeraden. Indien uit historische gegevens blijkt dat een medium niet toxisch is, is een negatieve controlegroep (luchtcontrolegroep) niet nodig, en wordt alleen een mediumcontrole gebruikt. Indien een voorstudie van een in een medium bereide teststof uitwijst dat er geen toxiciteit optreedt, volgt hieruit dat het medium bij de geteste concentratie niet toxisch is en dat deze mediumcontrole moet worden gebruikt.

BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Toediening van concentraties

18. De dieren worden aan de teststof blootgesteld in de vorm van gas, damp, aerosol of een mengsel daarvan. De te testen fysische toestand hangt af van de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, de gekozen concentratie en/of de meest waarschijnlijke fysische vorm waarin de teststof bij hantering en gebruik aanwezig is. Hygroscopische en chemisch reactieve teststoffen moeten worden getest in drogeluchtomstandigheden. Er dient op te worden gelet dat er geen explosieve concentraties optreden. Deeltjesmateriaal kan aan mechanische processen worden onderworpen om een kleinere deeltjesgrootte te verkrijgen. Nadere richtsnoeren zijn opgenomen in GD 39 (2).

Deeltjesgrootteverdeling

19. Voor alle aerosolen en voor dampen die tot aerosolen kunnen condenseren, wordt de deeltjesgrootte bepaald. Om blootstelling van alle relevante delen van de ademhalingswegen mogelijk te maken, worden aerosolen met een massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) tussen 1 en 3 μm en een geometrische standaardafwijking (σ_g) tussen 1,5 en 3,0 aanbevolen (4). Hoewel redelijkerwijs moet worden getracht deze normwaarden te halen, wordt het oordeel van een deskundige gegeven als dit niet mogelijk blijkt. Metaaldampdeeltjes kunnen bijvoorbeeld kleiner zijn dan deze normwaarde, en geladen deeltjes en vezels juist groter.

Bereiding van de teststof in een medium

20. In het ideale geval wordt de teststof zonder medium getest. Indien het noodzakelijk is een medium te gebruiken om een geschikte deeltjesgrootte en concentratie van de teststof te verkrijgen, wordt de voorkeur gegeven aan water. Wanneer een teststof wordt opgelost in een medium, moet de stabiliteit ervan worden aangetoond.

CONTROLE VAN DE BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Luchtdoorstroming in de kamer

21. Tijdens elke blootstelling wordt de luchtdoorstroming in de blootstellingskamer zorgvuldig geregeld, voortdurend gecontroleerd en ten minste elk uur geregistreerd. De realtimecontrole van de concentratie (of stabiliteit in de tijd) van de testatmosfeer is een integrale meting van alle dynamische parameters waarbij indirect alle relevante dynamische parameters voor het

▼M4

verkrijgen van de atmosfeer kunnen worden geregeld. Indien de concentratie realtime wordt gecontroleerd, kan de frequentie waarmee de luchtdoorstroming wordt gemeten, worden teruggebracht tot één meting per blootstelling per dag. Wanneer kamers voor blootstelling via de neus alleen worden gebruikt, moet er in het bijzonder op worden gelet dat de uitgeademde lucht niet opnieuw wordt ingeademd. Het zuurstofgehalte moet ten minste 19 % bedragen en het kooldioxidegehalte niet meer dan 1 %. Als er redenen zijn om aan te nemen dat deze normwaarde niet kan worden gehaald, moet de zuurstof- en kooldioxideconcentratie worden gemeten. Wanneer uit de metingen op de eerste blootstellingsdag blijkt dat de waarden voor deze gassen op het juiste niveau liggen, zijn geen verdere metingen nodig.

Temperatuur en relatieve vochtigheid in de kamer

22. De temperatuur in de kamer moet op 22 ± 3 °C worden gehouden. Voor zover mogelijk wordt, zowel bij blootstelling via de neus alleen als bij blootstelling van het hele lijf, tijdens elke blootstelling de relatieve vochtigheid in het ademhalingsgebied van de dieren doorlopend gecontroleerd en ten minste elk uur geregistreerd. De relatieve vochtigheid wordt bij voorkeur tussen 30 en 70 % gehouden, al zal dit niet altijd haalbaar (bv. wanneer mengsels op waterbasis worden getest) of meetbaar zijn vanwege interferentie tussen de teststof en de testmethode.

Teststof: nominale concentratie

23. Waar mogelijk wordt de nominale concentratie in de blootstellingskamer berekend en geregistreerd. De nominale concentratie is de massa van de gegenereerde teststof gedeeld door het totale luchtvolume dat door het inhalatiekamersysteem wordt geleid. De nominale concentratie wordt niet gebruikt om de blootstelling van de dieren te karakteriseren, maar een vergelijking tussen de nominale concentratie en de feitelijke concentratie vormt een aanwijzing voor het rendement van het testsysteem en kan bijgevolg worden gebruikt om problemen bij het genereren te ontdekken.

Teststof: feitelijke concentratie

24. De feitelijke concentratie is de concentratie van de teststof zoals bemonsterd in het ademhalingsgebied van de dieren in een inhalatiekamer. De feitelijke concentraties kunnen worden verkregen door toepassing van specifieke methoden (bv. rechtstreekse bemonstering of op adsorptie of een chemische reactie gebaseerde methoden, gevolgd door analytische karakterisering) of niet-specifieke methoden, zoals gravimetrische filteranalyse. Gravimetrische analysen zijn alleen aanvaardbaar voor aerosolen van poeders met één component of aerosolen van vloeistoffen met een geringe vluchtigheid en moeten worden ondersteund met passende specifieke karakteriseringen van de teststof voorafgaand aan de studie. De concentratie van aerosolen van poeders met meerdere componenten kan ook door middel van gravimetrische analyse worden bepaald. In dat geval zijn echter analytische gegevens vereist die aantonen dat de samenstelling van het materiaal in de lucht vergelijkbaar is met die van het uitgangsmateriaal. Als deze informatie niet beschikbaar is, kan het nodig zijn in de loop van de studie op gezette tijden een nieuwe analyse van de teststof (idealiter in de toestand in de lucht) uit te voeren. Voor geaerosoliseerde stoffen die kunnen verdampen of sublimeren, moet worden aangetoond dat met de gekozen methoden alle fasen zijn verzameld.

25. Er wordt zo mogelijk één partij van de teststof gebruikt gedurende het onderzoek, en het testmonster wordt bewaard onder omstandigheden waarbij de zuiverheid, homogeniteit en stabiliteit behouden blijven. Voor aanvang van de studie worden de teststof, met inbegrip van de zuiverheid, en indien technisch mogelijk de identiteit en de hoeveelheden van vastgestelde verontreinigingen en onzuiverheden gekarakteriseerd. Dit kan onder meer met de volgende gegevens worden aangetoond: retentietijd en relatief piekoppervlak, moleculair gewicht op basis van massaspectroscopie of gaschromatografie, of andere schattingen. Hoewel het testlaboratorium niet verantwoordelijk is voor de identiteit van het testmonster, kan het raadzaam zijn dat het testlaboratorium de karakterisering van de opdrachtgever ten minste in beperkte mate bevestigt (bv. kleur, fysische aard enz.).

▼M4

26. De blootstellingsatmosfeer wordt zo constant mogelijk gehouden. Een voorziening voor realtimecontrole, zoals een aerosol-fotometer voor aerosolen, of een totaal-koolwaterstofanalysator voor dampen, kunnen worden gebruikt om de stabiliteit van de blootstellingsvoorwaarden aan te tonen. De feitelijke concentratie in de kamer moet gedurende elke blootstellingsdag voor elk blootstellingsniveau ten minste 3 keer worden gemeten. Als dit vanwege de beperkte luchtdoorstroming of lage concentraties niet mogelijk is, is één monster per blootstellingsperiode aanvaardbaar. In het ideale geval wordt dit monster in dat geval gedurende de volledige blootstellingsperiode verzameld. Het verschil tussen individuele monsters van de kamerconcentratie en de gemiddelde kamerconcentratie mag bij gassen en dampen niet meer dan ± 10 % en bij vloeibare of vaste aerosolen niet meer dan ± 20 % bedragen. De equilibratietijd van de kamer (t_{95}) wordt berekend en gerapporteerd. De blootstellingsduur omvat de tijd waarin de teststof wordt gegenereerd. Hierbij wordt rekening gehouden met de equilibratietijd van de kamer (t_{95}) en de vervaltijd. In GD 39 (2) zijn richtsnoeren voor het schatten van t_{95} opgenomen.

27. Voor zeer complexe mengsels bestaande uit dampen/gassen en aerosolen (bv. verbrandingsatmosferen en teststoffen die zijn ontleend aan doelgerichte eindproducten of apparaten), kan elke fase zich in een inhalatiekamer verschillend gedragen. Daarom moet van elke fase (damp/gas en aerosol) ten minste één indicatorstof (analyt) worden gekozen, normaliter de voornaamste werkzame stof in het mengsel. Wanneer de teststof een mengsel is, wordt de analytische concentratie vermeld voor het totale mengsel, en niet slechts voor het werkzame bestanddeel of de indicatorstof (analyt). Aanvullende informatie over feitelijke concentraties is opgenomen in GD 39 (2).

Teststof: deeltjesgrootteverdeling

28. De deeltjesgrootteverdeling van aerosolen wordt voor ieder concentratieniveau ten minste wekelijks bepaald met behulp van een cascade-impactor of een alternatief instrument, zoals een aerodynamische deeltjesgroottemeter. Indien kan worden aangetoond dat de met een cascade-impactor en het alternatieve instrument verkregen resultaten gelijkwaardig zijn, mag het alternatieve instrument gedurende de hele studie worden gebruikt.

29. Parallel aan het primaire instrument wordt een tweede instrument, zoals een gravimetrisch filter of een impinger/gas bubbler gebruikt om de doeltreffendheid van de verzameling met het primaire instrument te bevestigen. De door middel van deeltjesgrootteanalyse en filteranalyse verkregen massaconcentraties moeten in redelijke mate overeenkomen (zie GD 39 (2)). Indien in een vroeg stadium van de studie de gelijkwaardigheid bij alle geteste concentraties kan worden aangetoond, zijn verdere bevestigende metingen niet nodig. Met het oog op het dierenwelzijn moeten maatregelen worden genomen om zo veel mogelijk te voorkomen dat niet-overtuigende gegevens worden verkregen waardoor herhaling van het onderzoek noodzakelijk is.

30. Voor dampen wordt de deeltjesgrootte bepaald indien de mogelijkheid bestaat dat de dampen condenseren waardoor aerosolvorming optreedt of indien in een dampatmosfeer deeltjes worden gedetecteerd waarbij gemengde fasen kunnen optreden.

WAARNEMINGEN

31. De dieren worden voor, tijdens en na de blootstellingsperiode klinisch geobserveerd. Afhankelijk van de reactie van de dieren tijdens de blootstelling kunnen frequentere observaties nodig zijn. Indien het observeren van de dieren wordt belemmerd door het gebruik van fixeerbuizen, slecht verlichte kamers voor het hele lijf, of ondoorzichtige atmosferen, moeten de dieren zorgvuldig worden geobserveerd na afloop van de blootstelling. Door de volgende dag vóór de blootstelling te observeren kan eventuele reversibiliteit of verergering van toxische effecten worden beoordeeld.

▼M4

32. Alle observaties worden geregistreerd en van elk dier wordt een apart overzicht bijgehouden. Wanneer dieren om redenen van dierenwelzijn worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

33. Bij externe observaties van de dieren in de kooien wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en gedragspatronen. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Een meting van de rectale temperatuur kan ondersteunende gegevens opleveren voor met de behandeling of opsluiting verband houdende reflectoire bradypneu of hypo-/hyperthermie. In het onderzoeksprotocol kunnen aanvullende beoordelingen worden opgenomen, zoals kinetiek, biomonitoring, longfunctie, retentie van slecht oplosbare stoffen die zich in longweefsel ophopen, en gedragsveranderingen.

LICHAAMSGEWICHT

34. Het gewicht van elk dier wordt kort voor de eerste blootstelling geregistreerd, op dag 0 en vervolgens twee keer per week (bijvoorbeeld op vrijdag en maandag, om het herstel gedurende een weekend zonder blootstelling aan te tonen, of volgens een tijdsinterval om de systemische toxiciteit te kunnen beoordelen), alsook op het moment waarop het dier sterft of wordt geëuthanaseerd. Indien er gedurende de eerste twee weken geen effecten optreden, kan het lichaamsgewicht van de dieren gedurende het vervolg van de studie wekelijks worden gemeten. Indien satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen) worden gebruikt, moeten de dieren in deze groepen ook gedurende de hele herstelperiode wekelijks worden gewogen. Bij de beëindiging van het onderzoek moeten alle dieren kort voordat zij worden gedood, worden gewogen om een onvertekende berekening van de verhouding tussen orgaangewichten en lichaamsgewicht mogelijk te maken.

VOEDSEL- EN WATERVERBRUIK

35. Het voedselverbruik wordt wekelijks gemeten. Het waterverbruik kan ook worden gemeten.

KLINISCHE PATHOLOGIE

36. Voor alle dieren, met inbegrip van de dieren in de controlegroepen en satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen), worden klinisch-pathologische beoordelingen uitgevoerd wanneer zij worden gedood. Het tijdsinterval tussen het einde van de blootstelling en de aftapping van het bloed moet worden geregistreerd, met name wanneer het desbetreffende eindpunt snel naar de uitgangswaarde terugkeert. Voor parameters met een korte plasmahalfwaardetijd (bv. COHb, CHE, en MetHb) is het wenselijk om na het einde van de blootstelling monsters te nemen.

37. Tabel 1 bevat een lijst van de klinisch-pathologische parameters die doorgaans voor elk toxicologisch onderzoek vereist zijn. Urineonderzoek hoeft niet routinematig te worden uitgevoerd, maar kan worden verricht wanneer dit op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit nuttig wordt geacht. De onderzoeksleider kan ervoor kiezen aanvullende parameters te beoordelen om de toxiciteit van een teststof beter te kunnen karakteriseren (bijv. cholinesterase, lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine of Heinz-lichaampjes, creatinekinase, verhouding myeloïde/erytroïde cellen, troponines, arteriële bloedgassen, lactaatdehydrogenase, sorbitoldehydrogenase, glutamaatdehydrogenase, en gamma- glutamyltranspeptidase).

▼M4

Tabel 1

Klinisch-pathologische standaardparameters

Hematologisch	
Telling van de erytrocyten	Totale telling van de leukocyten
Hematocriet	Gedifferentieerde telling van de leukocyten
Hemoglobinegehalte	Telling van de bloedplaatjes
Hemoglobinegehalte per erytrocyt	Stollingsvermogen (een van de mogelijkheden kiezen):
Gemiddeld volume van de erytrocyten	— Prothrombinetijd
Hemoglobinegehalte per volume-eenheid erytrocyten	— Stollingstijd
Reticulocyten	— Partiële thromboplastinetijd
Klinisch-chemisch	
Glucose (*)	Alanineaminotransferase
Totaal cholesterol	Aspartaataminotransferase
Triglyceriden	Alkalische
Bloedureumstikstof	fosfatase
Totaal bilirubine	Kalium
Creatinine	Natrium
Totaal eiwit	Calcium
Albumine	Fosfor
Globuline	Chloride
Urineonderzoek (facultatief)	
Voorkomen (kleur en troebelheid)	Totaal eiwit
Volume	Glucose
Soortelijk gewicht of osmolaliteit	Bloed/bloedcellen
pH	

(*) Omdat een lange vastperiode tot systematische fouten in de glucosemetingen voor de behandelde versus de controledieren kan leiden, moet de onderzoeksleider bepalen of het passend is om de dieren te laten vasten. Indien een vastperiode wordt gebruikt, moet deze zijn afgestemd op de gebruikte diersoort; voor de rat kan dit 16 uur zijn (een nacht vasten). De bepaling van het glucosegehalte in nuchtere toestand kan plaatsvinden na een nacht vasten tijdens de laatste week van de blootstelling, of na een nacht vasten voorafgaand aan de obductie (in het laatste geval gelijktijdig met de bepaling van alle andere klinisch-pathologische parameters).

38. Wanneer er aanwijzingen zijn dat afzetting en retentie primair in de onderste luchtwegen (d.w.z. de alveolen) plaatsvindt, kan bronchoalveolaire lavage de aangewezen techniek zijn voor kwantitatieve analyse van op hypothesen gebaseerde dosis-effectparameters, waarbij de nadruk ligt op alveolitis, longontsteking en fosfolipidose. Op deze manier kunnen veranderingen in de dosis-responsverhouding en het verloop in de tijd van alveolair letsel adequaat worden onderzocht. De bronchoalveolaire lavagevloeistof kan worden geanalyseerd met betrekking tot de totale en gedifferentieerde tellingen van de leukocyten, totaal eiwit, en lactaatdehydrogenase. Ook parameters die wijzen op lysosomale beschadigingen, fosfolipidose, fibrose en door irritatie of allergie veroorzaakte ontstekingen, kunnen worden overwogen; het kan hierbij onder meer gaan om de bepaling van pro-inflammatoire cytokinen/chemokinen. Bronchoalveolaire lavagemetingen vormen doorgaans een aanvulling op de resultaten van histopathologisch onderzoek, maar kunnen deze niet vervangen. In GD 39 (2) zijn richtsnoeren voor het uitvoeren van longlavage opgenomen.

▼M4

MACROPATHOLOGIE EN ORGAANGEWICHTEN

39. Op alle proefdieren, met inbegrip van de dieren die tijdens de test sterven of met het oog op het dierenwelzijn uit het onderzoek worden genomen, wordt macroscopische obductie uitgevoerd, indien mogelijk na volledig uitbloeden. Voor ieder dier moet worden geregistreerd hoeveel tijd er is verstreken tussen het einde van hun laatste blootstelling en het moment waarop zij zijn gedood. Als het niet mogelijk is onmiddellijk nadat een dood dier is aangetroffen een obductie te verrichten, wordt het dier gekoeld (niet bevroren) bij een temperatuur die laag genoeg is om de autolyse tot een minimum te beperken. De obductie wordt zo spoedig mogelijk verricht, normaliter binnen één of twee dagen. Alle met het blote oog waarneembare pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd, met bijzondere aandacht voor veranderingen in de luchtwegen.

40. Tabel 2 bevat een lijst van de organen en weefsels die tijdens de macroscopische obductie in een geschikt medium moeten worden bewaard voor histopathologisch onderzoek. Het is aan de onderzoeksleider om te beoordelen of de organen en weefsels tussen [vierkante haken] en alle andere organen en weefsels worden bewaard. De **vet** weergegeven organen moeten zo spoedig mogelijk na de sectie worden ontdaan van aanhechtend weefsel en nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen. De schildklier en epididymides moeten alleen worden gewogen indien dit nodig is, omdat bij het ontdoen van aanhechtend weefsel artefacten kunnen ontstaan die het histopathologische onderzoek kunnen belemmeren. Weefsels en organen moeten worden gefixeerd in 10 % gebufferde formaldehyde of een ander geschikt fixeermiddel zodra de obductie is verricht, en ten minste 24 tot 48 uur vóór het ontdoen van aanhangend weefsel, afhankelijk van het gebruikte fixeermiddel.

Tabel 2

Tijdens de macroscopische obductie bewaarde organen en weefsels

Bijnieren	Zaadblaasjes
Beenmerg (en/of vers aspiraat)	Ruggenmerg (cervicaal, middenthoracaal en lumbaal)
Hersenen (inclusief delen van cerebrum, cerebellum en medulla/pons)	**Milt**
[Ogen (netvlies, oogzenuw) en oogleden]	Maag
Hart	**Testes**
Nieren	**Thymus**
Larynx (3 niveaus, 1 niveau moet de steel van de epiglottis bevatten)	Schildklier
Lever	Luchtpijp (ten minste 2 niveaus, inclusief 1 lengtecoupe door de carina en 1 dwarscoupe)
Long (alle lobben op één niveau, inclusief de hoofdbronchiën)	[Urineblaas]
Lymfeklieren van de longhilus, met name bij slecht oplosbare teststoffen in deeltjesvorm. Voor grondiger onderzoek en/of studies met een immunologische focus kunnen aanvullende lymfeklieren worden overwogen, bv. uit de mediastinale, cervicale/submandibulaire en/of auriculaire streek.	Uterus
Weefsels van de nasofarynx (ten minste 4 niveaus; 1 niveau moet het nasofaryngaal kanaal en het nasofarynx-geassocieerd lymfatisch weefsel (nasal associated lymphoid tissue, NALT) omvatten.	Elk macroscopisch waarneembaar letsel
Slokdarm	
[Reukkolf]	
Ovaria	

▼M4

41. De longen worden in hun geheel verwijderd, gewogen en ingedruppeld met een geschikt fixeermiddel bij 20-30 cm waterdruk om ervoor te zorgen dat de longstructuur intact blijft (5). De coupes worden voor alle lobben op één niveau, inclusief de hoofdbronchiën, gemaakt, maar als longlavage wordt uitgevoerd, worden van de niet gespoelde lob op drie niveaus coupes gemaakt (geen seriële coupes).

42. Ten minste 4 niveaus van de weefsels van de nasofarynx worden onderzocht, waarvan er één het nasofaryngaal kanaal moet omvatten (5)(6)(7)(8)(9), om adequaat onderzoek mogelijk te maken van het plaveiselcelepitheel, overgangsepitheel (respiratoir zonder trilharen), ademhalingsepitheel (respiratoir met trilharen) en reukepitheel, alsmede het drainerend lymfatisch weefsel (NALT; (10)(11)). Er worden drie niveaus van de larynx onderzocht; een van deze niveaus moet de steel van de epiglottis omvatten (12). Er worden ten minste twee niveaus van de luchtpijp onderzocht, inclusief één lengtecoupe door de carina van de splitsing van de extrapulmonale bronchiën, en één dwarscoupe.

HISTOPATHOLOGIE

43. Alle in tabel 2 genoemde organen en weefsels wordt histopathologisch onderzocht bij de controle- en hogeconcentratiegroepen, en bij alle dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden gedood. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan de luchtwegen, doelorganen, en macroscopisch waarneembaar letsel. De organen en weefsels die in de hogeconcentratiegroep letsel vertonen, worden bij alle groepen onderzocht. De onderzoeksleider kan ervoor kiezen bij meer groepen histopathologisch onderzoek te verrichten, om een duidelijk verband tussen concentratie en respons aan te tonen. Indien van een satellietgroep (reversibiliteitsgroep) gebruik wordt gemaakt, dan wordt histopathologisch onderzoek verricht op alle weefsels en organen waar bij de behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden. Indien er bij de hogeblootstellingsgroep buitensporig veel vroegtijdige sterfte of andere problemen optreden die afbreuk doen aan de significantie van de gegevens, wordt de groep die bij de op één na hoogste concentratie is blootgesteld, histopathologisch onderzocht. Getracht moet worden om de macroscopische waarnemingen te correleren aan microscopische bevindingen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

44. Voor elk dier apart worden gegevens over lichaamsgewicht, voedselverbruik, klinische pathologie, orgaangewichten en histopathologie vermeld. Daarnaast worden de gegevens van de klinische observatie in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat specifieke toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of om redenen van dierenwelzijn is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen. Alle resultaten, zowel numerieke als incidenteel, moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen aanvaarde statistische methode mag worden gebruikt; de statistische methoden worden bij de opzet van het onderzoek gekozen.

Testverslag

45. In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen:

Proefdieren en dierhouderij:

— beschrijving van de omstandigheden van de kooi, met inbegrip van: aantal (of verandering in het aantal) dieren per kooi, strooisel, omgevingstemperatuur en relatieve vochtigheid, lichtregime en identificatie van de voeding;

▼M4

— gebruikte soort/stam en motivering voor het gebruik van een ander soort dan ratten; herkomst en historische gegevens kunnen worden vermeld, indien afkomstig van dieren die zijn blootgesteld onder vergelijkbare omstandigheden wat betreft blootstelling, huisvesting en vasten;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— randomiseringsmethode;

— beschrijving van de eventuele conditionering voorafgaand aan de test, met inbegrip van voeding, quarantaine en behandeling voor ziekte.

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen (met inbegrip van de isomeersamenstelling);

— identificatiegegevens en, indien bekend, CAS-nummer (Chemical Abstracts Service).

Medium

— motivatie voor het gebruik van het medium en voor de keuze ervan (indien een ander medium dan water wordt gebruikt);

— historische of parallelle gegevens waaruit blijkt dat het medium niet interfereert met de uitkomst van de studie.

Inhalatiekamer:

— gedetailleerde beschrijving van de inhalatiekamer, met inbegrip van de afmetingen en een schematische weergave;

— herkomst en beschrijving van de apparatuur die voor de blootstelling van dieren en het verkrijgen van de atmosfeer is gebruikt;

— apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid, de deeltjesgrootte en de feitelijke concentratie;

— herkomst van de lucht en systeem dat voor de conditionering is gebruikt;

— toegepaste methoden voor de kalibratie van de apparatuur voor het verkrijgen van een homogene testatmosfeer;

— drukverschil (positief of negatief);

— blootstellingspoorten per kamer (blootstelling via de neus alleen); locatie van de dieren in de kamer (blootstelling van het hele lijf);

— stabiliteit van de testatmosfeer;

— locatie van temperatuur- en vochtigheidssensoren en bemonstering van de testatmosfeer in de kamer;

— behandeling van de aangevoerde/geëxtraheerde lucht;

— luchtdebiet, luchtdebiet per blootstellingspoort (blootstelling via de neus alleen) of dierbelasting per kamer (blootstelling van het hele lijf);

— equilibratietijd van de kamer (t_{95});

— aantal volumeveranderingen per uur;

— meetapparaten (indien van toepassing).

Blootstellingsgegevens:

— motivering van de keuze van de doelconcentratie in de hoofdstudie;

▼**M4**

— nominale concentraties (totale massa van de in de inhalatiekamer geleide teststof, gedeeld door het door de kamer geleide luchtvolume);

— feitelijke concentraties van de in het ademhalingsgebied van de dieren verzamelde teststof; voor mengsels die heterogene fysische vormen produceren (gassen, dampen, aerosolen) kan elke vorm afzonderlijk worden geanalyseerd;

— alle luchtconcentraties worden in massa-eenheden vermeld (mg/l, mg/m^3 enz.), in plaats van in volume-eenheden (ppm, ppb enz.);

— deeltjesgrootteverdeling, massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) en geometrische standaardafwijking (σ_g), onder vermelding van de wijze waarop zij zijn berekend. De individuele deeltjesgrootteanalysen worden vermeld.

Testomstandigheden:

— details van de bereiding van de teststof, met inbegrip van details van de procedures die zijn gevolgd om de deeltjesgrootte van vaste stoffen te verlagen of oplossingen van de teststof te bereiden;

— een beschrijving (bij voorkeur met een schematische voorstelling) van de apparatuur die voor het verkrijgen van de testatmosfeer en de blootstelling van de dieren aan de testatmosfeer is gebruikt;

— details van de apparatuur die wordt gebruikt om de temperatuur in de kamer, de vochtigheid en de luchtdoorstroming in de kamer te controleren (d.w.z. ontwikkeling van een kalibratiecurve);

— details van de apparatuur die wordt gebruikt om monsters te verzamelen voor de bepaling van de kamerconcentratie en deeltjesgrootteverdeling;

— details van de toegepaste chemische analysemethode en de validering van die methode (met inbegrip van de efficiëntie van de recovery van de teststof uit het bemonsteringsmedium);

— randomiseringsmethode voor het indelen van de dieren in test- en controlegroepen;

— details van de voeder- en waterkwaliteit (waaronder aard en herkomst van het voeder en herkomst van het water);

— motivering van de keuze van de testconcentraties.

Resultaten:

— een tabel met de temperatuur, vochtigheid en luchtdoorstroming van de kamer;

— een tabel met de nominale en feitelijke concentratiegegevens van de kamer;

— een tabel met de deeltjesgroottegegevens met inbegrip van gegevens over de verzameling van het analytisch monster, de deeltjesgrootteverdeling en de berekening van de MMAD en σ_g;

— een tabel met gegevens over de respons en het concentratieniveau voor elk dier (bv. dieren met toxiciteitsverschijnselen, met inbegrip van sterfte, en de aard, hevigheid, tijdstip van aanvang en duur van de effecten);

▼M4

— een tabel met het gewicht van elk dier;

— een tabel met het voedselverbruik;

— een tabel met klinisch-pathologische gegevens;

— voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar;

— een tabel met eventuele andere gemeten parameters.

Bespreking en interpretatie van de resultaten:

— speciale aandacht wordt besteed aan de beschrijving van de methoden die zijn toegepast om te voldoen aan de criteria van deze testmethode, bv. de limietconcentratie of de deeltjesgrootte;

— er wordt aandacht besteed aan de inhaleerbaarheid van deeltjes in het licht van de algemene bevindingen, in het bijzonder als niet aan de deeltjesgroottecriteria kan worden voldaan;

— in de algehele beoordeling van de studie wordt aandacht besteed aan de consistentie van de methoden die voor de bepalingen van de nominale en feitelijke concentratie zijn toegepast, alsmede aan het verband tussen de feitelijke en de nominale concentratie;

— er wordt aandacht besteed aan de waarschijnlijke doodsoorzaak en overheersende werking (systemisch of plaatselijk);

— er wordt een toelichting gegeven als dieren op humane wijze moesten worden gedood omdat zij pijn hadden of tekenen van hevige en voortdurende angst vertoonden, op basis van de criteria in de OESO-leidraad voor humane eindpunten (3);

— het doelorgaan (de doelorganen) moet (moeten) worden aangegeven;

— het NOAEL en LOAEL moet worden bepaald.

LITERATUUR:

(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, pp. 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. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

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

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

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

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

(13) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006 (PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1).

▼**M4**

Aanhangsel 1

DEFINITIE

Teststof:	iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze testmethode wordt getest.

▼B

B.9. **TOXICITEIT (DERMAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proef leven, wordt necropsie verricht.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Voorbereidingen**

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef voorkomen. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze voor de behandeling ingedeeld bij testgroepen en controlegroepen. Kort voor de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt; het haar kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur voor de proef worden gedaan. Gewoonlijk zal het dier ongeveer om de week opnieuw moeten worden geknipt of geschoren. Bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij het bepalen van de oppervlakte die moet worden onthaard en de afmetingen van de aan te brengen bedekking moet rekening worden gehouden met het gewicht van het dier. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. De teststof wordt gedurende 5 tot 7 dagen per week dagelijks aangebracht.

1.6.2. **Proefomstandigheden**

1.6.2.1. *Proefdieren*

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten, konijnen of cavia's. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzaak hiervoor moet worden aangetoond.

▼B

Bij het begin van de studie mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

1.6.2.2. *Aantal en geslacht*

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) met een gezonde huid worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van tien controledieren (vijf per geslacht) gebruikt.

1.6.2.3. *Dosisniveau*

Ten minste drie dosisniveaus, met een controlegroep of een mediumcontrolegroep, indien een medium wordt gebruikt, zijn vereist. De expositieduur moet ten minste 6 uur per dag bedragen. De teststof moet iedere dag op ongeveer dezelfde tijd worden aangebracht; op vastgestelde tijden (iedere week of twee keer per week) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren in de proefgroep worden behandeld. Indien een medium is gebruikt om het doseren te vergemakkelijken moet aan de mediumcontrolegroep op dezelfde wijze als aan de testgroep een dosis van het medium worden toegediend en deze dosis moet even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau van de teststof moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste dosis en in de tussengroepen, alsmede in de controlegroepen, mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien toediening van de teststof tot ernstige huidirritatie leidt, moeten de concentraties worden verlaagd, wat vermindering of ontbreken van andere toxische effecten bij het hoge dosisniveau tot gevolg kan hebben. Indien de huid ernstig is beschadigd, kan het zelfs noodzakelijk zijn de studie te beëindigen en een nieuwe studie met lagere concentraties te beginnen.

1.6.2.4. *Limiettest*

Indien bij een verkennende proef geen toxische effecten optreden bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg, of een hoger niveau dat verband houdt met het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, is het wellicht niet noodzakelijk om verdere proeven te nemen.

1.6.2.5. *Observatieperiode*

De proefdieren moeten dagelijks worden onderzocht op tekenen van toxiciteit. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop toxiciteitsverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden opgetekend.

▼B

1.6.3. **Uitvoering**

De dieren moeten afzonderlijk in kooien worden gehuisvest. De dieren worden gedurende een periode van 28 dagen, zo mogelijk 7 dagen per week, met de teststof behandeld. Dieren in eventuele satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. De blootstellingstijd moet 6 uur per dag bedragen.

De teststof moet gelijkmatig worden aangebracht over een oppervlakte van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen kan de te bedekken oppervlakte kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de blootstellingstijd door middel van poreus gaasverband en niet-irriterend plakband in contact met de huid worden gehouden. Het testgedeelte van de huid moet op geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof via de mond opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren. Als alternatief kan een „beschermende halskraag” worden gebruikt.

Aan het einde van de blootstellingsperiode wordt de resterende teststof zo mogelijk met water van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten worden genoteerd met inbegrip van het tijdstip waarop deze voor het eerst optraden en de mate en de duur ervan. Bij het observeren moet aandacht worden besteed aan veranderingen van de huid, de vacht, de ogen en de slijmvliezen, alsmede ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en het centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedrag. Wekelijks moeten de dieren worden gewogen. Het is eveneens aanbevolen het voerverbruik wekelijks te meten. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat ze voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoekperiode wordt bij alle overlevende dieren in de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep), necropsie verricht. Indien stervende dieren of dieren met hevige nood/ongemak of pijn worden aangetroffen, moeten deze worden verwijderd en op een humane manier worden gedood; bij hen wordt eveneens necropsie verricht.

Na afloop van de studie moeten bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroepen, de volgende onderzoekingen worden uitgevoerd:

1) Hematologie waarbij ten minste bepaling van hematocriet en hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van stollingsvermogen.

2) Klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de lever- en nierfunctie: serum alanineaminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase (SGPT)), serum aspartaataminotransferase (vroegere benaming: serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase (SGOT)), ureum, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumeiwit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met: calcium, fosfor chloride, natrium, kalium, glucosegehalte bij nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit.

▼B

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

1.6.4. **Macroscopische necropsie**

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Zo spoedig mogelijk na sectie moeten ten minste lever, nieren, bijnieren en testes nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Organen en weefsels (de normale en de behandelde huid, lever, nieren, milt, testes, bijnieren, hart en alle organen die macroscopisch waarneembare beschadigingen of veranderingen in omvang vertonen moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek.

1.6.5. **Histopathologisch onderzoek**

Bij de dieren in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen en bij die in de controlegroep moet histopathologisch onderzoek op de bewaarde organen en weefsels worden verricht. Organen en weefsels die bij het hoogste doseringsniveau door de teststof blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroep moet speciaal worden gelet op de organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

2. **GEGEVENS**

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek en het aantal dieren waarbij ieder type beschadiging voorkomt.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, dieet, enzovoort;

— proefomstandigheden (met inbegrip van het soort verband: occlusief of niet-occlusief);

— dosisniveaus (met het eventueel medium) en concentraties;

— waar mogelijk het hoogste dosisniveau waarbij geen effect optreedt;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

— tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt, of aangeven of dieren tot het eind van de proef bleven leven;

— toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en het verloop hiervan;

— gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;

— uitgevoerde hematologische proeven en alle resultaten;

▼B

— uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en alle resultaten;

— bevindingen bij de necropsie;

— een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. **LITERATUUR**

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

▼M7

B.10. IN-VITROTEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN IN ZOOGDIEREN

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 473 (2016) van de OESO. Zij maakt deel uit van een reeks testmethoden op het gebied van de genetische toxicologie. Er is een OESO-document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van deze testrichtlijnen (1).

De in-vitrotest op chromosoomafwijkingen is bedoeld om te bepalen welke chemische stoffen structurele chromosoomafwijkingen bij gekweekte cellen van zoogdieren veroorzaken (2) (3) (4). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen: het chromosoomtype en het chromatidetype. Polyploïdie (met inbegrip van endoreduplicatie) kan optreden in bepalingen van chromosoomafwijkingen in vitro. Hoewel aneugenen polyploïdie kunnen induceren, wijst polyploïdie alleen niet op een aneugeen potentieel en kan het ook wijzen op een verstoring van de celcyclus of op cytotoxiciteit (5). Deze test is niet bedoeld voor het meten van aneuploïdie. Voor de opsporing van aneuploïdie wordt een in-vitromicronucleustest (6) aanbevolen.

Bij de in-vitrotest op chromosoomafwijkingen kunnen culturen van permanente cellijnen of primaire celculturen van humane of knaagdierenoorsprong worden gebruikt. De gebruikte cellen moeten worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur, de stabiliteit van het karyotype (met inbegrip van het aantal chromosomen) en de frequentie van spontane chromosoomafwijkingen (7). Momenteel kunnen op basis van de beschikbare gegevens geen harde aanbevelingen worden gedaan, maar de gegevens wijzen erop dat het belangrijk is om bij de beoordeling van chemische gevaren rekening te houden met de *p53*-status, de genetische (karyotype) stabiliteit, het herstellend vermogen van het DNA en de oorsprong (knaagdier *versus* mens) van de voor de test geselecteerde cellen. De gebruikers van deze testmethode worden dan ook aangemoedigd om rekening te houden met de invloed van deze en andere celkenmerken op de prestaties van een cellijn bij het opsporen van de inductie van chromosoomafwijkingen, aangezien de kennis op dit gebied voortschrijdt.

Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt, tenzij de cellen qua metabolisme competent zijn met betrekking tot de teststoffen. Het exogene metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in vivo niet volledig nabootsen. Omstandigheden die zouden kunnen leiden tot artefactuele positieve resultaten, dat wil zeggen, chromosoombeschadiging niet veroorzaakt door directe interactie tussen de teststoffen en chromosomen, moeten worden vermeden. Zulke omstandigheden zijn onder andere veranderingen in de pH of de osmolaliteit (8) (9) (10), interactie met de bestanddelen van het medium (11) (12) of een sterke cytotoxiciteit (13) (14) (15) (16).

Deze test wordt gebruikt voor het opsporen van chromosoomafwijkingen die het gevolg kunnen zijn van clastogene gebeurtenissen. De analyse van de inductie van chromosoomafwijkingen geschiedt met behulp van cellen in de metafase. Het is dus van groot belang dat cellen het stadium van mitose bereiken, zowel in behandelde als in onbehandelde culturen. Voor gefabriceerde nanomaterialen kunnen specifieke aanpassingen van deze testmethode noodzakelijk zijn, maar deze worden in deze testmethode niet beschreven.

Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

▼M7

PRINCIPE VAN DE TEST

Culturen van menselijke cellen of andere zoogdiercellen worden blootgesteld aan de teststof met en zonder een exogene metabole activeringsbron, tenzij cellen met een toereikende metaboliseringscapaciteit worden gebruikt (zie punt 13). Op vooraf bepaalde tijdstippen na de blootstelling van de celculturen aan de teststof worden ze met een metafasestopper (bv. colcemid of colchicine) behandeld, geoogst en gekleurd en worden de cellen in de metafase microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van afwijkingen in het chromatidetype of het chromosoomtype.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Cellen

Er kan een verscheidenheid aan cellijnen (bv. ovariumcellen van de Chinese hamster (CHO), longcellen van de Chinese hamster V79, longcellen van de Chinese hamster (CHL)/IU, TK6) of primaire cellen, met inbegrip van lymfocyten uit perifeer bloed van de mens of andere zoogdieren, worden gebruikt (7). Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven. Wanneer primaire cellen worden gebruikt moet met het oog op het dierenwelzijn worden overwogen om waar mogelijk primaire cellen van menselijke oorsprong te gebruiken en te bemonsteren in overeenstemming met de ethische beginselen en regelgeving voor mensen. Menselijke lymfocyten uit perifeer bloed dienen te worden verkregen van jonge (ongeveer 18-35 jaar oud) niet-rokers zonder bekende ziekten, die voor zover bekend onlangs niet zijn blootgesteld aan genotoxische stoffen (bv. chemische stoffen, ioniserende straling) op een niveau dat de achtergrondincidentie van chromosoomafwijkingen vergroot. Dit zorgt ervoor dat de achtergrondincidentie van chromosoomafwijkingen laag en consistent is. De basisincidentie van chromosoomafwijkingen neemt toe met de leeftijd, en deze trend is bij vrouwen sterker dan bij mannen (17) (18). Indien cellen van meer dan één donor voor gebruik worden gepoold, moet het aantal donors aangegeven worden. Er moet worden aangetoond dat de cellen zich vanaf het begin van de behandeling met de teststof tot aan de bemonstering van de cellen hebben gedeeld. De celculturen worden in een fase van exponentiële celgroei (cellijnen) gehouden of worden gestimuleerd om zich te delen (primaire culturen van lymfocyten), om de cellen in verschillende stadia van de celcyclus bloot te stellen, aangezien de gevoeligheid van de verschillende celstadia voor de teststoffen mogelijk niet bekend is. De primaire cellen die met mitogene middelen moeten worden gestimuleerd om zich te delen, zijn doorgaans niet meer gesynchroniseerd tijdens de blootstelling aan de teststof (bv. menselijke lymfocyten na 48 uur mitogene stimulatie). Het gebruik van gesynchroniseerde cellen tijdens de behandeling wordt niet aangeraden, maar kan aanvaardbaar zijn, mits het naar behoren wordt gemotiveerd.

Media en cultuuromstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden voor de culturen (kweekvaten, vochtige atmosfeer van 5 % CO_2 indien passend, incubatietemperatuur van 37 °C). De cellijnen moeten geregeld worden gecontroleerd om na te gaan of het modale aantal chromosomen stabiel is en er geen besmetting met *mycoplasma* heeft plaatsgevonden (7) (19). Indien er wel een besmetting heeft plaatsgevonden of indien het modale aantal chromosomen gewijzigd is, mogen de cellen niet worden gebruikt. De normale tijd voor de celcyclus bij de in het testlaboratorium gebruikte cellijnen of primaire culturen moet worden vastgesteld en moet overeenkomen met de gepubliceerde celkenmerken (20).

Prepareren van de culturen

Cellijnen: cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de cellen in suspensies of in monolagen tot de oogsttijd exponentieel zullen blijven groeien (voor cellen die in monolagen groeien, moet bijvoorbeeld samenvloeiing worden voorkomen).

▼M7

Lymfocyten: met een stollingsremmer (bv. heparine) behandeld volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten worden gekweekt (bv. gedurende 48 uur voor menselijke lymfocyten) in aanwezigheid van een mitogeen [bv. fytohemagglutinine (PHA) voor menselijke lymfocyten] om celdeling te induceren vóór blootstelling aan de teststof.

Metabolische activering

Exogene metabole activeringssystemen moeten worden gehanteerd bij het gebruik van cellen met ontoereikende endogene metabole capaciteit. Het meest gebruikte systeem dat als standaard wordt aanbevolen, tenzij anders wordt gemotiveerd, is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren (doorgaans ratten) die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (21) (22) (23) of een combinatie van fenobarbiton en β-naftoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29). De laatste combinatie druist niet in tegen het Verdrag van Stockholm inzake persistente organische verontreinigende stoffen (30). Bovendien is aangetoond dat zij even effectief is als Aroclor 1254 voor de inducering van oxidasen met gemengde functie (24) (25) (26) (28). De S9-fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1 tot 2 % (v/v), maar mag worden verhoogd tot 10 % (v/v) in het uiteindelijke testmedium. Het gebruik van producten die de mitotische index verlagen, in het bijzonder calciumcomplex-vormende producten (31), moet worden vermeden tijdens de behandeling. De keuze van het type en de concentratie van het exogene metabole activeringssysteem dat of de metabole inductor die wordt gebruikt, kan worden beïnvloed door de klasse van de te testen chemische stof.

Teststofbereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen worden bereid en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund (zie punt 23). Vloeibare teststoffen kunnen direct aan het testsysteem worden toegevoegd en/of worden verdund vóór de behandeling van het testsysteem. Bij het testen van gassen of vluchtige teststoffen moeten geschikte aanpassingen van de standaardprotocollen worden gevolgd, zoals de behandeling in gesloten kweekvaten (32) (33) (34). Preparaten van de teststof moeten worden bereid vlak vóór de behandeling, tenzij met stabiliteitsgegevens is aangetoond dat bewaren van het preparaat aanvaardbaar is.

Testomstandigheden

Oplosmiddelen

Het oplosmiddel wordt zo gekozen dat het de oplosbaarheid van de te testen chemische stoffen vergroot zonder een negatieve invloed te hebben op het verloop van de test, bv. door veranderingen in de celgroei, aantasting van de integriteit van de teststof, reacties met kweekvaten, belemmering van het metabole activeringssysteem. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel (of kweekmedium) te overwegen. Gangbare oplosmiddelen zijn bijvoorbeeld water en dimethylsulfoxide. Organische oplosmiddelen mogen in de regel de 1 % (v/v) en waterige oplosmiddelen (fysiologisch zout of water) de 10 % (v/v) in het uiteindelijke behandelingsmedium niet overschrijden. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen worden gebruikt (bv. ethanol of aceton), moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze verenigbaar zijn met de teststof en het testsysteem, en dat zij geen genetische toxiciteit vertonen bij de gebruikte concentratie. Als die gegevens ontbreken, is het belangrijk ook onbehandelde controles mee te nemen (zie aanhangsel 1) om aan te tonen dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of clastogene effecten induceert.

Meting van celproliferatie en cytotoxiciteit en keuze van behandelingsconcentraties

Bij de bepaling van de hoogste te testen concentratie van de teststof moeten concentraties worden vermeden die kunnen leiden tot artefactuele positieve reacties, zoals reacties die bovenmatige cytotoxiciteit (zie punt 22) voortbrengen, neerslag in het cultuurmedium (zie punt 23) of uitgesproken wijzigingen in pH of osmolaliteit (zie punt 5). Indien de teststof op het ogenblik van toevoeging een

▼M7

uitgesproken wijziging in de pH van het medium veroorzaakt, kan de pH worden aangepast door het uiteindelijke behandelingsmedium te bufferen zodat artefactuele positieve reacties worden vermeden en passende kweekomstandigheden in stand worden gehouden.

Metingen van celproliferatie worden verricht om er zeker van te zijn dat een voldoende aantal behandelde cellen tijdens de test mitose hebben ondergaan en dat de behandelingen worden uitgevoerd met de passende mate van cytotoxiciteit (zie punten 18 en 22). Cytotoxiciteit dient te worden bepaald met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment met behulp van een passende indicatie van celdood en celgroei. Hoewel de evaluatie van cytotoxiciteit in een eerste test nuttig kan zijn om de in het hoofdexperiment te gebruiken concentraties beter te kunnen vaststellen, is een eerste test niet verplicht. Indien deze wel wordt uitgevoerd, mag deze de meting van cytotoxiciteit in het hoofdexperiment niet vervangen.

De relatieve populatieverdubbeling (RPD) of de relatieve toename van de celpopulatie (RICC) zijn passende methoden voor het beoordelen van cytotoxiciteit in cytogene tests (13) (15) (35) (36) (55) (zie aanhangsel 2 voor formules). In geval van een langlopende behandeling en bemonsteringstijdstippen na het begin van de behandeling langer dan 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus (d.w.z. in totaal langer dan 3 maal de lengte van een celcyclus), kan RPD mogelijk leiden tot een onderschatting van de cytotoxiciteit (37). Onder deze omstandigheden zou RICC een betere maat kunnen zijn of zou de evaluatie van de cytotoxiciteit na 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus met hulp van RPD een bruikbare schatting kunnen zijn.

Voor lymfocyten in primaire culturen is de mitotische index (MI) weliswaar een maat voor cytotoxische/cytostatische effecten, maar deze index is afhankelijk van het tijdstip na de behandeling waarop hij wordt gemeten, van het gebruikte mitogeen en van mogelijke ontregeling van de celcyclus. De MI is echter aanvaardbaar, omdat andere metingen van de cytotoxiciteit omslachtig en onpraktisch kunnen zijn en mogelijk niet geldig zijn voor de doelpopulatie van lymfocyten die groeit als gevolg van PHA-stimulatie.

Terwijl RICC en RPD voor cellijnen en MI voor primaire culturen van lymfocyten de aanbevolen cytotoxiciteitsparameters zijn, kunnen andere indicatoren (bv. celintegriteit, apoptose, necrose, celcyclus) nuttige aanvullende informatie verschaffen.

Er moeten ten minste drie testconcentraties (exclusief het oplosmiddel en positieve controles) die voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria (passende mate van cytotoxiciteit, aantal cellen enz.) worden geëvalueerd. Ongeacht het type cellen (cellijnen of primaire culturen van lymfocyten) kan bij elke geteste concentratie één behandelde cultuur worden gebruikt, maar ook duploculturen. Hoewel het gebruik van duploculturen raadzaam is, is het gebruik van één cultuur ook aanvaardbaar, mits voor één cultuur en duploculturen hetzelfde totale aantal cellen wordt gescoord. Het gebruik van één cultuur is in het bijzonder relevant wanneer meer dan 3 concentraties worden beoordeeld (zie punt 31). Voor de gegevensanalyse kunnen de resultaten verkregen in de onafhankelijke duploculturen bij een gegeven concentratie worden gepoold (38). Voor teststoffen die weinig of geen cytotoxiciteit vertonen, zijn intervallen tussen de testconcentraties van ongeveer een factor 2 tot 3 doorgaans passend. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten de geselecteerde testconcentraties een interval bestrijken van een concentratie waarbij cytotoxiciteit optreedt zoals beschreven in punt 22, tot en met concentraties waarbij er matige en geen of vrijwel geen cytotoxiciteit is. Veel teststoffen vertonen een steile concentratie-responscurve, en om gegevens bij lage en matige

▼M7

cytotoxiciteit te verkrijgen of om in detail de dosis-responsrelatie te bestuderen zullen dichter bij elkaar liggende concentraties en/of meer dan drie concentraties moeten worden gebruikt (één cultuur of duplobepalingen), in het bijzonder in situaties waarin een herhalingsexperiment vereist is (zie punt 47).

Als de maximale concentratie is gebaseerd op cytotoxiciteit, moet de hoogste concentratie zo worden gekozen dat met behulp van de aanbevolen cytotoxiciteitsparameters (d.w.z. afname van RICC en RPD voor cellijnen en verlaging van MI voor primaire culturen van lymfocyten tot 45 ± 5 % van de tegelijkertijd gemeten negatieve controle) 55 ± 5 % cytotoxiciteit wordt bereikt. Bij de interpretatie van positieve resultaten moet ervoor worden gezorgd dat deze niet alleen worden gevonden in het hogere deel van dit 55 ± 5 % cytotoxiciteitsbereik (13).

Voor slecht oplosbare teststoffen die bij lagere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens niet cytotoxisch zijn, moet de hoogste geanalyseerde concentratie troebelheid of een met het oog of met behulp van een omgekeerde microscoop aan het eind van de behandeling met de teststof zichtbaar neerslag opleveren. Zelfs indien cytotoxiciteit optreedt boven de oplosbaarheidsgrens, is het raadzaam de test uit te voeren bij slechts één concentratie die troebelheid of een zichtbaar neerslag oplevert, omdat het neerslag kan leiden tot artefactuele effecten. Bij de concentratie die neerslag oplevert, moet ervoor worden gezorgd dat het neerslag de uitvoering van de test (bv. kleuring of scoring) niet verstoort. Het kan nuttig zijn om voorafgaand aan het experiment de oplosbaarheid in het kweekmedium te bepalen.

Indien geen neerslag of beperkende cytotoxiciteit wordt waargenomen, moet de hoogste testconcentratie overeenkomen met de laagste van de volgende waarden: 10 mM, 2 mg/ml of 2 μl/ml (39) (40) (41). Wanneer de samenstelling van de teststof niet vastgesteld is, bv. in geval van een stof van onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten of biologisch materiaal (UVCB) (42), een milieu-extract enz., moet de hoogste concentratie bij het ontbreken van voldoende cytotoxiciteit mogelijk hoger zijn (bv. 5 mg/ml) om de concentratie van elk van de componenten te verhogen. Er zij echter opgemerkt dat deze eisen voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik anders kunnen zijn (43).

Controles

Voor elk oogsttijdstip dienen gelijktijdige negatieve controles (zie punt 15) in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel wordt toegediend en die verder op dezelfde manier worden behandeld als de culturen met teststof.

Gelijktijdige positieve controles zijn nodig om aan te tonen dat het laboratorium in staat is om onder de omstandigheden van het gebruikte testprotocol en de doeltreffendheid van het exogene metabole activeringssysteem, indien van toepassing, clastogenen te identificeren. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen worden gegeven in tabel 1 hieronder. Er kunnen ook alternatieve positieve controlestoffen worden gebruikt, indien dat wordt gemotiveerd. Omdat in-vitrotests op genetische toxiciteit bij zoogdiercellen voldoende gestandaardiseerd zijn, mag het gebruik van positieve controles worden beperkt tot een clastogeen waarvoor metabole activering vereist is. Mits dit gelijktijdig met de niet-geactiveerde test met dezelfde behandelingsduur plaatsvindt, zal deze ene positieve-controlerespons zowel de activiteit van het metabole activeringssysteem als de gevoeligheid van het testsysteem aantonen. Een langlopende behandeling (zonder S9) moet echter haar eigen positieve controle hebben, omdat de behandelingsduur zal afwijken van de test waarbij metabole activering wordt toegepast. Elke positieve controle moet worden gebruikt bij een of meer concentraties waarvoor een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht, om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen (d.w.z. de effecten zijn duidelijk maar de gecodeerde objectglaasjes zijn niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar), en de respons dient niet in het gedrang te komen door een mate van cytotoxiciteit die de in de testmethode gespecificeerde grenzen overschrijdt.

▼M7

Tabel 1.

Aanbevolen referentiestoffen voor het beoordelen van de bekwaamheid van laboratoria en voor het selecteren van positieve controles.

Categorie	Chemische stof	CAS RN
1. Clastogenen werkzaam zonder metabolische activering		
	Methylmethaansulfonaat	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	4-Nitrochinoline-*N*-oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. Clastogenen waarvoor metabolische activering vereist is		
	Benzo[*a*]pyreen	50-32-8
	Cyclofosfamide	50-18-0

PROCEDURE

Behandeling met teststof

Delende cellen worden zowel met als zonder metabool activeringssysteem met de teststof behandeld.

Oogsttijdstippen

Voor een gedegen evaluatie, die nodig is om een negatief resultaat vast te stellen, moet het experiment onder elk van de drie volgende omstandigheden worden verricht, met een kortlopende behandeling zowel met als zonder metabole activering en een langlopende behandeling zonder metabole activering (zie de punten 43, 44 en 45):

— Cellen worden gedurende 3-6 uur blootgesteld aan de teststof zonder metabole activering en bemonsterd op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus na het begin van de behandeling (18),

— Cellen worden gedurende 3-6 uur blootgesteld aan de teststof met metabole activering en bemonsterd op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus na het begin van de behandeling (18),

— Cellen worden onafgebroken blootgesteld zonder metabole activering tot de bemonstering op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus. Bepaalde chemische stoffen (bv. nucleosideanalogen) worden mogelijk gemakkelijker gedetecteerd door een verhouding behandeling/bemonsteringstijdstippen die langer is dan 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus (24).

Indien een van de hierboven genoemde experimentele omstandigheden tot een positieve respons leidt, hoeven een of meer van de andere behandelingsregimes mogelijk niet te worden onderzocht.

Chromosoompreparaten

De celculturen worden meestal gedurende één tot drie uur vóór het oogsten behandeld met colcemid of colchicine. Elke celcultuur wordt afzonderlijk geoogst en behandeld voor het maken van chromosoompreparaten. Dit houdt in dat de cellen een hypotone behandeling krijgen, gevolgd door fixatie en kleuring. In monolagen kunnen aan het einde van de 3-6 uur durende behandeling mitotische

▼M7

cellen (herkenbaar aan hun ronde vorm en het feit dat ze loslaten van het oppervlak) aanwezig zijn. Omdat deze mitotische cellen gemakkelijk loskomen, kunnen ze verloren gaan wanneer het medium met de teststof wordt verwijderd. Als er aanwijzingen zijn voor een aanzienlijke toename van het aantal mitotische cellen vergeleken met de controlegroepen, wat een aanwijzing is voor het waarschijnlijk plotseling stoppen van de mitose, moeten de cellen door centrifugering worden verzameld en opnieuw aan de cultuur worden toegevoegd, opdat er geen cellen die in mitose zijn, en die gevaar voor chromosoomafwijking lopen, op het oogsttijdstip verloren gaan.

Analyse

Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse op chromosoomafwijkingen onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatieprocedures vaak een gedeelte van de metafasecellen chromosomen verliest, moeten de gescoorde cellen een aantal centromeren bevatten dat gelijk is aan het modale aantal +/- 2.

Per concentratie en controle moeten minimaal 300 goed gespreide metafasen worden gescoord om te concluderen dat een teststof duidelijk negatief is (zie punt 45). De 300 cellen moeten gelijkelijk worden verdeeld over de duplobepalingen, wanneer duploculturen worden gebruikt. Wanneer één cultuur per concentratie wordt gebruikt (zie punt 21), moeten minimaal 300 goed gespreide metafasen worden gescoord in deze ene cultuur. Het scoren van 300 cellen heeft als voordeel dat het het statistisch onderscheidingsvermogen van de test vergroot en nulwaarden bovendien zelden zullen worden waargenomen (naar verwachting slechts 5 %) (44). Het aantal te scoren metafasen kan worden verlaagd wanneer hoge aantallen cellen met chromosoomafwijkingen worden waargenomen en de teststof als duidelijk positief wordt beschouwd.

Cellen met een of meer structurele chromosoomafwijkingen inclusief en exclusief hiaten moeten worden gescoord. Breuken en hiaten zijn gedefinieerd in aanhangsel 1, conform (45) (46). Afwijkingen in het chromatidetype of het chromosoomtype moeten afzonderlijk worden opgetekend en ingedeeld in subtypen (breuken, uitwisselingen). De in het laboratorium gebruikte procedures moeten ervoor zorgen dat de analyse van chromosoomafwijkingen wordt uitgevoerd door goed opgeleide scorers en zo nodig collegiaal wordt getoetst.

Hoewel de test bedoeld is om structurele chromosoomafwijkingen op te sporen, is het belangrijk dat bij waarneming van polyploïdie en endoreduplicatie ook de frequenties van deze verschijnselen worden opgetekend. (Zie punt 2).

Bekwaamheid van het laboratorium

Om voldoende ervaring met de test vast te stellen voordat deze wordt gebruikt voor routinetests, moet het laboratorium een reeks experimenten met positieve referentiestoffen die via verschillende mechanismen werken, en met verschillende negatieve controles (met verschillende oplosmiddelen/media) hebben uitgevoerd. Deze positieve en negatieve controleresponsen moeten in overeenstemming zijn met de literatuur. Dit geldt niet voor laboratoria die ervaring hebben, d.w.z. die beschikken over referentiegegevens uit het verleden zoals omschreven in punt 37.

Een selectie van positieve controlestoffen (zie tabel 1 in punt 26) moet worden onderzocht met kortlopende en langlopende behandelingen zonder metabole activering, en ook met korte behandelingen met metabole activering, teneinde bekwaamheid in het detecteren van clastogene chemische stoffen aan te tonen en de doeltreffendheid van het metabole activeringssysteem te bepalen. Er moet een bereik van concentraties van de geselecteerde chemische stoffen worden gekozen dat reproduceerbare en concentratiegerelateerde stijgingen tot boven het achtergrondniveau oplevert, om de gevoeligheid en het dynamisch bereik van het testsysteem aan te tonen.

▼M7

Controlegegevens uit het verleden

Het laboratorium stelt vast:

— een historisch bereik en historische spreiding voor de positieve controles;

— een historisch bereik en historische spreiding voor de negatieve controles (met onbehandelde controlestoffen of oplosmiddelen).

Wanneer voor het eerst gegevens worden verkregen voor een verdeling van negatieve controles uit het verleden, moeten gelijktijdige negatieve controles consistent zijn met gepubliceerde controlegegevens, indien deze bestaan. Naarmate meer gegevens uit experimenten aan de controlespreiding worden toegevoegd, dienen gelijktijdige negatieve controles idealiter binnen de controlegrens van 95 % voor die spreiding te vallen (44) (47). De databank met gegevens over negatieve controles uit het verleden van het laboratorium dient aanvankelijk te worden samengesteld op basis van minimaal 10 experimenten, maar bestaat bij voorkeur uit ten minste 20 experimenten die onder vergelijkbare testomstandigheden werden uitgevoerd. Laboratoria dienen methodes voor kwaliteitscontrole, zoals regelkaarten (bv. C-kaart of X-kaart (48)), te gebruiken om na te gaan hoe variabel hun gegevens over positieve en negatieve controles zijn en om aan te tonen dat zij de methodologie „onder controle" hebben (44). Verdere aanbevelingen voor het samenstellen en gebruiken van de gegevens uit het verleden (d.w.z. criteria voor het opnemen van gegevens in en het uitsluiten ervan uit de historische gegevens en de aanvaardbaarheidscriteria voor een gegeven experiment) zijn te vinden in de literatuur (47).

Bij eventuele wijzigingen in het experimentele protocol moet rekening worden gehouden met hun consistentie met de bestaande databanken met historische controlegegevens van het laboratorium. Eventuele grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens.

Negatieve controlegegevens moeten bestaan uit de incidentie van cellen met chromosoomafwijkingen uit één cultuur of de som van de duploculturen zoals beschreven in punt 21. Gelijktijdige negatieve controles liggen idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van de verdeling van de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (44) (47). Wanneer gegevens van gelijktijdige negatieve controles buiten de 95 %-controlegrenzen vallen, kan opneming ervan in de historische controleverdeling toch aanvaardbaar zijn, zolang deze gegevens geen extreme uitschieters zijn en er bewijs is dat het testsysteem 'onder controle' is (zie punt 37) en geen bewijs van technisch of menselijk falen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Presentatie van de resultaten

Het percentage cellen met een of meer structurele chromosoomafwijkingen moet worden geëvalueerd. Er moet een uitgesplitst overzicht worden gegeven van de afwijkingen in het chromatidetype en chromosoomtype ingedeeld in subtypen (breuken, uitwisselingen), met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controleculturen voorkomen. Hiaten worden apart opgetekend en gerapporteerd, maar meestal niet in de totale frequentie van afwijkingen opgenomen. Het percentage polyploïde cellen en/of cellen met endoreduplicatie wordt gerapporteerd wanneer dergelijke cellen worden waargenomen.

Gelijktijdige metingen van de cytotoxiciteit voor alle behandelde, negatieve en positieve controleculturen bij het (de) hoofdexperiment(en) dienen te worden geregistreerd.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden gegeven.

Aanvaardbaarheidscriteria

Aanvaarding van een test geschiedt aan de hand van de volgende criteria:

— Toevoeging van de gelijktijdige negatieve controle aan de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium zoals beschreven in punt 39 wordt aanvaardbaar geacht.

▼M7

— Gelijktijdige positieve controles (zie punt 26) moeten reacties induceren die verenigbaar zijn met de reacties in de databank met historische positieve controlegegevens en moeten een statistisch significante toename opleveren vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle.

— Er moet zijn voldaan aan de criteria voor celproliferatie in de oplosmiddelcontrole (punten 17 en 18).

— Alle drie de experimentele omstandigheden werden getest, tenzij een van de omstandigheden tot positieve resultaten leidde (zie punt 28).

— Er kan een afdoend aantal cellen en concentraties worden geanalyseerd (punten 31 en 21).

— De criteria voor de selectie van de hoogste concentratie zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 22, 23 en 24.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk positief beschouwd als in een of meer van de onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 28):

a) ten minste één van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b) de toename dosisgerelateerd is bij evaluatie met een geschikte trendtoets,

c) een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen; zie punt 39).

Wanneer aan al deze criteria is voldaan, wordt de teststof in staat geacht in gekweekte zoogdiercellen in dit testsysteem chromosoomafwijkingen te veroorzaken. Aanbevelingen voor de meest geschikte statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (49) (50) (51).

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk negatief beschouwd als in alle onderzochte experimentele omstandigheden (zie punt 28):

a) geen van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b) er geen concentratiegerelateerde toename is bij evaluatie met een geschikte trendtoets,

c) alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen; zie punt 39).

De teststof wordt dan niet niet in staat geacht in gekweekte zoogdiercellen in dit testsysteem chromosoomafwijkingen te veroorzaken.

Een duidelijk positieve of negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

Indien de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is zoals hierboven beschreven, of om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen, moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek worden beoordeeld. Het scoren van aanvullende cellen (indien van toepassing) of het uitvoeren van een herhalingsexperiment onder mogelijk aangepaste experimentele omstandigheden (bv. concentratie-intervallen, andere omstandigheden bij metabole activering (d.w.z. S9-concentratie of S9-herkomst)) kan nuttig zijn.

In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de resultaten positief of negatief zijn. De reactie op de teststof zal daarom als moeilijk te interpreteren worden beschouwd.

▼M7

Een stijging van het aantal polyploïde cellen kan erop wijzen dat de teststoffen in staat zijn mitotische processen te remmen en numerieke chromosoomafwijkingen te induceren (52). Een stijging van het aantal cellen met endoreduplicatie van chromosomen kan erop duiden dat de teststoffen in staat zijn de voortgang van de celcyclus te remmen (53) (54) (zie punt 2). De incidentie van polyploïde cellen en cellen met endoreduplicatie van chromosomen moet daarom apart worden geregistreerd.

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;

— stabiliteit van de teststof, indien bekend;

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;

— meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Oplosmiddel:

— motivering voor de keuze van het oplosmiddel;

— het percentage oplosmiddel in het uiteindelijke kweekmedium dient ook te worden vermeld.

Cellen:

— type en bron van de cellen;

— kenmerken van het karyotype en bruikbaarheid van het gebruikte celtype;

— voor cellijnen, afwezigheid van mycoplasma;

— voor cellijnen, informatie over de lengte van de celcyclus, verdubbelingstijd of proliferatie-index;

— het geslacht van de bloeddonoren, de leeftijd van en alle relevante informatie over de donor, of volledig bloed is gebruikt dan wel geïsoleerde lymfocyten, gebruikt mitogeen;

— voor cellijnen, aantal overentingen, indien beschikbaar;

— voor cellijnen, methoden om de celculturen in leven te houden;

— voor cellijnen, modaal aantal chromosomen.

▼**M7**

Testomstandigheden:

— naam van de metafasestopper, gebruikte concentratie en blootstellingsduur;

— concentratie van de teststof uitgedrukt als uiteindelijke concentratie in het kweekmedium (bv. µg of mg/ml of mM van kweekmedium);

— achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid;

— samenstelling van het medium en CO_2-concentratie, indien van toepassing, vochtigheidsgraad;

— toegevoegde concentratie (en/of volume) van het oplosmiddel en de teststof in het kweekmedium;

— incubatietemperatuur;

— incubatietijd;

— duur van de behandeling;

— oogsttijdstip na behandeling;

— celdichtheid bij het enten, indien van toepassing;

— aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem (bron van S9, methode voor de bereiding van de S9-mix, de concentratie of het volume van de S9-mix en S9 in het uiteindelijke kweekmedium, kwaliteitscontroles van S9);

— positieve en negatieve controlestoffen, uiteindelijke concentraties voor elke behandelingsomstandigheid;

— gebruikte methoden voor de bereiding van de objectglaasjes en kleuringstechniek;

— criteria voor de aanvaardbaarheid van bepalingen;

— criteria voor het scoren van afwijkingen;

— aantal geanalyseerde metafasen;

— methoden voor de meting van de cytotoxiciteit;

— eventuele aanvullende informatie die betrekking heeft op de cytotoxiciteit en gebruikte methode;

— criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;

— gebruikte methoden voor het bepalen van de pH, osmolaliteit en neerslag.

Resultaten:

— voor elke cultuur het aantal behandelde cellen en het aantal cellen dat is geoogst, wanneer cellijnen worden gebruikt;

— metingen van de cytotoxiciteit, bv. RPD, RICC, MI, eventuele andere waarnemingen;

— informatie over de lengte van de celcyclus, verdubbelingstijd of proliferatie-index in geval van cellijnen;

— tekenen van neerslag en tijdstip van de bepaling;

▼M7

— definitie voor afwijkingen, met inbegrip van hiaten;

— aantal gescoorde cellen, aantal cellen met chromosoomafwijkingen en de aard van de chromosoomafwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur, inclusief en exclusief hiaten;

— veranderingen in de ploïdie (afzonderlijk vermeld voor polyploïde cellen en cellen met endoreduplicatie van chromosomen), indien waargenomen;

— indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;

— gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (concentraties en oplosmiddelen);

— gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking en 95 %-controlegrenzen voor de verdeling, alsook het aantal gegevens;

— statistische analyses, eventuele p-waarden.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

LITERATUUR

(1) OESO (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OESO, Parijs.

(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, blz. 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, blz. 427-432.

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

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

(6) Hoofdstuk B.49 van deze bijlage: In-vitromicronucleustest bij zoogdiercellen.

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

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

(9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, blz. 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, blz. 789-886.

▼**M7**

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

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, blz. 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, blz. 191-201.

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

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

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

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

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

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

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, blz. 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, blz. 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, blz. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, blz. 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, blz. 277-290.

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

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

▼M7

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

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, blz. 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, blz. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Beschikbaar op: 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, blz. 225-8.

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

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

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

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

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, blz. 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, blz. 86-87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, blz. 141-154.

(39) OESO (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Beschikbaar op aanvraag.

(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, blz. 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, blz. 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. Beschikbaar op: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OESO (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)", Series on Testing and Assessment, nr. 198, OECD Publishing, Parijs.

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

(46) Scott, D. *et al*. (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, blz. 62-86.

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

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

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

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

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, blz. 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, blz. 29-46.

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

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

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

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype: structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype: structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Aneuploïdie: elke afwijking van het normale diploïde (of haploïde) aantal chromosomen met één chromosoom of meer dan één chromosoom, maar niet met (een) volledige reeks(en) chromosomen (polyploïdie).

Apoptose: geprogrammeerde celdood, gekenmerkt door een reeks stappen die leiden tot de afbraak van cellen in door membraan samengehouden deeltjes die vervolgens worden geëlimineerd door fagocytose of door verwijdering.

Breuk in een chromatide: discontinuïteit van één chromatide waarbij sprake is van een duidelijke fout in de uitlijning van een van de chromatiden.

Celproliferatie: toename van het aantal cellen als gevolg van mitose.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Clastogeen: chemische stof die structurele chromosoomafwijkingen veroorzaakt in celpopulaties of eukaryotische organismen.

Concentraties: verwijzen naar uiteindelijke concentraties van de teststof in het kweekmedium.

Cytotoxiciteit: Voor de bepalingen bestreken in deze testmethode met cellijnen is cytotoxiciteit gelijkgesteld aan een vermindering van de relatieve populatieverdubbeling (RPD) of relatieve toename van de celpopulatie (RICC) van de behandelde cellen vergeleken met de negatieve controle (zie punt 17 en aanhangsel 2). Voor de bepalingen bestreken in deze testmethode met primaire culturen van lymfocyten is cytotoxiciteit gelijkgesteld aan een vermindering van de mitotische index (MI) van de behandelde cellen vergeleken met de negatieve controle (zie punt 18 en aanhangsel 2).

Endoreduplicatie: een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, ... chromatiden.

Genotoxisch: een algemene term die alle typen DNA- of chromosoombeschadiging omvat, waaronder breuken, deleties, adducten, veranderingen en bindingen van nucleotiden, herschikkingen, genmutaties, chromosoomafwijkingen en aneuploïdie. Niet alle soorten genotoxische effecten leiden tot mutaties of stabiele chromosoombeschadiging.

Hiaat in een chromatide: niet-verkleurend gebied (een achromatische beschadiging) van één chromatide waarbij sprake is van een minimale fout in de uitlijning van de chromatiden.

Mitose: deling van de celkern die doorgaans wordt ingedeeld in profase, prometafase, metafase, anafase en telofase.

Mitotische index (MI): de verhouding tussen het aantal cellen in de metafase en het totale aantal cellen in een populatie; deze index geeft een indicatie van de snelheid waarmee deze populatie zich voortplant.

Mutageen: produceert een erfelijke wijziging van DNA-basepaarsequentie(s) in genen of van de structuur van chromosomen (chromosoomafwijkingen).

▼M7

Numerieke afwijking: een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte cellen.

Onbehandelde controles: culturen die geen behandeling ondergaan (d.w.z. geen teststof en geen oplosmiddel) maar gelijktijdig met en op dezelfde wijze worden verwerkt als de culturen die de teststof ontvangen.

Oplosmiddelcontrole: algemene term om de controleculturen aan te duiden die uitsluitend het oplosmiddel ontvangen dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen.

p53-status: Het proteïne p53 is betrokken bij de regulering van de celcyclus, apoptose en het herstel van het DNA. Cellen met een deficiëntie aan functioneel proteïne p53, die niet in staat zijn om in antwoord op beschadigingen van het DNA de celcyclus tegen te houden of beschadigde cellen te elimineren via apoptose of andere mechanismen (bv. inductie van DNA-herstel) die verband houden met p53-functies, zouden in theorie vatbaarder moeten zijn voor genmutaties of chromosoomafwijkingen.

Polyploïdie: afwijkingen in het aantal chromosomen in cellen of organismen waarbij (een) volledige reeks(en) van chromosomen betrokken is (zijn), in tegenstelling tot een afzonderlijk chromosoom of afzonderlijke chromosomen (aneuploïdie).

Relatieve populatieverdubbeling (RPD): de stijging van het aantal populatieverdubbelingen in aan een chemische stof blootgestelde culturen versus de stijging in niet-behandelde culturen, een ratio uitgedrukt als een percentage.

Relatieve toename van de celpopulatie (RICC): de stijging van het aantal cellen in aan een chemische stof blootgestelde culturen versus de stijging in niet-behandelde culturen, een ratio uitgedrukt als een percentage.

S9-leverfractie: supernatant van leverhomogenaat na centrifugering bij 9 000 g, d.w.z. ruw leverextract.

S9-mix: mix van de S9-leverfractie en cofactoren die nodig zijn voor de metabole enzymactiviteit.

Structurele afwijking: een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M7

Aanhangsel 2

FORMULES VOOR BEOORDELING VAN DE CYTOTOXICITEIT

Mitotische index (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Aantal mitotische cellen}}{\text{Totaal aantal gescoorde cellen}} \times 100$$

Relatieve toename van de celpopulatie (RICC) of **Relatieve populatieverdubbeling (RPD)** wordt aanbevolen, aangezien beide rekening houden met het percentage van de celpopulatie dat zich gedeeld heeft.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Toename in aantal cellen in behandelde culture}(\text{eindwaarde} - \text{beginwaarde}))}{(\text{Toename in aantallen cellen in controleculturen}(\text{eindwaarde} - \text{beginwaarde}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Aantal populatieverdubbelingen in behandelde culturen})}{(\text{Aantal populatieverdubbelingen in controleculturen})} \times 100$$

waarbij:

Populatieverdubbeling = [log (aantal cellen na behandeling ÷ aanvankelijk aantal cellen)] ÷ log 2

Voorbeeld: een RICC, of een RPD van 53 % duidt op 47 % cytotoxiciteit/cytostase en 55 % cytotoxiciteit/cytostase gemeten door MI betekent dat de werkelijke MI 45 % van de controle is.

Hoe dan ook moet het aantal cellen vóór behandeling worden gemeten, en hetzelfde zijn voor behandelde en negatieve controleculturen.

Terwijl RCC (d.w.z. aantal cellen in behandelde culturen / aantal cellen in controleculturen) in het verleden werd gebruikt als cytotoxiciteitsparameter, wordt dit niet langer aanbevolen, aangezien RCC de mate van cytotoxiciteit kan onderschatten.

In de negatieve controleculturen moet de populatieverdubbeling verenigbaar zijn met de eis cellen na behandeling te bemonsteren op een tijdstip gelijk aan ongeveer 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus, en de mitotische index moet hoog genoeg zijn om een voldoende aantal cellen in mitose te verkrijgen en op betrouwbare wijze een vermindering van 50 % te berekenen.

▼M7

B.11. TEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN IN BEENMERGCELLEN VAN ZOOGDIEREN

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 475 (2016) van de OESO. Zij maakt deel uit van een reeks testmethoden op het gebied van de genetische toxicologie. Er is een OESO-document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van deze testrichtlijnen (1).

De in-vivotest op chromosoomafwijkingen in beenmergcellen van zoogdieren is met name van belang voor de beoordeling van genotoxiciteit, omdat factoren van het in-vivometabolisme, de farmacokinetiek en de DNA-herstelprocessen actief zijn en bijdragen aan de reacties op de test, hoewel deze aspecten per soort kunnen verschillen. Een in-vivobepaling is ook geschikt om in vitro gesignaleerde genotoxiciteit nader te onderzoeken.

De in-vivotest op chromosoomafwijkingen bij zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke chemische stoffen structurele chromosoomafwijkingen bij beenmergcellen van dieren, meestal knaagdieren, veroorzaken (2) (3) (4) (5). Er zijn twee soorten structurele chromosoomafwijkingen: het chromosoomtype en het chromatidetype. Hoewel de meeste genotoxische door chemische stoffen geïnduceerde afwijkingen van het chromatidetype zijn, komt het chromosoomtype ook voor. Chromosoombeschadiging en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat deze beschadigingen en soortgelijke voorvallen, wanneer ze veranderingen in oncogenen en tumorsuppressorgenen veroorzaken, betrokken zijn bij de inductie van kanker bij de mens en bij proefdieren. Polyploïdie (met inbegrip van endoreduplicatie) kan optreden in bepalingen van chromosoomafwijkingen in vivo. Een toename van polyploïdie hoeft op zich echter niet te wijzen op een aneugeen potentieel en kan ook gewoon wijzen op een verstoring van de celcyclus of op cytotoxiciteit. Deze test is niet bedoeld voor het meten van aneuploïdie. Een in-vivomicronucleustest bij erythrocyten van zoogdieren (hoofdstuk B.12 van deze bijlage) of de in-vitromicronucleustest bij zoogdiercellen (hoofdstuk B.49 van deze bijlage) zijn respectievelijk de in-vivo- en in-vitrotests die worden aanbevolen voor de opsporing van aneuploïdie.

De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

Gewoonlijk worden in deze test knaagdieren gebruikt, maar andere soorten kunnen in sommige gevallen geschikt zijn, indien dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Het doelweefsel in deze test is het beenmerg aangezien dit een sterk doorbloed weefsel is en een populatie snel delende cellen bevat die gemakkelijk kunnen worden geïsoleerd en verwerkt. De wetenschappelijke rechtvaardiging voor het gebruik van andere soorten dan ratten en muizen moet in het verslag worden opgenomen. Als andere soorten dan knaagdieren worden gebruikt, wordt aanbevolen de meting van de chromosoomafwijkingen in beenmergcellen te integreren in een andere passende toxiciteitstest.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof(fen), of een of meer metabolieten daarvan, niet in het doelweefsel terechtkom(t)(en), is deze test mogelijk niet geschikt.

Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

▼M7

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Dieren worden aan de teststof blootgesteld via een passende wijze van blootstelling en worden op een geschikt tijdstip na de behandeling op humane wijze gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasestopper (bv. colchicine of colcemid). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de beenmergcellen gemaakt en gekleurd, en worden de cellen in de metafase geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

VERIFICATIE VAN DE BEKWAAMHEID VAN LABORATORIA

Bekwaamheidsonderzoek

Om voldoende ervaring met het uitvoeren van de bepaling vast te stellen voordat deze wordt gebruikt voor routinetests, moet het laboratorium hebben aangetoond in staat te zijn verwachte resultaten uit gepubliceerde gegevens (bv. (6)) te reproduceren voor frequenties van chromosoomafwijkingen met minimaal twee positieve controlestoffen (waaronder zwakke responsen geïnduceerd door lage doses positieve controles), zoals de stoffen vermeld in tabel 1 en met vergelijkbare medium-/oplosmiddelcontroles (zie punt 22). Bij deze experimenten moeten doses worden gebruikt die leiden tot reproduceerbare en dosisgerelateerde toenamen, en zij moeten de gevoeligheid en het dynamisch bereik van het testsysteem in het te onderzoeken weefsel (beenmerg) aantonen en gebruikmaken van de scoringmethode die binnen het laboratorium zal worden aangewend. Deze eis geldt niet voor laboratoria met ervaring, d.w.z. laboratoria die beschikken over referentiegegevens uit het verleden zoals omschreven in de punten 10-14.

Controlegegevens uit het verleden

Tijdens het bekwaamheidsonderzoek stelt het laboratorium vast:

— een bereik en verdeling van positieve controles uit het verleden, en

— een bereik en verdeling van negatieve controles uit het verleden.

Wanneer voor het eerst gegevens worden verkregen voor een verdeling van negatieve controles uit het verleden, moeten gelijktijdige negatieve controles consistent zijn met gepubliceerde controlegegevens, indien deze bestaan. Wanneer meer experimentele gegevens aan de verdeling van historische controles worden toegevoegd, moeten gelijktijdige negatieve controles idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van deze verdeling liggen. De databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium moet statistisch robuust zijn om te waarborgen dat het laboratorium de verdeling van zijn negatieve controlegegevens kan beoordelen. Uit de literatuur komt naar voren dat daarvoor minimaal 10 experimenten nodig zijn, maar dat bij voorkeur ten minste 20 experimenten worden gebruikt die onder vergelijkbare experimentele omstandigheden zijn uitgevoerd. Laboratoria moeten methoden voor kwaliteitscontrole gebruiken, zoals controlekaarten (bv. C-kaarten of X-kaarten (7)), om vast te stellen hoe variabel hun gegevens zijn en om aan te tonen dat het laboratorium de methodologie „onder controle” heeft. Verdere aanbevelingen voor het opbouwen en gebruiken van de historische gegevens (d.w.z. criteria voor het opnemen van gegevens in en het uitsluiten ervan uit de historische gegevens en de aanvaardbaarheidscriteria voor een gegeven experiment) zijn te vinden in de literatuur (8).

Wanneer het laboratorium tijdens het bekwaamheidsonderzoek (zoals beschreven in punt 9) een onvoldoende aantal experimenten voltooit om een statistisch robuuste verdeling van negatieve controles vast te stellen (zie punt 11), is het aanvaardbaar de verdeling tijdens de eerste routinetests op te bouwen. Bij deze aanpak moeten de aanbevelingen worden gevolgd die in de literatuur zijn uiteengezet (8), en de negatieve controleresultaten die in deze experimenten worden verkregen, moeten consistent blijven met gepubliceerde negatieve controlegegevens.

▼M7

Bij eventuele wijzigingen in het experimentele protocol moet rekening worden gehouden met hun implicaties voor de vraag of de resulterende gegevens consistent blijven met de databank met bestaande historische controlegegevens van het laboratorium. Alleen grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens, waarbij deskundigen bepalen welke controles afwijken van de eerdere verdeling (zie punt 11). Tijdens de hernieuwde opbouw is een volledige databank met negatieve controlegegevens mogelijk niet nodig om een echte test te mogen uitvoeren, mits het laboratorium kan aantonen dat zijn gelijktijdige negatieve controlewaarden consistent blijven met hetzij zijn eerdere databank hetzij de overeenkomstige gepubliceerde gegevens.

Negatieve controlegegevens moeten bestaan uit de incidentie van cellen met sctructurele chromosoomafwijkingen (exclusief hiaten) in elk dier. Gelijktijdige negatieve controles liggen idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van de verdeling van de verzameling historische negatieve controlegegevens van het laboratorium. Wanneer gegevens van gelijktijdige negatieve controles buiten de 95 %-controlegrenzen vallen, kan opneming ervan in de historische controleverdeling toch aanvaardbaar zijn zolang deze gegevens geen extreme uitschieters zijn en er bewijs is dat het testsysteem 'onder controle' is (zie punt 11) en er geen bewijs is van technisch of menselijk falen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Keuze van de diersoort

Er dient gebruik te worden gemaakt van gezonde jonge volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Meestal worden ratten gebruikt, maar muizen kunnen ook geschikt zijn. Een andere geschikte zoogdiersoort kan ook in aanmerking komen, mits in het verslag een wetenschappelijke motivering wordt gegeven.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden van de dieren

De temperatuur in de proefdierruimte moet voor knaagdieren 22 °C (± 3 °C) zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid idealiter 50-60 % is, dient deze minimaal 40 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % te zijn, behalve bij het reinigen van de ruimte. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof via het voer wordt toegediend. Knaagdieren moeten worden gehuisvest in kleine groepen (niet meer dan vijf dieren per kooi) van hetzelfde geslacht en dezelfde behandelingsgroep als geen agressief gedrag wordt verwacht, bij voorkeur in kooien met een stevige vloer met passende milieuverrijking. De dieren mogen uitsluitend individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is.

Voorbereiding van de dieren

Normaal gesproken worden gezonde jonge volwassen dieren gebruikt (voor knaagdieren idealiter 6-10 weken oud bij het begin van de behandeling, hoewel iets oudere dieren ook aanvaardbaar zijn) en aselect ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De afzonderlijke dieren krijgen op humane, minimaal invasieve wijze een unieke identificatie (bv. door het aanbrengen van een ring, tag, microchip of door biometrische identificatie, maar niet door het afknippen van oren of tenen) en krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Kruisverontreiniging door de positieve controle en de teststof moet worden vermeden. Bij het begin van de studie moet per geslacht het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht bedragen.

Voorbereiding van de doses

Vaste chemische teststoffen moeten worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte oplosmiddelen of media of worden vermengd met voedsel of drinkwater voordat dit aan de dieren wordt gegeven. Vloeibare chemische teststoffen kunnen

▼M7

direct worden gegeven of eerst worden verdund. Voor blootstelling via inhalatie kunnen teststoffen worden toegediend als een gas, damp of een vaste/vloeibare aerosol, naargelang van de fysisch-chemische eigenschappen ervan. Er dienen verse preparaten van de teststof te worden toegepast, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat bewaren van de preparaten aanvaardbaar is en blijkt wat de juiste bewaaromstandigheden zijn.

Oplosmiddel/medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststoffen moeten uitgesloten zijn. Als andere oplosmiddelen/media worden gebruikt dan de algemeen bekende, moet het gebruik ervan worden ondersteund met referentiegegevens die wijzen op de verenigbaarheid ervan. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel/medium te overwegen. Voorbeelden van vaak gebruikte compatibele oplosmiddelen/media zijn water, fysiologische zoutoplossing, methylcelluloseoplossing, natriumcarboxymethylcellulose-zoutoplossing, olijfolie en maïsolie. Bij het ontbreken van historische of gepubliceerde controlegegevens waaruit blijkt dat een gekozen atypisch oplosmiddel/medium geen structurele afwijkingen of andere schadelijke effecten veroorzaakt, dient een eerste onderzoek te worden uitgevoerd om vast te stellen dat de oplosmiddel/mediumcontrole aanvaardbaar is.

Controles

Positieve controles

Normaal gesproken wordt in elke test een groep dieren opgenomen die wordt behandeld met een positieve controlestof. Hiervan kan worden afgezien wanneer het testlaboratorium aantoonbare bekwaamheid heeft in het uitvoeren van de test en een bereik van historische positieve controles heeft vastgesteld. Wanneer geen gelijktijdige positieve controlegroep wordt opgenomen, moeten in elk experiment scoringcontroles (ongekleurde en ongefixeerde preparaten) worden opgenomen. Deze kunnen worden verkregen door in de scoring van de studie passende referentiemonsters op te nemen die zijn verkregen en bewaard van een apart positieve-controle-experiment dat op gezette tijden (bv. elke 6-18 maanden) wordt verricht in het laboratorium waar de test wordt uitgevoerd; bijvoorbeeld tijdens de bekwaamheidstoetsing en daarna op gezette tijden, indien nodig.

Positieve controlestoffen moeten op betrouwbare wijze leiden tot een detecteerbare stijging van de frequentie van cellen met structurele chromosoomafwijkingen ten opzichte van het spontane niveau. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn, maar de gecodeerde monsters niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn voor de scorer. Het is aanvaardbaar dat de positieve controle langs een andere weg wordt toegediend dan de teststof, met behulp van een ander behandelingsschema, en dat bemonstering op slechts één tijdstip plaatsvindt. Tevens kan, waar dat van toepassing is, het gebruik van chemische stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen staan vermeld in tabel 1.

Tabel 1

Voorbeelden van positieve controlestoffen

Chemische stof	CAS RN
Ethylmethaansulfonaat	62-50-0
Methylmethaansulfonaat	66-27-3
Ethylnitrosoureum	759-73-9
Mitomycine C	50-07-7
Cyclofosfamide (monohydraat)	50-18-0 (6055-19-2)
Triëthyleenmelamine	51-18-3

▼M7

Negatieve controles

Dieren in een negatieve controlegroep moeten op alle bemonsteringstijdstippen worden opgenomen en ook verder op dezelfde wijze worden behandeld als de behandelingsgroepen, zij het dat zij geen teststof toegediend krijgen. Indien bij de toediening van de teststof van een oplosmiddel/medium gebruik wordt gemaakt, dient dit oplosmiddel/medium aan de controlegroep toegediend te worden. Als uit historische negatieve controlegegevens op ieder bemonsteringstijdstip voor het testlaboratorium een consistente spreiding over de dieren en consistente frequenties van cellen met structurele afwijkingen blijken, is mogelijk slechts één enkele bemonstering voor de negatieve controle nodig. Wanneer voor negatieve controles één bemonstering plaatsvindt, dient deze plaats te vinden op het eerste bemonsteringstijdstip dat in de studie wordt gebruikt.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

In het algemeen is de micronucleusrespons voor mannetjes en vrouwtjes vergelijkbaar (9) en er wordt verwacht dat dit ook voor structurele chromosoomafwijkingen het geval zal zijn: de meeste studies kunnen daarom bij beide geslachten worden uitgevoerd. Gegevens waaruit blijkt dat er relevante verschillen tussen vrouwtjes en mannetjes bestaan (bv. verschillen in systemische toxiciteit, metabolisme, biologische beschikbaarheid, toxiciteit voor het beenmerg enz., met inbegrip van bv. een bereikbepalingsonderzoek), zijn een aanmoediging om beide geslachten te gebruiken. In dit geval kan het passend zijn om een onderzoek bij beide geslachten uit te voeren, bijvoorbeeld als onderdeel van een toxiciteitsonderzoek bij herhaalde toediening. Het kan passend zijn om een factoriële onderzoeksopzet te gebruiken als beide geslachten worden gebruikt. Details over de wijze waarop de gegevens bij deze onderzoeksopzet moeten worden geanalyseerd, zijn te vinden in aanhangsel 2.

De vaststelling van de groepsgrootte aan het begin van het onderzoek moet erop gericht zijn minimaal 5 analyseerbare dieren van één geslacht, of van elk geslacht als beide worden gebruikt, per groep te krijgen. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals dit bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd. Als richtsnoer voor de maximale typische behoefte aan dieren: voor een onderzoek in beenmerg op twee bemonsteringstijdstippen met drie dosisgroepen en een parallelle negatieve controlegroep, plus een positieve controlegroep (elke groep bestaande uit vijf dieren van één geslacht) zijn 45 dieren nodig.

Dosisniveaus

Als er een bereikbepalingsonderzoek wordt uitgevoerd omdat er nog geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (10). Het onderzoek moet erop gericht zijn de maximaal verdraagbare dosis (maximum tolerated dose, MTD) vast te stellen, dat wil zeggen, de hoogste dosis die zal worden verdragen zonder aanwijzingen voor onderzoeksbeperkende toxiciteit, in verhouding tot de duur van de onderzoeksperiode (bv. door het veroorzaken van gewichtsverlies of cytotoxiciteit voor het hematopoïetisch systeem, maar geen dood of aanwijzingen voor pijn, lijden of nood die humane doding noodzakelijk maken (11)).

De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert.

Chemische stoffen die verzadiging van toxicokinetische eigenschappen vertonen, of detoxificatieprocessen induceren die kunnen leiden tot een afname van de blootstelling na langlopende behandeling, kunnen uitzonderingen zijn op de doseringscriteria en moeten per geval worden beoordeeld.

Om dosisresponsinformatie te krijgen, moet een volledig onderzoek een negatieve controlegroep omvatten en minimaal drie dosisniveaus die in het algemeen een factor 2, maar niet meer dan een factor 4, uit elkaar liggen. Als in een bereikbepalingsonderzoek of op basis van bestaande gegevens geen aanwijzingen

▼M7

voor toxiciteit van de teststof worden gevonden, moet de hoogste dosis voor een enkele toediening 2000 mg/kg lichaamsgewicht zijn. Als de teststof echter wel toxiciteit veroorzaakt, moet de MTD de hoogste toegediende dosis zijn en moeten de gebruikte dosisniveaus bij voorkeur een bereik dekken van maximale tot weinig of geen toxiciteit. Wanneer toxiciteit voor het doelweefsel (beenmerg) bij alle geteste dosisniveaus wordt waargenomen, wordt verder onderzoek bij niet-toxische doses aanbevolen. Voor onderzoek dat ten doel heeft de kwantitatieve dosisresponsinformatie volledig te kenschetsen, kunnen aanvullende dosisgroepen nodig zijn. Voor bepaalde typen teststoffen (bv. geneesmiddelen voor menselijk gebruik) waarvoor specifieke eisen gelden, kunnen deze limieten verschillen.

Limiettest

Als uit doseringsbereikstudies of bestaande gegevens bij gerelateerde dierstammen blijkt dat een behandelingsregime van minstens de limietdosis (zoals hieronder beschreven) geen waarneembare toxische effecten geeft (met inbegrip van achteruitgang van de proliferatie van beenmerg of andere aanwijzingen van toxiciteit voor het doelweefsel), en als op grond van in-vitro genotoxiciteitsstudies of gegevens bij structureel verwante chemische stoffen geen genotoxiciteit wordt verwacht, dan is een volledig onderzoek met drie dosisniveaus mogelijk niet nodig, mits is aangetoond dat de teststof(fen) het doelweefsel (beenmerg) bereik(t)(en). In zulke gevallen kan één dosisniveau, gelijk aan de limietdosis, voldoende zijn. Voor een toedieningsperiode van meer dan 14 dagen is de limietdosis 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag. Voor een toedieningsperiode van 14 dagen of minder is de limietdosis 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag.

Toediening van de doses

Bij de opzet van een test moet rekening worden gehouden met de verwachte blootstellingsroute bij mensen. Daarom kunnen andere blootstellingsroutes zoals voeding, drinkwater, lokaal, subcutaan, intraveneus, oraal (via sonde), inhalatie, intratracheaal of implantatie worden gekozen, als deze onderbouwd worden. De route moet in elk geval zodanig worden gekozen dat adequate blootstelling van het (de) doelweefsel(s) is gewaarborgd. Intraperitoneale injectie wordt in het algemeen niet aanbevolen, omdat zij bij mensen geen beoogde blootstellingsroute is, en zij mag uitsluitend worden toegepast met een specifieke wetenschappelijke motivering. Als de teststof wordt vermengd met voedsel of drinkwater, met name in geval van één toediening, moet ervoor worden gezorgd dat de tijdsduur tussen de consumptie van voedsel en water en de bemonstering voldoende is om de effecten te kunnen detecteren (zie de punten 33-34). Het maximale vloeistofvolume dat via sonde of injectie per keer kan worden toegediend, hangt af van de grootte van het proefdier. Het volume mag normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter maximaal 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Hogere volumes dan dit moeten worden onderbouwd. Behalve bij irriterende of bijtende teststoffen, die normaal gesproken bij hogere concentraties hevigere effecten hebben, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er op alle dosisniveaus hetzelfde volume in verhouding tot het lichaamsgewicht wordt toegediend.

Behandelingsschema

De teststoffen worden normaal gesproken in één dosis toegediend, maar de dosis kan eventueel worden gesplitst (bv. twee of meer porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan 2-3 uur) om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. In deze omstandigheden, of wanneer de teststof wordt toegediend door inhalatie, moet het bemonsteringstijdstip worden gepland op basis van het tijdstip van de laatste dosistoediening of het einde van de blootstelling.

Er zijn voor deze test weinig gegevens over de geschiktheid van een protocol met herhaalde toediening beschikbaar. In omstandigheden waarin het wenselijk is om deze test te integreren met een toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening, moet verlies van mitotische cellen met chromosoombeschadigingen die bij

▼M7

toxische doses kunnen voorkomen, echter worden vermeden. Zo'n integratie is aanvaardbaar wanneer de hoogste dosis groter is dan of gelijk is aan de limietdosis (zie punt 29) en een dosisgroep voor de duur van de behandelingsperiode de limietdosis toegediend krijgt. De micronucleustest (testmethode B.12) moet worden beschouwd als de in-vivotest voor chromosoomafwijkingen die de voorkeur geniet wanneer integratie met andere onderzoeken gewenst is.

Beenmergmonsters worden na een dosis in één keer op twee aparte tijdstippen genomen. Voor knaagdieren ligt het eerste bemonsteringstijdstip op 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus (deze cyclus duurt normaal gesproken 12-18 uur) na de behandeling. Aangezien de voor de opname en het metabolisme van de teststof(fen) vereiste tijd en de effecten op de kinetiek van de celcyclus gevolgen kunnen hebben voor het optimale tijdstip om chromosoomafwijkingen te detecteren, verdient het aanbeveling 24 uur na het eerste bemonsteringstijdstip opnieuw te bemonsteren. Op het eerste bemonsteringstijdstip worden alle dosisgroepen behandeld en worden monsters genomen voor de analyse; op het (de) latere bemonsteringstijdstip(pen) hoeft echter alleen de hoogste dosis te worden toegediend. Indien het doseringsschema op grond van een wetenschappelijke onderbouwing meer dan één dag beslaat, moet in het algemeen één bemonsteringstijdstip op maximaal ongeveer 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus na de laatste toediening worden gebruikt.

Na de behandeling en voorafgaand aan de bemonstering, worden de dieren intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. colcemid of colchicine) en worden de dieren na een adequate pauze bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer 3-5 uur worden gewacht tot de bemonstering, en voor ratten 2-5 uur. De cellen worden uit het beenmerg gehaald, opgebold, gefixeerd en gekleurd en op chromosoomafwijkingen geanalyseerd (12).

Observaties

Algemene klinische observaties van de proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden en klinische tekenen moeten ten minste eenmaal per dag worden geregistreerd, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met inachtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. Gedurende de toedieningsperiode moeten alle dieren ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Alle dieren moeten bij aanvang van het onderzoek, tijdens onderzoeken met herhaalde toediening ten minste eenmaal per week, en bij het doden worden gewogen. In onderzoeken met een duur van ten minste één week moet het voedselverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Als de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet het waterverbruik bij elke verversing van water en ten minste wekelijks worden gemeten. Dieren die niet-letale indicatoren van excessieve toxiciteit vertonen moeten voor afloop van de testperiode op humane wijze worden gedood (11).

Blootstelling van doelweefsel

Op een of meer passende tijdstippen moet een bloedmonster worden genomen en moeten de plasmaspiegels van de teststoffen worden onderzocht om aan te tonen dat blootstelling van het beenmerg heeft plaatsgevonden, in situaties waar dit gerechtvaardigd is en waar geen andere blootstellingsgegevens bestaan (zie punt 44).

Beenmerg en chromosoompreparaten

Onmiddellijk na humane doding worden uit de dijbenen of scheenbenen van de dieren beenmergcellen verwijderd, in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De metafasecellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd met vastgestelde methoden (zie (3) (12)).

▼M7

Analyse

Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de analyse onafhankelijk gecodeerd en worden gerandomiseerd, zodat de scorer de behandelingssituatie niet kent.

Als maat voor de cytotoxiciteit wordt de mitotische index bepaald in ten minste 1000 cellen per dier voor alle behandelde dieren (ook de positieve controles), onbehandelde dieren voor de negatieve controle of dieren die medium/oplosmiddel toegediend hebben gekregen voor de negatieve controle.

Voor elk dier worden ten minste 200 metafasen geanalyseerd op structurele chromosoomafwijkingen, inclusief en exclusief hiaten (6). Als de databank met historische negatieve controlegegevens echter uitwijst dat de gemiddelde achtergrondfrequentie van structurele chromosoomafwijkingen in het testlaboratorium <1 % is, moet worden overwogen aanvullende cellen te scoren. Afwijkingen van het chromatidetype en chromosoomtype worden apart geregistreerd en ingedeeld in subtypen (breuken, uitwisselingen). De in het laboratorium gebruikte procedures moeten ervoor zorgen dat de analyse van chromosoomafwijkingen wordt uitgevoerd door goed opgeleide scorers en zo nodig collegiaal wordt getoetst. Aangezien bij de bereiding van de objectglaasjes vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, mogen de gescoorde cellen niet minder dan $2n \pm 2$ centromeren bevatten, waarin n het haploïde aantal chromosomen voor die soort is.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

Gegevens van individuele dieren moeten in tabelvorm worden gepresenteerd. De mitotische index, het aantal gescoorde metafasecellen, het aantal afwijkingen per metafasecel en het percentage cellen met een of meer structurele chromosoomafwijkingen moeten per dier worden geëvalueerd. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten, alsmede polyploïde cellen en cellen met endoreduplicatie van chromosomen worden apart geregistreerd. De frequentie van hiaten wordt geregistreerd, maar in het algemeen niet opgenomen in de analyse van de totale frequentie van structurele afwijkingen. Als er geen aanwijzingen zijn voor verschillen in reactie tussen de geslachten, kunnen de gegevens voor de statistische analyse worden gecombineerd. Gegevens over de toxiciteit en klinische tekenen bij dieren moeten eveneens worden gemeld.

Aanvaardbaarheidscriteria

Voor de aanvaardbaarheid van de test gelden de volgende criteria:

a) Toevoeging van de gegevens van gelijktijdige negatieve controles aan de databank met historische controlegegevens van het laboratorium wordt als aanvaardbaar beschouwd (zie punten 11-14);

b) De gelijktijdige positieve controles of scoringcontroles moeten responsen induceren die verenigbaar zijn met de responsen in de databank met historische positieve controlegegevens en moeten een statistisch significante stijging opleveren vergeleken met de negatieve controle (zie de punten 20-21);

c) Het toepasselijke aantal doses en cellen is geanalyseerd;

d) De criteria voor de selectie van de hoogste dosis zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 25-28.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als:

▼M7

a) minstens één van de behandelingsgroepen een statistisch significante stijging van de frequentie van cellen met structurele chromosoomafwijkingen (exclusief hiaten) vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b) deze stijging dosisgerelateerd is op ten minste één bemonsteringstijdstip bij evaluatie met een geschikte trendtoets, en

c) een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen).

Indien op een bepaald bemonsteringstijdstip alleen de hoogste dosis wordt onderzocht, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als er een statistisch significante stijging vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle is en de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen). Aanbevelingen voor de passende statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (13). Wanneer een dosisresponsanalyse wordt uitgevoerd, moeten ten minste drie behandelde dosisgroepen worden geanalyseerd. De statistische toetsen moeten het dier als de proefeenheid gebruiken. Positieve resultaten in de test op chromosoomafwijkingen geven aan dat een teststof structurele chromosoomafwijkingen in het beenmerg van de geteste soort induceert.

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als in alle onderzochte experimentele omstandigheden:

a) geen van de behandelingsgroepen een statistisch significante stijging in de frequentie van cellen met structurele chromosoomafwijkingen (exclusief hiaten) vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b) er op geen enkel bemonsteringstijdstip een dosisgerelateerde stijging is bij evaluatie met een geschikte trendtoets,

c) alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen), en

d) het beenmerg is blootgesteld aan de teststof(fen).

Aanbevelingen voor de meest passende statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (13). Bewijs van blootstelling van het beenmerg aan een teststof kan zijn achteruitgang van de mitotische index of meting van het plasma of bloedspiegels van de teststof(fen). In geval van intraveneuze toediening is geen bewijs van blootstelling nodig. Als alternatief kunnen ADME-gegevens verkregen in een onafhankelijke studie met dezelfde toedieningsweg en dezelfde soort worden gebruikt om blootstelling van het beenmerg aan te tonen. Negatieve resultaten geven aan dat de teststof onder de testomstandigheden geen structurele chromosoomafwijkingen in het beenmerg van de onderzochte soort induceert.

Een duidelijk positieve of duidelijk negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

Indien de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is en om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen (bv. een zwakke of zeer lichte toename), moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek van de bestaande voltooide experimenten worden beoordeeld. In sommige gevallen kan het nuttig zijn meer cellen te analyseren of een herhalingsexperiment onder aangepaste experimentele omstandigheden uit te voeren.

▼M7

In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de teststof positieve of negatieve resultaten oplevert, en zal de studie daarom als moeilijk te interpreteren worden beschouwd.

De frequenties van polyploïde metafasen en metafasen met endoreduplicatie ten opzichte van het totale aantal metafasen moeten apart worden geregistreerd. Een stijging van het aantal polyploïde cellen en/of cellen met endoreduplicatie kan erop wijzen dat de teststof in staat is mitotische processen of de voortgang van de celcyclus te remmen (zie punt 3).

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Samenvatting

Teststof:

— bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;

— stabiliteit van de teststof, indien bekend.

Stof die uit één component bestaat:

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Teststofbereiding:

— motivering voor de keuze van het medium;

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend;

— bereiding van toedieningsvormen voor voer, drinkwater of inhalatie;

— analytische bepalingen op toedieningsvormen (zoals stabiliteit, homogeniteit, nominale concentraties), indien deze zijn uitgevoerd.

Proefdieren:

— gebruikte diersoort/stam en motivering van het gebruik;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, huisvesting, voeding enz.;

— methode om de dieren uniek te identificeren;

— voor kortlopende onderzoeken: gewicht van elk dier aan het begin en het einde van de test; voor onderzoeken van meer dan één week: lichaamsgewicht van elk dier tijdens het onderzoek en voedselverbruik. Het bereik, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep moet worden opgenomen.

▼**M7**

Testomstandigheden:

— positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;

— gegevens uit het oriënterende onderzoek, indien dit is uitgevoerd;

— achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;

— gedetailleerde gegevens over de bereiding van de teststof;

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;

— achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg en -duur;

— methoden om na te gaan of de teststof(fen) in de grote bloedsomloop of het beenmerg is (zijn) terechtgekomen;

— feitelijke dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag) berekend op basis van de teststofconcentratie in voer/drinkwater (ppm) en consumptie, indien van toepassing;

— gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;

— wijze van doden;

— wijze van pijnbestrijding (indien gebruikt);

— gedetailleerde omschrijving van behandeling en bemonsteringsschema's en motivering van de keuzes;

— methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;

— methoden voor de meting van de toxiciteit;

— naam van de metafasestopper, gebruikte concentratie, dosis en tijd van toediening vóór de bemonstering;

— procedures voor het isoleren en preserveren van monsters;

— criteria voor het scoren van afwijkingen;

— aantal geanalyseerde metafasecellen per dier en het aantal geanalyseerde cellen voor de bepaling van de mitotische index;

— criteria voor de aanvaardbaarheid van het onderzoek;

— criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten:

— conditie van het dier voor en tijdens de testperiode, inclusief tekenen van toxiciteit;

— mitotische index, afzonderlijk vermeld voor elk dier;

— type en aantal van de afwijkingen en van de afwijkende cellen, afzonderlijk vermeld voor elk dier;

— totaal aantal afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;

— aantal cellen met afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;

— veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen, met inbegrip van veranderingen in de frequenties van polyploïde cellen en/of cellen met endoreduplicatie;

▼M7

— dosisresponsrelatie, waar mogelijk;

— gebruikte statistische analyses en methode;

— gegevens waaruit blijkt dat blootstelling van het beenmerg heeft plaatsgevonden;

— gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;

— gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde, standaardafwijking en 95 %-controlegrenzen voor de verdeling, alsook de bestreken tijdsperiode en het aantal waarnemingen;

— criteria waaraan voor een positieve of negatieve respons is voldaan.

Bespreking van de resultaten.

Conclusie.

Referenties.

LITERATUUR

(1) OESO (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OESO, Parijs.

(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, blz. 275-306.

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

(4) Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, blz. 115-141.

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

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

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

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

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

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

▼**M7**

(11) OESO (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^{o}19, OECD Publishing, Parijs.

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

(13) Lovell, D.P. *et al*. (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, blz. 184-232.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype: structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype: structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Aneuploïdie: elke afwijking van het normale diploïde (of haploïde) aantal chromosomen met één of meer chromosomen, maar niet met veelvouden van (een) volledige reeks(en) chromosomen (vgl. polyploïdie).

Centromeer: het deel of de delen van een chromosoom waar tijdens de celdeling de spoeldraden aan vastzitten, zodat de verplaatsing van de dochterchromosomen naar de polen van de dochtercellen regelmatig kan verlopen.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Endoreduplicatie: een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, … chromatiden.

Hiaat: een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Mitotische index: de verhouding tussen het aantal cellen in mitose en het totale aantal cellen in een populatie, die een maat is voor de proliferatie van die celpopulatie.

Numerieke afwijking: een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte dieren (aneuploïdie).

Polyploïdie: een numerieke chromosoomafwijking waarbij sprake is van een verandering in het aantal van de volledige reeks chromosomen, te onderscheiden van een numerieke verandering in een deel van de reeks chromosomen (vgl. aneuploïdie).

Structurele chromosoomafwijking: een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M7

Aanhangsel 2

DE FACTORIËLE OPZET VOOR HET IDENTIFICEREN VAN VERSCHILLEN TUSSEN GESLACHTEN IN DE IN-VIVOTEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN

De factoriële opzet en zijn analyse

Bij deze opzet worden voor elk concentratieniveau minimaal 5 mannetjes en 5 vrouwtjes getest, wat leidt tot een opzet met minimaal 40 dieren (20 mannetjes en 20 vrouwtjes, plus relevante positieve controles).

De opzet, die een van de eenvoudigere factoriële opzetten is, is gelijkwaardig aan een tweewegs variantieanalyse met geslacht en concentratieniveau als hoofdeffecten. De gegevens kunnen worden geanalyseerd met veel standaard statistische softwarepakketten, zoals SPSS, SAS, STATA, Genstat, alsook met R.

De analyse verdeelt de variabiliteit in de gegevensreeks in de variabiliteit tussen de geslachten, die tussen de concentraties en die verband houdend met de interactie tussen geslacht en concentratie. Elk van de termen wordt getoetst tegen een schatting van de variabiliteit tussen de duplodieren binnen de groepen van dieren van hetzelfde geslacht die dezelfde concentratie toegediend krijgen. Volledige gegevens over de onderliggende methodologie zijn te vinden in diverse statistische standaardhandboeken (zie referenties) en in de „help”-functionaliteit van de statistische pakketten.

De analyse begint met een inspectie van de interactieterm geslacht x concentratie in de ANOVA-tabel ([1]). Als de interactieterm niet significant is, verschaffen de gecombineerde waarden van de geslachten of van de concentratieniveaus geldige statistische toetsen tussen de niveaus op basis van de gepoolde variabiliteit binnen groepen in de ANOVA.

De volgende stap in de analyse is de verdeling van de geschatte variabiliteit tussen concentraties in contrasten, die een toets op lineaire en kwadratische contrasten van de responsen over de concentratieniveaus verschaft. Wanneer de interactie tussen geslacht en concentratie significant is, kan deze term ook worden verdeeld in interactiecontrasten lineair x geslacht en kwadratisch x geslacht. Deze termen verschaffen toetsen voor de vraag of de concentratieresponsen voor de twee geslachten parallel lopen of dat de respons voor de twee geslachten gedifferentieerd is.

De geschatte gepoolde variabiliteit binnen groepen kan worden gebruikt voor paarsgewijze toetsen voor het verschil tussen de gemiddelden. Deze vergelijkingen kunnen worden gemaakt tussen de gemiddelden voor de twee geslachten en tussen de gemiddelden voor de verschillende concentratieniveaus zoals voor vergelijkingen met de negatieve controleniveaus. Indien er sprake is van een significante interactie, kunnen vergelijkingen worden gemaakt tussen de gemiddelden van verschillende concentraties binnen een geslacht of tussen de gemiddelden van de geslachten bij dezelfde concentratie.

Referenties

Er is een groot aantal statistische handboeken waarin de theorie, opzet, methodologie, analyse en interpretatie van factoriële opzetten worden besproken, variërend van de eenvoudigste analyses met twee factoren tot de complexere vormen die worden gebruikt voor het ontwerpen van experimenten. De lijst hieronder is niet uitputtend. Enkele boeken bevatten uitgewerkte voorbeelden van vergelijkbare proefopzetten, in enkele gevallen met code voor het uitvoeren van de analyses met verschillende softwarepakketten.

([1]) Statistici die een modelbenadering zoals gegeneraliseerde lineaire modellen (GLM's) hanteren, pakken de analyse mogelijk op een andere, maar vergelijkbare manier aan, maar zullen niet noodzakelijkerwijs de traditionele ANOVA-tabel opstellen, die dateert uit de tijd van de algoritmische benaderingen om de statistieken te berekenen die werden ontwikkeld in het pre-computertijdperk.

▼M7

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

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

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

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

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

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

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

▼M7

B.12. **MICRONUCLEUSTEST BIJ ERYTROCYTEN VAN ZOOGDIEREN**

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 474 (2016) van de OESO. Zij maakt deel uit van een reeks testmethoden op het gebied van de genetische toxicologie. Er is een OESO-document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van deze testrichtlijnen (1).

De in-vivomicronucleustest bij zoogdieren is met name van belang voor de beoordeling van genotoxiciteit, omdat factoren van het in-vivometabolisme, de farmacokinetiek en de DNA-herstelprocessen actief zijn en bijdragen aan de reacties op de test, hoewel deze aspecten per soort kunnen verschillen. Een in-vivobepaling is ook geschikt om in vitro gesignaleerde genotoxiciteit nader te onderzoeken.

De in-vivomicronucleustest bij zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen of de teststof chromosoombeschadigingen of beschadiging van het mitotisch apparaat in de erytroblasten induceert. De test beoordeelt de vorming van micronuclei in erytrocyten die zijn verkregen uit het beenmerg of perifere bloedcellen van dieren, meestal knaagdieren.

De micronucleustest is bedoeld om chemische stoffen te signaleren die cytogenetische schade veroorzaken waarbij micronuclei ontstaan met achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Wanneer een erytroblast uit het beenmerg zich ontwikkelt tot een onrijpe erytrocyt (ook polychromatische erytrocyt of reticulocyt genoemd), wordt de hoofdkern uitgestoten; wanneer een micronucleus is ontstaan, kan deze in het cytoplasma achterblijven. Omdat deze cellen geen hoofdkern bevatten, zijn de micronuclei gemakkelijk zichtbaar te maken of op te sporen. Een stijging van de frequentie waarmee bij behandelde dieren onrijpe erytrocyten met micronuclei worden aangetroffen, wijst op structurele of numerieke chromosoomafwijkingen.

Nieuwgevormde erytrocyten met micronuclei worden geïdentificeerd en kwantitatief bepaald door kleuring gevolgd door hetzij visuele scoring met een microscoop of geautomatiseerde analyse. Het tellen van voldoende rijpe erytrocyten in het perifeer bloed of beenmerg van volwassen dieren wordt veel gemakkelijker wanneer een geautomatiseerd scoringplatform wordt gebruikt. Zulke platforms zijn aanvaardbaar als alternatief voor handmatige beoordeling (2). Uit vergelijkend onderzoek is gebleken dat deze methoden, die gebruikmaken van passende kalibratiestandaarden, een betere inter- en intralaboratoriumreproduceerbaarheid en -gevoeligheid kunnen verschaffen dan het handmatig scoren met een microscoop (3) (4). Geautomatiseerde systemen die frequenties van erytrocyten met micronuclei kunnen meten, zijn onder andere flowcytometers (5), beeldanalyseplatforms (6) (7) en laserscanningcytometers (8).

Hoewel het in het kader van de test normaal gesproken niet wordt gedaan, kunnen chromosoomfragmenten aan de hand van een aantal criteria worden onderscheiden van hele chromosomen. Daartoe behoren de vaststelling van de aan- of afwezigheid van een kinetochoor- of centromeer-DNA, die beide kenmerkend zijn voor intacte chromosomen. De afwezigheid van een kinetochoor- of centromeer-DNA wijst erop dat de micronucleus uitsluitend fragmenten van chromosomen bevat, terwijl de aanwezigheid ervan wijst op verlies van chromosomen.

De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

▼M7

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

Het beenmerg van jonge volwassen knaagdieren is het doelweefsel voor genetische schade in deze test, aangezien in dit weefsel erytrocyten worden gevormd. De meting van micronuclei in onrijpe erytrocyten in perifeer bloed is aanvaardbaar bij andere zoogdiersoorten waarvan is aangetoond dat de gevoeligheid om chemische stoffen die structurele of numerieke chromosoomafwijkingen in deze cellen veroorzaken te detecteren, afdoende is (door inductie van micronuclei in onrijpe erytrocyten) en mits een wetenschappelijke motivering wordt gegeven. De frequentie van onrijpe erytrocyten met micronuclei is het belangrijkste eindpunt. De frequentie van rijpe erytrocyten in het perifere bloed met micronuclei kan ook als eindpunt van de bepaling worden gebruikt bij diersoorten zonder sterke selectie in de milt tegen cellen met micronuclei en wanneer de dieren gedurende een periode langer dan de levensduur van de erytrocyt in de gebruikte diersoort ononderbroken worden behandeld. (bv. 4 weken of langer voor muizen).

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof(fen), of een of meer metabolieten daarvan, niet in het doelweefsel terechtkom(t)(en), is deze test mogelijk niet geschikt.

Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld. Als beenmerg wordt gebruikt, worden de dieren op een of meer geschikte tijdstippen na de behandeling op humane wijze gedood, wordt het beenmerg verwijderd en worden er preparaten gemaakt die worden gekleurd (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Wanneer perifeer bloed wordt gebruikt, wordt op een of meer geschikte tijdstippen na de behandeling bloed afgenomen en worden er preparaten gemaakt die worden gekleurd (12) (16) (17) (18). Wanneer acuut een behandeling wordt toegepast, is het belangrijk tijdstippen voor het oogsten van beenmerg of bloed te kiezen waarop de inductie van onrijpe erytrocyten met micronuclei als gevolg van de behandeling kan worden gedetecteerd. In geval van bemonstering van perifeer bloed, moet ook zoveel tijd zijn verstreken dat deze gebeurtenissen in het circulerende bloed zichtbaar worden. De preparaten worden onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei, door visualisatie met een microscoop, beeldanalyse, flowcytometrie of laserscanningcytometrie.

VERIFICATIE VAN DE BEKWAAMHEID VAN LABORATORIA

Bekwaamheidsonderzoek

Om voldoende ervaring met het uitvoeren van de bepaling vast te stellen voordat deze wordt gebruikt voor routinetests, moet het laboratorium hebben aangetoond in staat te zijn verwachte resultaten uit gepubliceerde gegevens (17) (19) (20) (21) (22) te reproduceren voor frequenties van micronuclei met minimaal twee positieve controlestoffen (waaronder zwakke responsen geïnduceerd door lage doses positieve controles), zoals de stoffen vermeld in tabel 1 en met vergelijkbare medium-/oplosmiddelcontroles (zie punt 26). Bij deze experimenten moeten doses worden gebruikt die leiden tot reproduceerbare en dosisgerelateerde toenamen en moeten de gevoeligheid en het dynamisch bereik van het testsysteem in het te onderzoeken weefsel (beenmerg of perifeer bloed) aantonen en gebruikmaken van de scoringmethode die binnen het laboratorium zal worden aangewend. Deze eis geldt niet voor laboratoria met ervaring, d.w.z. laboratoria die beschikken over referentiegegevens uit het verleden zoals omschreven in de punten 14-18.

Controlegegevens uit het verleden

Tijdens het bekwaamheidsonderzoek stelt het laboratorium vast:

— een bereik en verdeling van positieve controles uit het verleden, en

▼M7

— een bereik en verdeling van negatieve controles uit het verleden.

Wanneer voor het eerst gegevens worden verkregen voor een verdeling van negatieve controles uit het verleden, moeten gelijktijdige negatieve controles consistent zijn met gepubliceerde controlegegevens, indien deze bestaan. Wanneer meer experimentele gegevens aan de verdeling van historische controles worden toegevoegd, moeten gelijktijdige negatieve controles idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van deze verdeling liggen. De databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium moet statistisch robuust zijn om te waarborgen dat het laboratorium de verdeling van zijn negatieve controlegegevens kan beoordelen. Uit de literatuur komt naar voren dat daarvoor minimaal 10 experimenten nodig zijn, maar dat bij voorkeur ten minste 20 experimenten worden gebruikt die onder vergelijkbare experimentele omstandigheden zijn uitgevoerd. Laboratoria moeten methoden voor kwaliteitscontrole gebruiken, zoals controlekaarten (bv. C-kaarten of X-kaarten (23)), om vast te stellen hoe variabel hun gegevens zijn en om aan te tonen dat het laboratorium de methodologie 'onder controle' heeft. Verdere aanbevelingen voor het opbouwen en gebruiken van de historische gegevens (d.w.z. criteria voor het opnemen van gegevens in en het uitsluiten ervan uit de historische gegevens en de aanvaardbaarheidscriteria voor een gegeven experiment) zijn te vinden in de literatuur (24).

Wanneer het laboratorium tijdens het bekwaamheidsonderzoek (zoals beschreven in punt 13) een onvoldoende aantal experimenten voltooit om een statistisch robuuste verdeling van negatieve controles vast te stellen (zie punt 15), is het aanvaardbaar de verdeling tijdens de eerste routinetests op te bouwen. Bij deze aanpak moeten de aanbevelingen worden gevolgd die in de literatuur zijn uiteengezet (24), en de negatieve controleresultaten die in deze experimenten worden verkregen, moeten consistent blijven met gepubliceerde negatieve controlegegevens.

Bij eventuele wijzigingen in het experimentele protocol moet rekening worden gehouden met hun implicaties voor de vraag of de resulterende gegevens consistent blijven met de databank met bestaande historische controlegegevens van het laboratorium. Alleen grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens, waarbij deskundigen bepalen welke controles afwijken van de eerdere verdeling (zie punt 15). Tijdens de hernieuwde opbouw is een volledige databank met negatieve controlegegevens mogelijk niet nodig om een echte test te mogen uitvoeren, mits het laboratorium kan aantonen dat zijn gelijktijdige negatieve controlewaarden consistent blijven met hetzij zijn eerdere databank hetzij de overeenkomstige gepubliceerde gegevens.

Negatieve controlegegevens moeten bestaan uit de incidentie van onrijpe erytrocyten met micronuclei in elk dier. Gelijktijdige negatieve controles liggen idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van de verdeling van de verzameling historische negatieve controlegegevens van het laboratorium. Wanneer gegevens van gelijktijdige negatieve controles buiten de 95 %-controlegrenzen vallen, kan opneming ervan in de historische controleverdeling toch aanvaardbaar zijn zolang deze gegevens geen extreme uitschieters zijn en er bewijs is dat het testsysteem 'onder controle' is (zie punt 15) en er geen bewijs is van technisch of menselijk falen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Keuze van de diersoort

Er dient gebruik te worden gemaakt van gezonde jonge volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Er kunnen muizen, ratten en andere geschikte zoogdiersoorten worden gebruikt. Wanneer perifeer bloed wordt gebruikt, moet worden vastgesteld dat verwijdering van cellen met micronuclei uit de bloedsomloop door de milt de detectie van geïnduceerde micronuclei in de gekozen soort niet in het gedrang brengt. Dit is voor perifeer bloed van muizen

▼M7

en ratten al aangetoond (2). De wetenschappelijke rechtvaardiging voor het gebruik van andere soorten dan ratten en muizen moet in het verslag worden opgenomen. Als andere soorten dan knaagdieren worden gebruikt, wordt aanbevolen de meting van geïnduceerde micronuclei te integreren in een andere passende toxiciteitstest.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden van de dieren

De temperatuur in de proefdierruimte moet voor knaagdieren 22 °C (± 3 °C) zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid idealiter 50-60 % is, dient deze minimaal 40 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % te zijn, behalve bij het reinigen van de ruimte. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof via het voer wordt toegediend. Knaagdieren moeten worden gehuisvest in kleine groepen (niet meer dan vijf dieren per kooi) van hetzelfde geslacht en dezelfde behandelingsgroep als geen agressief gedrag wordt verwacht, bij voorkeur in kooien met een stevige vloer met passende milieuverrijking. De dieren mogen uitsluitend individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is.

Voorbereiding van de dieren

Normaal gesproken worden gezonde jonge volwassen dieren gebruikt (voor knaagdieren idealiter 6-10 weken oud bij het begin van de behandeling, hoewel iets oudere dieren ook aanvaardbaar zijn) en aselect ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De afzonderlijke dieren krijgen op humane, minimaal invasieve wijze een unieke identificatie (bv. door het aanbrengen van een ring, tag, microchip of door biometrische identificatie, maar niet door het afknippen van oren of tenen) en krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Kruisverontreiniging door de positieve controle en de teststof moet worden vermeden. Bij het begin van de studie moet per geslacht het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht bedragen.

Voorbereiding van de doses

Vaste chemische teststoffen moeten worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte oplosmiddelen of media of worden vermengd met voedsel of drinkwater voordat dit aan de dieren wordt gegeven. Vloeibare chemische teststoffen kunnen direct worden gegeven of eerst worden verdund. Voor blootstelling via inhalatie kunnen teststoffen worden toegediend als een gas, damp of een vaste/vloeibare aerosol, naargelang van de fysisch-chemische eigenschappen ervan. Er dienen verse preparaten van de teststof te worden toegepast, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat bewaren van de preparaten aanvaardbaar is en blijkt wat de juiste bewaaromstandigheden zijn.

Testomstandigheden

Oplosmiddel/medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststoffen moeten uitgesloten zijn. Als andere oplosmiddelen/media worden gebruikt dan de algemeen bekende, moet het gebruik ervan worden ondersteund met referentiegegevens die wijzen op de verenigbaarheid ervan. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel/medium te overwegen. Voorbeelden van vaak gebruikte compatibele oplosmiddelen/media zijn water, fysiologische zoutoplossing, methylcelluloseoplossing, natriumcarboxymethylcellulose-zoutoplossing, olijfolie en maïsolie. Bij het ontbreken van historische of gepubliceerde controlegegevens waaruit blijkt dat een gekozen atypisch oplosmiddel/medium geen micronuclei en andere schadelijke effecten veroorzaakt, dient een eerste onderzoek te worden uitgevoerd om vast te stellen dat de oplosmiddel/mediumcontrole aanvaardbaar is.

▼M7

Controles

Positieve controles

Normaal gesproken wordt in elke test een groep dieren opgenomen die wordt behandeld met een positieve controlestof. Hiervan kan worden afgezien wanneer het testlaboratorium aantoonbare bekwaamheid heeft in het uitvoeren van de test en een bereik van historische positieve controles heeft vastgesteld. Wanneer geen parallelle positieve controlegroep wordt opgenomen, moeten in elk experiment scoringcontroles (ongekleurde en ongefixeerde preparaten of celsuspensiemonsters, indien van toepassing voor de scoringmethode) worden opgenomen. Deze kunnen worden verkregen door in de scoring van de studie passende referentiemonsters op te nemen die zijn verkregen en bewaard van een apart positieve controle-experiment dat op gezette tijden (bv. elke 6-18 maanden) wordt verricht; bijvoorbeeld tijdens de bekwaamheidstoetsing en daarna op gezette tijden, indien nodig.

Positieve controlestoffen moeten op betrouwbare wijze leiden tot een detecteerbare stijging van de frequentie van micronuclei ten opzichte van het spontane niveau. Bij het handmatig scoren met een microscoop moeten de doseringen van de positieve controles zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn, maar de gecodeerde monsters niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn voor de scorer. Het is aanvaardbaar dat de positieve controle langs een andere weg wordt toegediend dan de teststof, met behulp van een ander behandelingsschema, en dat bemonstering op slechts één tijdstip plaatsvindt. Tevens kan, waar dat van toepassing is, het gebruik van chemische stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen staan vermeld in tabel 1.

Tabel 1

Voorbeelden van positieve controlestoffen.

Chemische stoffen en CAS RN
Ethylmethaansulfonaat [CAS RN 62-50-0]
Methylmethaansulfonaat [CAS RN 66-27-3]
Ethylnitrosoureum [CAS RN 759-73-9]
Mitomycine C [CAS RN 50-07-7]
Cyclofosfamide (monohydraat) [CAS RN 50-18-0 (CAS RN 6055-19-2)]
Triëthyleenmelamine [CAS RN 51-18-3]
Colchicine [CAS RN 64-86-8] of vinblastine [CAS RN 865-21-4] — als aneugenen

Negatieve controles

Dieren in een negatieve controlegroep moeten op alle bemonsteringstijdstippen worden opgenomen en ook verder op dezelfde wijze worden behandeld als de behandelingsgroepen, zij het dat zij geen teststof toegediend krijgen. Indien bij de toediening van de teststof van een oplosmiddel/medium gebruik wordt gemaakt, dient dit oplosmiddel/medium aan de controlegroep toegediend te worden. Als uit historische negatieve controlegegevens op ieder bemonsteringstijdstip voor het testlaboratorium een consistente spreiding over de dieren en consistente frequenties van cellen met micronuclei blijken, is mogelijk slechts één enkele bemonstering voor de negatieve controle nodig. Wanneer voor negatieve controles één bemonstering plaatsvindt, dient deze plaats te vinden op het eerste bemonsteringstijdstip dat in de studie wordt gebruikt.

▼M7

Als perifeer bloed wordt gebruikt, kan een monster dat vóór de behandeling wordt genomen ook aanvaardbaar zijn in plaats van een gelijktijdige negatieve controle, maar alleen wanneer het gaat om een korte studie en wanneer de resultaten consistent zijn met de controlegegevens uit het verleden van het testlaboratorium. Voor ratten is aangetoond dat het nemen van kleine monsters (bv. minder dan 100 µl/dag) vóór de behandeling een minimaal effect heeft op de achtergrondfrequentie van micronuclei (25).

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

In het algemeen is de micronucleusrespons voor mannetjes en vrouwtjes vergelijkbaar, en de meeste studies kunnen daarom bij beide geslachten worden uitgevoerd (26). Gegevens waaruit blijkt dat er relevante verschillen tussen vrouwtjes en mannetjes bestaan (bv. verschillen in systemische toxiciteit, metabolisme, biologische beschikbaarheid, toxiciteit voor het beenmerg enz., met inbegrip van bv. in een bereikbepalingsonderzoek), zijn een aanmoediging om beide geslachten te gebruiken. In dit geval kan het passend zijn om een onderzoek bij beide geslachten uit te voeren, bijvoorbeeld als onderdeel van een toxiciteitsonderzoek bij herhaalde toediening. Het kan passend zijn om een factoriële onderzoeksopzet te gebruiken als beide geslachten worden gebruikt. Details over de wijze waarop de gegevens bij deze onderzoeksopzet moeten worden geanalyseerd, zijn te vinden in aanhangsel 2.

De vaststelling van de groepsgrootte aan het begin van het onderzoek moet erop gericht zijn minimaal 5 analyseerbare dieren van één geslacht, of van elk geslacht als beide worden gebruikt, per groep te krijgen. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals dit bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd. Als richtsnoer voor de maximale typische behoefte aan dieren: voor een onderzoek in beenmerg uitgevoerd volgens de in punt 37 vastgestelde parameters met drie dosisgroepen en parallelle negatieve en positieve controlegroepen (elke groep bestaande uit vijf dieren van één geslacht) zijn 25 tot 35 dieren nodig.

Dosisniveaus

Als er een bereikbepalingsonderzoek wordt uitgevoerd omdat er nog geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (27). Het onderzoek moet erop gericht zijn de maximaal verdraagbare dosis (maximum tolerated dose, MTD) vast te stellen, dat wil zeggen, de hoogste dosis die zal worden verdragen zonder aanwijzingen voor onderzoeksbeperkende toxiciteit, in verhouding tot de duur van de onderzoeksperiode (bv. door het veroorzaken van gewichtsverlies of cytotoxiciteit voor het hematopoïetisch systeem, maar geen dood of aanwijzingen voor pijn, lijden of nood die humane doding noodzakelijk maken (28)).

De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen het aantal onrijpe erytrocyten en het totale aantal erytrocyten in het beenmerg of perifeer bloed met meer dan 50 %, maar tot niet lager dan 20 % van de controlewaarde). Bij het analyseren van CD71-positieve cellen in de perifere bloedsomloop (bv. door flowcytometrie) reageert deze zeer jonge fractie onrijpe erytrocyten sneller op toxische uitdagingen dan het grotere RNA-positieve cohort onrijpe erytrocyten. Daardoor kan bij opzetten met acute blootstelling waarin de fractie CD71-positieve onrijpe erytrocyten wordt onderzocht, een hogere klaarblijkelijke toxiciteit worden gevonden dan bij opzetten die onrijpe erytrocyten identificeren op basis van RNA-gehalte. Wanneer in experimenten wordt gewerkt met niet meer dan vijf behandelingsdagen, kan het hoogste dosisniveau voor de teststoffen die toxiciteit veroorzaken, dus worden gedefinieerd als de dosis die een statistisch significante verlaging veroorzaakt in de verhouding tussen CD71-positieve onrijpe erytrocyten en het totale aantal erytrocyten, maar tot niet minder dan 5 % van de controlewaarde (29).

▼M7

Chemische stoffen die verzadiging van toxicokinetische eigenschappen vertonen, of detoxificatieprocessen induceren die kunnen leiden tot een afname van de blootstelling na langlopende toediening, kunnen uitzonderingen zijn op de doseringscriteria en moeten per geval worden beoordeeld.

Om dosisresponsinformatie te krijgen, moet een volledig onderzoek een negatieve controlegroep omvatten en minimaal drie dosisniveaus die in het algemeen een factor 2, maar niet meer dan een factor 4, uit elkaar liggen. Als in een bereikbepalingsonderzoek of op basis van bestaande gegevens geen aanwijzingen voor toxiciteit van de teststof worden gevonden, moet de hoogste dosis voor een toedieningsperiode van 14 dagen of langer 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag zijn, of voor een toedieningsperiode van minder dan 14 dagen 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag. Als de teststof echter wel toxiciteit veroorzaakt, moet de MTD de hoogste toegediende dosis zijn en moeten de gebruikte dosisniveaus bij voorkeur een bereik dekken van maximale tot weinig of geen toxiciteit. Wanneer toxiciteit voor het doelweefsel (beenmerg) bij alle geteste dosisniveaus wordt waargenomen, wordt verder onderzoek bij niet-toxische doses aanbevolen. Voor onderzoek dat ten doel heeft de kwantitatieve dosisresponsinformatie volledig te kenschetsen, kunnen aanvullende dosisgroepen nodig zijn. Voor bepaalde typen teststoffen (bv. geneesmiddelen voor menselijk gebruik) waarvoor specifieke eisen gelden, kunnen deze limieten verschillen.

Limiettest

Als uit doseringsbereikstudies of bestaande gegevens bij gerelateerde dierstammen blijkt dat een behandelingsregime van minstens de limietdosis (zoals hieronder beschreven) geen waarneembare toxische effecten geeft (met inbegrip van achteruitgang van de proliferatie van beenmerg of andere aanwijzingen van toxiciteit voor het doelweefsel), en als op grond van in-vitro genotoxiciteitsstudies of gegevens bij structureel verwante chemische stoffen geen genotoxiciteit wordt verwacht, dan is een volledig onderzoek met drie dosisniveaus mogelijk niet nodig, mits is aangetoond dat de teststof(fen) het doelweefsel (beenmerg) bereik(t)(en). In zulke gevallen kan één dosisniveau, gelijk aan de limietdosis, voldoende zijn. Voor een toedieningsperiode van 14 dagen of meer is de limietdosis 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag. Voor een toedieningsperiode van minder dan 14 dagen is de limietdosis 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag.

Toediening van de doses

Bij de opzet van een test moet rekening worden gehouden met de verwachte blootstellingsroute bij mensen. Daarom kunnen andere blootstellingsroutes zoals voeding, drinkwater, lokaal subcutaan, intraveneus, oraal (via sonde), inhalatie, intratracheaal of implantatie worden gekozen, als deze onderbouwd worden. De route moet in elk geval zodanig worden gekozen dat adequate blootstelling van het (de) doelweefsel(s) is gewaarborgd. Intraperitoneale injectie wordt in het algemeen niet aanbevolen, omdat zij bij mensen geen beoogde blootstellingsroute is, en zij mag uitsluitend worden toegepast met een specifieke wetenschappelijke motivering. Als de teststof wordt vermengd met voedsel of drinkwater, met name in geval van één toediening, moet ervoor worden gezorgd dat de tijdsduur tussen de consumptie van voedsel en water en de bemonstering voldoende is om de effecten te kunnen detecteren (zie punt 37). Het maximale vloeistofvolume dat via sonde of injectie per keer kan worden toegediend, hangt af van de grootte van het proefdier. Het volume mag normaal gesproken niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij een waterige oplossing kan echter maximaal 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Hogere volumes dan dit moeten worden onderbouwd. Behalve bij irriterende of bijtende teststoffen, die normaal gesproken bij hogere concentraties hevigere effecten hebben, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er op alle dosisniveaus hetzelfde volume in verhouding tot het lichaamsgewicht wordt toegediend.

▼M7

Behandelingsschema

Bij voorkeur worden 2 of meer behandelingen uitgevoerd, toegediend met tussenpozen van 24 uur, in het bijzonder wanneer deze test wordt geïntegreerd met andere toxiciteitsonderzoeken. Als alternatief kunnen doses in één keer worden toegediend, als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is (bv. teststoffen waarvan bekend is dat ze de celcyclus blokkeren). De doses van de teststoffen kunnen eventueel worden gesplitst (bv. twee of meer porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan 2-3 uur) om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. In deze omstandigheden, of wanneer de teststof wordt toegediend door inhalatie, moet het bemonsteringstijdstip worden gepland op basis van het tijdstip van de laatste dosistoediening of het einde van de blootstelling.

De test kan bij muizen of ratten op een van de volgende drie manieren worden uitgevoerd:

a. De dieren worden éénmaal met de teststof behandeld. Monsters van beenmerg worden ten minste tweemaal genomen (bij onafhankelijke groepen dieren), de eerste keer niet eerder dan 24 uur na de behandeling, en de laatste keer uiterlijk 48 uur na de behandeling, met een afdoende interval tussen de bemonsteringen, tenzij bekend is dat een teststof een uitzonderlijk lange halveringsperiode heeft. Voor het gebruik van een bemonsteringstijdstip binnen 24 uur na de behandeling moet een motivering worden gegeven. Monsters van perifeer bloed worden ten minste tweemaal genomen (van dezelfde groep dieren), de eerste keer niet eerder dan 36 uur na de behandeling, met (een) afdoende interval(len) na het eerste monster, en de laatste keer uiterlijk 72 uur na de behandeling. Op het eerste bemonsteringstijdstip worden alle dosisgroepen behandeld en worden monsters genomen voor de analyse; op het (de) latere bemonsteringstijdstip(pen) hoeft echter alleen de hoogste dosis te worden toegediend. Wanneer op een bemonsteringstijdstip een positieve respons wordt waargenomen, is geen aanvullende bemonstering vereist, tenzij kwantitatieve dosisresponsinformatie nodig is. De beschreven oogsttijdstippen zijn een gevolg van de kinetiek van het verschijnen en verdwijnen van de micronuclei in deze 2 weefselcompartimenten.

b. Als 2 dagelijkse behandelingen worden gebruikt (bv. twee behandelingen met een interval van 24 uur), moet de bemonstering voor het beenmerg eenmaal gebeuren tussen 18 en 24 uur na de laatste behandeling of voor het perifeer bloed eenmaal tussen 36 en 48 uur na de laatste behandeling (30). De beschreven oogsttijdstippen zijn een gevolg van de kinetiek van het verschijnen en verdwijnen van de micronuclei in deze 2 weefselcompartimenten.

c. Als drie of meer dagelijkse behandelingen worden gebruikt (bv. drie of meer behandelingen met een interval van ongeveer 24 uur), moet de bemonstering voor het beenmerg gebeuren uiterlijk 24 uur na de laatste behandeling en voor het perifeer bloed uiterlijk 40 uur na de laatste behandeling (31). Deze behandelingsoptie maakt combinatie van de komeettest (bv. bemonstering 2-6 uur na de laatste behandeling) met de micronucleustest, en integratie van de micronucleustest met toxiciteitsonderzoeken met herhaalde toediening mogelijk. Uit geaccumuleerde gegevens is naar voren gekomen dat over deze ruimere tijdsperioden micronucleusinductie kan worden waargenomen wanneer 3 of meer toedieningen hebben plaatsgehad (15).

Andere doserings- of bemonsteringsschema's kunnen worden gebruikt wanneer dat relevant en wetenschappelijk gerechtvaardigd is, en om integratie met andere toxiciteitstests te vergemakkelijken.

Observaties

Algemene klinische observaties van de proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden en klinische tekenen moeten ten minste eenmaal per dag worden geregistreerd, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met inachtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. Gedurende de toedieningsperiode moeten alle dieren ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Alle dieren moeten bij aanvang van het onderzoek, tijdens onderzoeken met herhaalde toediening ten minste eenmaal per week, en bij het doden worden gewogen. In onderzoeken met een duur van ten minste één week moet het voedselverbruik ten minste wekelijks

▼M7

worden gemeten. Als de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet het waterverbruik bij elke verversing van water en ten minste wekelijks worden gemeten. Dieren die niet-letale indicatoren van excessieve toxiciteit vertonen moeten voor afloop van de testperiode op humane wijze worden gedood (28). In bepaalde situaties kan de lichaamstemperatuur van dieren worden gecontroleerd, omdat door de behandeling geïnduceerde hyper- en hypothermie een rol spelen in het veroorzaken van foutieve resultaten (32) (33) (34).

Blootstelling van doelweefsel

Op een of meer passende tijdstippen moet een bloedmonster worden genomen en moeten de plasmaspiegels van de teststoffen worden onderzocht om aan te tonen dat blootstelling van het beenmerg heeft plaatsgevonden, in situaties waar dit gerechtvaardigd is en waar geen andere blootstellingsgegevens bestaan (zie punt 48).

Beenmerg/bloedpreparaten

Beenmergcellen worden doorgaans uit de dijbenen of scheenbenen van de dieren verwijderd, onmiddellijk na humane euthanasie. Gewoonlijk worden cellen verwijderd, geprepareerd en gekleurd met vastgestelde methoden. Kleine hoeveelheden perifeer bloed kunnen volgens passende normen inzake dierenwelzijn worden verkregen met een methode waarbij het proefdier blijft leven, zoals afname van bloed uit een ader in de staart of een ander geschikt bloedvat, of door hartpunctie of monstername uit een groot bloedvat bij de doding van het dier. Voor erytrocyten uit beenmerg of perifeer bloed kunnen cellen, afhankelijk van de analysemethode, onmiddellijk supravitaal worden gekleurd (16) (17) (18) of worden er uitstrijkpreparaten gemaakt die vervolgens worden gekleurd voor microscopie of gefixeerd en passend gekleurd voor flowcytometrische analyse. Door het gebruik van een DNA-specifieke kleurstof [bv. acridine oranje (35) of Hoechst 33258 plus pyronine-Y (36)] kunnen sommige artefacten die zich bij het gebruik van niet voor DNA specifieke kleurstoffen kunnen voordoen, worden voorkomen. Dit voordeel sluit het gebruik van conventionele kleurstoffen (bv. Giemsa voor microscopische analyse) niet uit. Ook andere systemen [zoals cellulosekolommen om cellen die een kern bevatten te verwijderen (37) (38)] kunnen worden gebruikt, mits is aangetoond dat deze systemen geschikt zijn voor monsterbereiding in het laboratorium.

Wanneer deze methoden van toepassing zijn, kunnen antikinetochore antilichamen (39), FISH met pancentromere DNA-proben (40) of geprepareerde in situ labeling met pancentromeer-specifieke primers, samen met de passende DNA-tegenkleuring (41) worden gebruikt om de aard (chromosoom/chromosoomfragment) van de micronuclei te identificeren, teneinde vast te stellen of het mechanisme van micronucleusinductie toe te schrijven is aan clastogene en/of aneugene activiteit. Andere methoden voor differentiatie tussen clastogenen en aneugenen kunnen worden gebruikt indien is aangetoond dat zij doeltreffend zijn.

Analyse (handmatig en geautomatiseerd)

Alle te analyseren objectglaasjes en monsters, ook die van positieve en negatieve controles, worden vóór willekeurig welk type analyse onafhankelijk gecodeerd en gerandomiseerd, zodat de handmatige scorer de behandelingssituatie niet kent; deze codering is niet nodig wanneer geautomatiseerde scoringsystemen worden gebruikt die niet vertrouwen op visuele inspectie en niet door hun bedieners kunnen worden beïnvloed. Voor elk dier wordt de verhouding tussen het aantal onrijpe erytrocyten en het totale aantal (onrijpe + rijpe) erytrocyten bepaald door in totaal voor het beenmerg ten minste 500 erytrocyten en voor het perifere bloed ten minste 2000 erytrocyten te tellen (42). Voor de bepaling van de frequentie waarmee onrijpe erytrocyten met micronuclei voorkomen, moeten ten minste 4000 onrijpe erytrocyten per dier worden gescoord (43). Als de databank met historische negatieve controlegegevens uitwijst dat de gemiddelde achtergrondfrequentie van onrijpe erytrocyten met micronuclei in het testlaboratorium < 0,1 % is, moet worden overwogen aanvullende cellen te scoren. Bij het analyseren van monsters mag de verhouding tussen het aantal onrijpe erytrocyten en het totale aantal erytrocyten in behandelde dieren niet lager zijn dan 20 % van de

▼M7

verhouding in de (medium/oplosmiddel) controles wanneer gescoord wordt met microscopie, en niet lager dan ongeveer 5 % van de verhouding in de (medium/oplosmiddel) controles wanneer CD71+ onrijpe erytrocyten gescoord worden met cytometrische methoden (zie punt 31) (29). Voorbeeld: voor een beenmergtest die wordt gescoord met microscopie, is de bovengrens voor de toxiciteit 10 % onrijpe erytrocyten als het aandeel onrijpe erytrocyten in het beenmerg in de controles 50 % is.

Omdat de milt bij ratten erytrocyten met micronuclei sekwestreert en vernietigt, geniet het de voorkeur de analyse van onrijpe erytrocyten met micronuclei te beperken tot de jongste fractie om bij het analyseren van perifeer bloed van ratten een hoge gevoeligheid van de test te behouden. Wanneer geautomatiseerde analysemethoden worden gebruikt, kunnen deze meest onrijpe erytrocyten worden geïdentificeerd op basis van hun hoge RNA-gehalte, of het hoge niveau van transferrinereceptoren (CD71+) aanwezig op hun oppervlak (31). Uit een directe vergelijking van verschillende kleuringsmethoden is echter gebleken dat met verschillende methoden, ook met conventionele kleuring met acridine oranje, bevredigende resultaten kunnen worden verkregen (3) (4).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

Gegevens van individuele dieren moeten in tabelvorm worden gepresenteerd. Voor elk onderzocht dier worden het aantal gescoorde onrijpe erytrocyten, het aantal onrijpe erytrocyten met micronuclei en het aandeel onrijpe erytrocyten op het totale aantal apart vermeld. Wanneer muizen ononderbroken worden behandeld gedurende een periode van ten minste 4 weken, moeten ook de gegevens over het aantal en het aandeel rijpe erytrocyten met micronuclei worden vermeld, indien deze zijn verzameld. Gegevens over de toxiciteit en klinische tekenen bij dieren moeten eveneens worden gemeld.

Aanvaardbaarheidscriteria

Voor de aanvaardbaarheid van de test gelden de volgende criteria:

a. Toevoeging van de gegevens van gelijktijdige negatieve controles aan de databank met historische controlegegevens van het laboratorium wordt als aanvaardbaar beschouwd (zie de punten 15-18).

b. De gelijktijdige positieve controles of scoringcontroles moeten responsen induceren die verenigbaar zijn met de responsen in de databank met historische positieve controlegegevens en moeten een statistisch significante stijging opleveren vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle (zie de punten 24-25).

c. Het toepasselijke aantal doses en cellen is geanalyseerd.

d. De criteria voor de selectie van de hoogste dosis zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 30-33.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als:

a. minstens één van de behandelingsgroepen een statistisch significante stijging van de frequentie van onrijpe erytrocyten met micronuclei vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b. deze stijging dosisgerelateerd is op ten minste één bemonsteringstijdstip bij evaluatie met een geschikte trendtoets, en

c. een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen).

▼M7

Indien op een bepaald bemonsteringstijdstip alleen de hoogste dosis wordt onderzocht, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als er een statistisch significante stijging vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle is en de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen). Aanbevelingen voor de meest geschikte statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (44) (45) (46) (47). Wanneer een dosisresponsanalyse wordt uitgevoerd, moeten ten minste drie behandelde dosisgroepen worden geanalyseerd. De statistische toetsen moeten het dier als de proefeenheid gebruiken. Positieve resultaten bij de micronucleustest wijzen erop dat een teststof micronuclei induceert die ontstaan door chromosoombeschadigingen of beschadiging van het mitotisch apparaat in de erytroblasten van de geteste soort. Indien een test werd uitgevoerd om centromeren binnen micronuclei de detecteren, is een teststof die centromeerbevattende micronuclei oplevert (centromeer-DNA of kinetochoor, indicatief voor verlies van hele chromosomen), bewijs dat de teststof een aneugeen is.

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als in alle onderzochte experimentele omstandigheden:

a. geen van de behandelingsgroepen een statistisch significante stijging in de frequentie van onrijpe erytrocyten met micronuclei vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b. er op geen enkel bemonsteringstijdstip een dosisgerelateerde stijging is bij evaluatie met een geschikte trendtoets,

c. alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen), en

d. het beenmerg is blootgesteld aan de teststof(fen).

Aanbevelingen voor de meest geschikte statistische methoden zijn te vinden in de literatuur (44) (45) (46) (47). Bewijs van blootstelling van het beenmerg aan een teststof kan zijn achteruitgang van de verhouding tussen rijpe en onrijpe erytrocyten of meting van de plasma- of bloedspiegels van de teststof. In geval van intraveneuze toediening is geen bewijs van blootstelling nodig. Als alternatief kunnen ADME-gegevens verkregen in een onafhankelijke studie met dezelfde toedieningsweg en dezelfde soort worden gebruikt om blootstelling van het beenmerg aan te tonen. Negatieve resultaten wijzen erop dat de teststof onder de testomstandigheden geen micronuclei in de onrijpe erytrocyten van de geteste soort veroorzaakt.

Een duidelijk positieve of duidelijk negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

Indien de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is en om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen (bv. een zwakke of zeer lichte toename), moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek van de bestaande voltooide experimenten worden beoordeeld. In sommige gevallen kan het nuttig zijn meer cellen te analyseren of een herhalingsexperiment onder aangepaste experimentele omstandigheden uit te voeren.

In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de teststof positieve of negatieve resultaten oplevert, en zal de studie daarom als moeilijk te interpreteren worden beschouwd.

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Samenvatting

Teststof:

— bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;

▼M7

— stabiliteit van de teststof, indien bekend.

Stof die uit één component bestaat:

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Teststofbereiding:

— motivering voor de keuze van het medium;

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend;

— bereiding van toedieningsvormen voor voer, drinkwater of inhalatie;

— analytische bepalingen op toedieningsvormen (zoals stabiliteit, homogeniteit, nominale concentraties), indien deze zijn uitgevoerd.

Proefdieren:

— gebruikte diersoort/stam en motivering van het gebruik;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, huisvesting, voeding enz.;

— methode om de dieren uniek te identificeren;

— voor kortlopende onderzoeken: gewicht van elk dier aan het begin en het einde van de test; voor onderzoeken van meer dan één week: lichaamsgewicht van elk dier tijdens het onderzoek en voedselverbruik. Het bereik, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep moet worden opgenomen.

Testomstandigheden:

— gegevens over positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;

— gegevens uit het oriënterende onderzoek, indien dit is uitgevoerd;

— achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;

— gedetailleerde gegevens over de bereiding van de teststof;

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;

— achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg en -duur;

— methoden om na te gaan of de teststof(fen) in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is (zijn) terechtgekomen;

▼M7

— feitelijke dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag) berekend op basis van de teststofconcentratie in voer/drinkwater (ppm) en consumptie, indien van toepassing;

— gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;

— wijze van doden;

— wijze van pijnbestrijding (indien gebruikt);

— gedetailleerde omschrijving van behandeling en bemonsteringsschema's en motivering van de keuzes;

— methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;

— procedures voor het isoleren en preserveren van monsters;

— methoden voor de meting van de toxiciteit;

— criteria voor het scoren van onrijpe erytrocyten met micronuclei;

— aantal geanalyseerde cellen per dier voor het bepalen van de frequentie van onrijpe erytrocyten met micronuclei en voor het bepalen van de verhouding tussen onrijpe en rijpe erytrocyten;

— criteria voor de aanvaardbaarheid van het onderzoek;

— methoden, zoals gebruik van antikinetochore antilichamen of centromeer-specifieke DNA-proben om te kenschetsen of micronuclei hele chromosomen of chromosoomfragmenten bevatten, indien van toepassing.

Resultaten:

— conditie van het dier voor en tijdens de testperiode, inclusief tekenen van toxiciteit;

— verhouding tussen het aantal onrijpe erytrocyten en het totale aantal erytrocyten;

— aantal onrijpe erytrocyten met micronuclei, afzonderlijk vermeld voor elk dier;

— gemiddelde ± standaardafwijking van het aantal onrijpe erytrocyten met micronuclei per groep;

— dosisresponsrelatie, waar mogelijk;

— gebruikte statistische analyses en methoden;

— gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;

— gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde, standaardafwijking en 95 %-controlegrenzen voor de verdeling, alsook de bestreken tijdsperiode en het aantal gegevenspunten;

— gegevens waaruit blijkt dat blootstelling van het beenmerg heeft plaatsgevonden;

— karakteriserende gegevens die aangeven of micronuclei hele of gefragmenteerde chromosomen bevatten, indien van toepassing;

— criteria waaraan voor een positieve of negatieve respons is voldaan.

▼M7

Bespreking van de resultaten.

Conclusie.

Referenties.

LITERATUUR

(1) OESO (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OESO, Parijs.

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

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

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

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, blz. 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, blz. 65-73.

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

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, blz. 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, blz. 187-190.

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

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

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

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

▼M7

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

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

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 245/4, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 45-50.

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

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

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

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

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

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

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

▼M7

(28) OESO (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, nr. 19, OECD Publishing, Parijs.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, blz. 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, blz. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, blz. 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, blz. 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, blz. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, blz. 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, blz. 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, blz. 97-99.

(43) OESO (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, nr. 198, OECD Publishing, Parijs.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays", in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, blz. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (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, blz. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, blz. 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, blz. 233-241.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Centromeer: het deel of de delen van een chromosoom waar tijdens de celdeling de spoeldraden aan vastzitten, zodat de verplaatsing van de dochterchromosomen naar de polen van de dochtercellen regelmatig kan verlopen.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Erytroblast: een vroeg ontwikkelingsstadium van een erytrocyt, onmiddellijk voorafgaand aan de onrijpe erytrocyt, waarin de cel nog een kern bevat.

Kinetochoor: een structuur van eiwitten die zich op het centromeer van eukaryotische cellen vormt, die het chromosoom tijdens de mitose en meiose verbindt met polymeren van de microtubuli van de mitotische spoel, en zusterchromatiden tijdens de celdeling uit elkaar trekt.

Micronucleus: kleine kern die buiten en naast de hoofdkern van cellen tijdens de telofase van de mitose (meiose) ontstaat door achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Normochromatische of rijpe erytrocyt: een geheel rijpe erytrocyt die de RNA-restanten die achterblijven na enucleatie, heeft verloren en/of die andere kortlevende celmarkers die gewoonlijk na enucleatie na de laatste deling van een erytroblast verdwijnen, heeft verloren.

Polychromatische of onrijpe erytrocyt: een nieuwgevormde erytrocyt in een tussentijdse ontwikkelingsfase, die vanwege de aanwezigheid van RNA-restanten in de nieuwgevormde cel verkleurt met zowel de blauwe als de rode componenten van klassieke kleurstoffen voor bloed zoals Wright-Giemsa. Deze nieuwgevormde cellen zijn min of meer gelijk aan reticulocyten, die worden gevisualiseerd met een vitale kleurstof die de RNA-restanten doet samenklonteren tot een reticulum. Andere methoden, zoals monochromatische kleuring van RNA met fluorescente kleurstoffen of labeling van kortlevende oppervlaktemarkers zoals CD71 met fluorescente antilichamen, worden nu vaak gebruikt om de nieuwgevormde rode bloedcellen te identificeren. Polychromatische erytrocyten, reticulocyten en CD71-positieve erytrocyten zijn allemaal onrijpe erytrocyten, hoewel elk type een iets andere leeftijdsverdeling heeft.

Reticulocyt: Een nieuwgevormde erytrocyt die wordt gekleurd met een vitale kleurstof die cellulaire RNA-restanten doet samenklonteren tot een karakteristiek reticulum. Reticulocyten en polychromatische erytrocyten hebben een vergelijkbare verdeling van de celleeftijd.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M7

Aanhangsel 2

DE FACTORIËLE OPZET VOOR HET IDENTIFICEREN VAN VERSCHILLEN TUSSEN GESLACHTEN IN DE IN-VIVOTEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN

De factoriële opzet en zijn analyse

Bij deze opzet worden voor elk concentratieniveau minimaal 5 mannetjes en 5 vrouwtjes getest, wat leidt tot een opzet met minimaal 40 dieren (20 mannetjes en 20 vrouwtjes, plus relevante positieve controles).

De opzet, die een van de eenvoudigere factoriële opzetten is, is gelijkwaardig aan een tweewegs variantieanalyse met geslacht en concentratieniveau als hoofdeffecten. De gegevens kunnen worden geanalyseerd met veel standaard statistische softwarepakketten, zoals SPSS, SAS, STATA, Genstat, alsook met R.

De analyse verdeelt de variabiliteit in de gegevensreeks in de variabiliteit tussen de geslachten, die tussen de concentraties en die verband houdend met de interactie tussen geslacht en concentratie. Elk van de termen wordt getoetst tegen een schatting van de variabiliteit tussen de duplodieren binnen de groepen van dieren van hetzelfde geslacht die dezelfde concentratie toegediend krijgen. Volledige gegevens over de onderliggende methodologie zijn te vinden in diverse statistische standaardhandboeken (zie referenties) en in de 'help'-functionaliteit van de statistische pakketten.

De analyse begint met een inspectie van de interactieterm geslacht x concentratie in de ANOVA-tabel ([1]). Als de interactieterm niet significant is, verschaffen de gecombineerde waarden van de geslachten of van de concentratieniveaus geldige statistische toetsen tussen de niveaus op basis van de gepoolde variabiliteit binnen groepen in de ANOVA.

De volgende stap in de analyse is de verdeling van de geschatte variabiliteit tussen concentraties in contrasten, die een toets op lineaire en kwadratische contrasten van de responsen over de concentratieniveaus verschaft. Wanneer de interactie tussen geslacht en concentratie significant is, kan deze term ook worden verdeeld in interactiecontrasten lineair x geslacht en kwadratisch x geslacht. Deze termen verschaffen toetsen voor de vraag of de concentratieresponsen voor de twee geslachten parallel lopen of dat de respons voor de twee geslachten gedifferentieerd is.

De geschatte gepoolde variabiliteit binnen groepen kan worden gebruikt voor paarsgewijze toetsen voor het verschil tussen de gemiddelden. Deze vergelijkingen kunnen worden gemaakt tussen de gemiddelden voor de twee geslachten en tussen de gemiddelden voor de verschillende concentratieniveaus zoals voor vergelijkingen met de negatieve controleniveaus. Indien er sprake is van een significante interactie, kunnen vergelijkingen worden gemaakt tussen de gemiddelden van verschillende concentraties binnen een geslacht of tussen de gemiddelden van de geslachten bij dezelfde concentratie.

Referenties

Er is een groot aantal statistische handboeken waarin de theorie, opzet, methodologie, analyse en interpretatie van factoriële opzetten worden besproken, variërend van de eenvoudigste analyses met twee factoren tot de complexere vormen die worden gebruikt voor het ontwerpen van experimenten. De lijst hieronder is niet uitputtend. Enkele boeken bevatten uitgewerkte voorbeelden van vergelijkbare proefopzetten, in enkele gevallen met code voor het uitvoeren van de analyses met verschillende softwarepakketten.

([1]) Statistici die een modelbenadering zoals gegeneraliseerde lineaire modellen (GLM's) hanteren, pakken de analyse mogelijk op een andere, maar vergelijkbare manier aan, maar zullen niet noodzakelijkerwijs de traditionele ANOVA-tabel opstellen, die dateert uit de tijd van de algoritmische benaderingen om de statistieken te berekenen die werden ontwikkeld in het pre-computertijdperk.

▼M7

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

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

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

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

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

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

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

▼B

B.13/14. **MUTAGENITEIT — TERUGMUTATIETEST MET BACTERIËN**

1. **METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 471 van de OESO: Terugmutatietest met bacteriën (1997).

1.1. INLEIDING

Bij de terugmutatietest met bacteriën worden aminozuurafhankelijke stammen van *Salmonella typhimurium* en *Eschenchia coli* gebruikt voor de detectie van puntmutaties, waarbij vervanging, toevoeging of deletie van een of enkele DNA-basenparen optreedt (1)(2)(3). Deze terugmutatietest met bacteriën is gebaseerd op het beginsel dat mutaties worden gedetecteerd die ertoe leiden dat in de teststammen aanwezige mutaties en daarmee de functionele capaciteit van de bacteriën om een essentieel aminozuur te synthetiseren worden hersteld. Deze teruggemuteerde bacteriën worden zichtbaar doordat ze kunnen groeien zonder het aminozuur dat de ouderstam nodig heeft.

Puntmutaties veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat puntmutaties in oncogenen en tumorsuppressorgenen van somatische cellen betrokken zijn bij het ontstaan van tumoren bij de mens en bij proefdieren. De terugmutatietest met bacteriën is snel, goedkoop en betrekkelijk gemakkelijk uit te voeren. Veel van de teststammen hebben verschillende kenmerken waardoor ze gevoeliger zijn voor de detectie van mutaties, zoals reactieve DNA-sequenties op de terugmutatieplaatsen, een verhoogde permeabiliteit van de cel voor grote moleculen en de afwezigheid van DNA-herstelsystemen of de stimulering van foutgevoelige DNA-herstelprocessen. De specificiteit van de teststammen kan enige nuttige informatie opleveren over de aard van de mutaties die door genotoxische stoffen worden geïnduceerd. Er zijn zeer veel gegevens beschikbaar over de resultaten van de terugmutatietest met bacteriën voor een grote verscheidenheid van structuren en er zijn betrouware mehtodologieën ontwikkeld voor het testen van chemische stoffen met uiteenlopende fysisch-chemische eigenschappen, waaronder ook vluchtige stoffen.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Terugmutatietest bij *Salmonella typhimurium* of *Escherichia coli*: een test voor de detectie van mutaties in een aminozuurafhankelijke stam (respectievelijk histidine of tryptofaan), waarbij een stam ontstaat die onafhankelijk is van een externe aminozuurbron.

Mutageen met basenpaarvervanging: een stof die een wijziging van een base in het DNA veroorzaakt. Bij een terugmutatietest kan dit op de plaats van de oorspronkelijke mutatie of op een andere plaats in het bacteriële genoom gebeuren.

Mutageen met leesraamverschuiving: een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt, waardoor het leesraam in het RNA wijzigt.

▼B

1.3. TOELICHTING

Voor de terugmutatietest met bacteriën worden prokaryote cellen gebruikt, die in bijvoorbeeld opname, metabolisme, chromosoomstructuur en DNA-herstelprocessen van zoogdiercellen verschillen. Bij *in vitro* uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel *in vivo* niet volledig nabootsen. De test levert dan ook geen directe informatie op over de potentiële mutagene en carcinogene werking van een stof bij zoogdieren.

De terugmutatietest met bacteriën wordt meestal gebruikt als een eerste screening voor een genotoxische werking en met name de inductie van puntmutaties. Op basis van een groot aantal gegevens is gebleken dat veel stoffen die bij deze test positief reageren, ook bij andere tests een mutagene werking vertonen. Er zijn voorbeelden van mutagene stoffen die met deze test niet worden gesignaleerd; dit kan wellicht worden toegeschreven aan de specifieke aard van het gedetecteerde eindpunt, verschillen in metabole activering of verschillen in biologische beschikbaarheid. Anderzijds kunnen factoren die de gevoeligheid van de terugmutatietest met bacteriën bevorderen, leiden tot een te hoge inschatting van de mutagene werking.

De terugmutatietest met bacteriën zal wellicht niet geschikt zijn voor de beoordeling van bepaalde klassen chemische stoffen zoals sterk bactericide verbindingen (bv. bepaalde antibiotica) en stoffen waarvan vermoed wordt (of bekend is) dat ze specifiek het replicatiesysteem van zoogdiercellen storen (bv. bepaalde topoisomeraseremmers en bepaalde nucleosideanalogen). In deze gevallen zullen mutatietests met zoogdiercellen wellicht geschikter zijn.

Hoewel veel stoffen die positief op deze test reageren, ook carcinogeen voor zoogdieren zijn, is de correlatie niet absoluut. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en er zijn carcinogenen die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze via andere niet-genotoxische mechanismen werken of via mechanismen die in bacteriecellen ontbreken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Suspensies van bacteriecellen worden zowel met als zonder een exogeen metabool activeringssysteem aan de teststof blootgesteld. Bij de methode met geïntegreerde voedingsbodem worden deze suspensies met een topagar vermengd en direct op minimaal medium uitgeplaat. Bij de preïncubatiemethode wordt het behandelde mengsel geïncubeerd en vervolgens met een topagar vermengd voordat het op minimaal medium wordt uitgeplaat. Bij beide technieken worden na twee of drie dagen incuberen de terugmutantkolonies geteld en wordt dit aantal vergeleken met het aantal spontane terugmutantkolonies op controleplaten met oplosmiddel.

Er zijn verschillende procedures voor de uitvoering van de terugmutatietest met bacteriën beschreven. Het meest gebruikt worden de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1)(2)(3)(4), de preïncubatiemethode (2)(3)(5)(6)(7)(8), de fluctuatiemethode (9)(10) en de suspensiemethode (11). Ook wijzigingen voor het testen van gassen of dampen zijn beschreven (12).

▼B

De hier beschreven procedures gelden vooral voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem en de preïncubatiemethode. Beide zijn aanvaarbaar voor de uitvoering van experimenten zowel met als zonder metabole activering. Bij sommige stoffen verloopt de detectie efficiënter met de preïncubatiemethode. Deze stoffen behoren tot chemische klassen als alifatische nitrosamines met een korte keten, divalente metalen, aldehyden, azokleurstoffen en diazoverbindingen, pyrollizidine-alkaloïden, allylverbindingen en nitroverbindingen (3). Tevens is het bekend dat bepaalde klassen mutagene verbindingen niet altijd met standaardprocedures als de methode met geïntegreerde voedingsbodem of de preïncubatiemethode worden gesignaleerd. Deze moeten als „speciale gevallen" worden beschouwd en voor de signalering daarvan wordt sterk aangeraden andere procedures te gebruiken. De volgende „speciale gevallen" kunnen worden genoemd (met voorbeelden van procedures die voor deze stoffen kunnen worden gebruikt): azokleurstoffen en diazoverbindingen (3)(5)(6)(13), gassen en vluchtige stoffen (12)(14)(15)(16) en glycosiden (17)(18). Voor een afwijking van de standaardprocedure moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Voorbereiding**

1.5.1.1. *Bacteriën*

Verse bacterieculturen worden gekweekt tot het laat-exponentiële of vroeg-stationaire groeistadium (ongeveer 10^9 cellen per ml). Culturen in de laat-stationaire fase mogen niet worden gebruikt. Het is van essentieel belang dat de bij het experiment gebruikte culturen een hoog gehalte aan levensvatbare bacteriën bevatten. De titer kan aan de hand van gegevens over groeicurves uit in het verleden uitgevoerde controles worden bepaald of door met behulp van een uitplaatexperiment het aantal levensvatbare cellen te bepalen.

De aanbevolen incubatietemperatuur is 37 °C.

Er moeten ten minste vijf bacteriestammen worden gebruikt. Daarbij moeten vier stammen van *S. typhimurium* zijn (TA 1535, TA 1537, TA 97a of TA 97; Ta 98: en TA 100) waarvan is aangetoond dat de resultaten betrouwbaar en in verschillende laboratoria reproduceerbaar zijn. Deze vier stammen van S. typhimunum hebben GC-basenparen op de primaire terugmutatieplaats en het is bekend dat bepaalde oxiderende mutagenen, cross-linkende stoffen en hydrazines daarmee niet altijd worden gesignaleerd. Voor deze stoffen kunnen de stammen WP2 van *E. coli* of TA 102 van *S. typhimurium* worden gebruikt (19), die een AT-basenpaar op de primaire terugmutatieplaats hebben. Als combinatie van stammen wordt derhalve aanbevolen:

— TA 1535 van *S. typhimurium* en

— TA 1537 of TA 97 of TA 97a van *S. typhimurium* en

— TA 98 van *S. typhimurium* en

— TA 100 van *S. typhimurium* en

— WP2 uvrA van *E. coli* of WP2 uvrA (pKM101) van *E. coli* of TA 102 van *S. typhimurium*.

Om cross-linkende mutagenen te signaleren kan het de voorkeur verdienen TA 102 of een stam van *E. coli* die bedreven is in DNA-herstel (bv. WP2 (pKM101) van E. coli) te gebruiken.

▼B

Er moeten erkende procedures voor de bereiding van voorraadculturen, markercontrole en opslag worden gebruikt. Voor elk preparaat van de ingevroren voorraadcultuur moet de aminozuurafhankelijkheid voor de groei worden aangetoond (histidine voor stammen van *S. typhimurium* en tryptofaan voor stammen van *E. coli*). Ook ander fenotypekenmerken moeten worden gecontroleerd, namelijk: de aan- of afwezigheid van plasmiden met de R-factor, indien van toepassing (bv. resistentie tegen ampicilline bij de stammen TA 98, TA 100 en TA 97a of TA 97, WP2 uvrA en WP2 uvrA (pKM101) en resistentie tegen ampicilline en tetracycline bij stam TA 102); de aanwezigheid van karakteristieke mutaties (bv. de rfa-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor kristalviolet en de uvrA-mutatie bij *E. coli* of de uvrB-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor ultraviolet licht) (2)(3). Bij de stammen moeten ook spontane terugmutantkolonies voorkomen met een frequentie die ligt binnen het interval dat op grond van controlegegevens van het laboratorium uit het verleden kan worden verwacht en bij voorkeur binnen het interval dat in de literatuur wordt opgegeven.

1.5.1.2. *Medium*

Er wordt gebruikgemaakt van een geschikte minimale agar (bv. met minimaal medium E van Vogel-Bonner en glucose) en een topagar met histidine en bioline of tryptofaan om een aantal celdelingen mogelijk te maken (1)(2)(9).

1.5.1.3. *Metabole activering*

De bacteriën dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (1)(2) of een combinatie van fenobarbiton en ß-naftoflavon (18)(20)(21). De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 5 tot 30 % (v/v) in het S9-mengsel. De keuze en de omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen kan het nuttig zijn meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie te gebruiken. Voor azokleurstoffen en diazoverbindingen kan wellicht beter een reductief metabool activeringssysteem worden gebruikt (6)(13).

1.5.1.4. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspendeerd en eventueel vóór de behandeling van de bacteriën worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het test-systeem worden toegediend en/of vóór behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen worden gebruikt.

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de bacteriën en de S9-activiteit (22). Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn.

▼B

1.5.2. **Testomstandigheden**

1.5.2.1. *Teststammen (zie punt 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de bepaling van de grootste te gebruiken hoeveelheid teststof moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid in het uiteindelijke behandelingsmengsel.

Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de toxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen. De cytotoxiciteit kan worden bepaald aan de hand van een daling in het aantal terugmutantkolonies, een opheldering of afname van de achtergrond of de mate waarin de behandelde culturen overleven. De cytotoxiciteit van een stof kan in aanwezigheid van een metabool activeringssysteem veranderen. De oplosbaarheid moet worden beoordeeld aan de hand van het met het blote oog zichtbare neerslaggedrag in het uiteindelijke mengsel onder de feitelijke testomstandigheden.

De aanbevolen maximale concentratie voor oplosbare niet-cytotoxische stoffen is 5 mg/plaat of 5 µl/plaat. Voor niet-cytotoxische stoffen die bij 5 mg/plaat of 5 µl/plaat niet oplosbaar zijn, moet een of meer van de geteste concentraties in het uiteindelijke behandelingsmengsel onoplosbaar zijn. Teststoffen die al bij lagere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µl/plaat cytotoxisch zijn, moeten tot een cytotoxische concentratie worden getest. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

Er moeten ten minste vijf analyseerbare concentraties van de teststof worden gebruikt met ongeveer een half log-interval (d.w.z. een factor $\sqrt{10}$) tussen de concentraties voor een eerste experiment. Kleinere intervallen kunnen nuttig zijn wanneer het verband tussen concentratie en respons wordt onderzocht. Hogere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µl/plaat kunnen worden overwogen bij de beoordeling van stoffen die significante hoeveelheden potentieel mutagene verontreinigingen bevatten.

1.5.2.3. *Negatieve en positieve controles*

Bij elke bepaling moeten tegelijkertijd stamspecifieke positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat voor elke bepaling wordt aangetoond dat deze correcte resultaten oplevert.

Voor bepalingen waarbij een metabool activeringssysteem wordt gebruikt, moet(en) de voor de positieve controle gebruikte referentiestof(fen) op basis van de aard van de gebruikte bacteriestam worden gekozen.

Voor bepalingen met metabole activering kunnen als positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	Cas-nr	Einecs-nr.
9,10-dimethylanthraceen	78l-43-l	212-308-4
7,12-dimethylbenz[a]anthraceen	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraceen	613-13-8	210-330-9

▼B

Stof	Cas-nr	Einecs-nr.
Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	

Voor de methode met reductieve metabole activering kan als positieve controle worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Kongo rood	5 7 3-58-0	209-358-4

2-aminoantraceen mag niet als enige indicator voor de werkzaamheid van het S9-mengsel worden gebruikt. Als 2-aminoantraceen wordt gebruikt, moet elke charge S9 ook worden gekarakteriseerd met een mutageen waarvoor metabole activering met microsomale enzymen nodig is, zoals benzo[a]pyreen of dimethylbenzant-raceen.

Voor bepalingen zonder exogeen metabool activeringssysteem kunnen als stamspecifieke positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.	Stam
Natriumazide	26628-22-S	247-852-1	TA 1535 en TA 100
2-nitrofluoreen	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridine	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 en TA 97a
ICR 191	1 7070-4 5-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 en TA 97a
Cumeenhydroperoxide	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA en TA 102
N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
4-nitroquinoline-1-oxide	56-5 7-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Stammen die plasmiden bevatten

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

In het experiment dienen negatieve controles te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium zonder teststof wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

▼B

1.5.3. **Uitvoering**

Voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1)(2)(3)(4) zonder metabole activering wordt meestal 0,05 ml of 0,1 ml testoplossing, 0,1 ml verse bacteriecultuur (met ongeveer 10^8 levensvatbare cellen) en 0,5 ml steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. Voor de bepaling met metabole activering wordt meestal 0,5 ml van het metabool activeringsmengsel met een afdoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie (tussen 5 en 30 % (v/v) in het metabole activeringsmengsel) gemengd met de topagar (2,0 ml), de bacteriën en de test-stof/testoplossing. De inhoud van elke buis wordt gemengd en uitgegoten over het oppervlak van een minimale agarplaat. De topagar krijgt voor de incubatie de gelegenheid te stollen.

Voor de preïncubatiemethode (2)(3)(5)(6) wordt de teststof/testoplossing gepreïncubeerd met de teststam (met ongeveer 10^8 levensvatbare cellen) en steriele buffer of het metabole activeringssysteem (0,5 ml), meestal gedurende minimaal 20 minuten bij 30-37 °C, en vervolgens gemengd met de topagar en uitgegoten over het oppervlak van een minimale agarplaat. Meestal wordt 0,05 ml of 0,1 ml teststof/testoplossing, 0,1 ml bacteriën en 0,5 ml S9-mengsel of steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. De buizen dienen gedurende de preïncubatie met behulp van een schudmachine te worden belucht.

Om een adequate raming van de spreiding te kunnen maken moeten voor elk dosisniveau drie platen worden gebruikt. Het gebruik van twee platen is aanvaardbaar wanneer daarvoor een wetenschappelijke motivering wordt gegeven. Wanneer nu en dan een plaat verloren gaat, maakt dit de bepaling niet noodzakelijkerwijs onbruikbaar.

Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (12)(14)(15)(16).

1.5.4. **Incubatie**

Alle platen voor een bepaling worden gedurende 48-72 uur bij 37 °C geïncubeerd. Na de incubatieperiode wordt het aantal terugmutantkolonies per plaat geteld.

2. **GEGEVENS**

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens worden vermeld als het aantal terugmutantkolonies per plaat. Daarnaast moet ook het aantal terugmutantkolonies op de platen voor zowel negatieve (oplosmiddel en zonder behandeling, indien gebruikt) als positieve controle worden vermeld. Voor zowel de teststof als de positieve en negatieve (zonder behandeling en/of oplosmiddel) controle, moeten de tellingen per plaat, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en de standaardafwijking worden vermeld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervolgexperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen, de wijze van behandeling (geïntegreerde voedingsbodem of preïncubatie in vloeistof) en de omstandigheden bij metabole activering.

▼B

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke stijging op het geteste interval en/of een reproduceerbare stijging bij een of meer concentraties van het aantal terugmutantkolonies per plaat bij ten minste één stam met of zonder metabool activeringssysteem (23). In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (24). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de terugmutatietest met bacteriën wijzen erop dat de teststof puntmutaties door basen-paarvervanging of leesraamverschuiving in het genoom van *Salmonella typhimurium* en/of *Escherichia coli* induceeert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden bij de geteste soort niet mutageen is.

3. **RAPPORTAGE**

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

— motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Stammen:

— gebruikte stammen;

— aantal cellen per cultuur;

— kenmerken van de stam.

Testomstandigheden:

— hoeveelheid teststof per plaat (in mg/plaat of (µl/plaat) met vermelding van de achtergrond voor de keuze van de dosis en het aantal platen per concentratie;

— gebruikte media;

— aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;

— procedures voor de behandeling.

Resultaten:

— tekenen van toxiciteit;

— neerslagverschijnselen;

— tellingen per plaat;

▼B

— gemiddeld aantal terugmutantkolonies per plaat met de standaardafwijking;

— indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;

— eventuele statistische analyses;

— gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;

— gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L.D., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray, V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program. Mutation Res., 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao. M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner. R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, pp. 167-177.

(9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and Bridges, J.W. (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M, Nichols, W. and Ramel, C. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994). lmproved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, pp. 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, pp. 33-47.

(14) Zeiger. E., Anderson, B.E.. Haworth. S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis. 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: „*In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing". Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., 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, (21) pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88. pp. 343-350.

(23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L, Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼B

B.17. **MUTAGENITEIT — *IN-VITRO* GENMUTATIETEST MET ZOOGDIERCELLEN**

1. **METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 476 van de OESO: In-vitro genmutatietest met zoogdiercellen (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vitro genmutatietest met zoogdiercellen kan worden gebruikt voor de detectie van genmutaties die door chemische stoffen zijn geïnduceerd. Geschikte cellijnen zijn bijvoorbeeld de L5178Y-muizenlymfoomcellen, de cellijnen CHO, CHO-AS52 en V79 van Chinese hamsters en de humane TK6-lymfoblastoïdcellen (1). Bij deze cellijnen zijn de meest gangbare genetische eindpunten: een mutatie bij thymidinekinase (TK), hypoxan-thineguanine-fosforibosyltransferase (HPRT) en transgeen xanthine-guanine-fosforibosyltransferase (XPRT). Bij de mutatietests met TK, HPRT en XPRT worden verschillende spectra van genetische gebeurtenissen gedetecteerd. Door de ligging van TK en XPRT op autosomen kunnen genetische gebeurtenissen worden gedetecteerd (bv. grote deleties) die niet op de HPRT-locus op X-chromosomen worden gesignaleerd (2)(3)(4)(5)(6).

Bij de in-vitro genmutatietest met zoogdiercellen kunnen culturen van permanente cellijnen of celstammen worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur en de stabiliteit van de spontane mutatiefrequentie.

Bij *in vitro* uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel *in vivo* niet volledig nabootsen. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit, worden vermeden. Positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit kunnen ontstaan door veranderingen in de pH of de osmolaliteit of een sterke cytotoxiciteit (7).

Deze test wordt gebruikt voor de screening op mogelijke mutagenen en carcinogenen voor zoogdieren. Veel stoffen die positief op deze test reageren, zijn carcinogeen voor zoogdieren, maar er is geen absolute correlatie tussen deze test en carcinogeniteit. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en het lijkt er steeds meer op dat er carcinogenen zijn die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze blijkbaar via andere niet-genotoxische of in bacteriecellen afwezige mechanismen werken (6).

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Voorwaartse mutatie: een genmutatie van het oudertype naar de mutantvorm die leidt tot wijziging of verlies van de enzymactiviteit of de functie van het gecodeerde eiwit.

Mutageen met basenpaarvervanging: een stof die vervanging van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt.

Mutageen met leesraamverschuiving: een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA-molecuul veroorzaakt.

▼B

Fenotypische expressietijd: de periode gedurende welke ongewijzigde genproducten uit pas gemuteerde cellen verdwijnen.

Mutantfrequentie: de verhouding tussen het aantal waargenomen mutantcellen en het aantal levensvatbare cellen.

Relatieve totale groei: de toename van het aantal cellen in de loop van de tijd in vergelijking met een controle-celpopulatie, berekend als het product van de suspensiegroei in vergelijking met de negatieve controle en de kloneringsefficiéntie in vergelijking met de negatieve controle.

Relatieve suspensiegroei: de toename van het aantal cellen tijdens de expressieperiode in vergelijking met de negatieve controle.

Levensvatbaarheid: de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten in selectieve omstandigheden na de expressieperiode.

Overleving: de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten aan het eind van de behandelingsperiode; de overleving wordt meestal uitgedrukt in vergelijking met de controlecelpopulatie.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Cellen met een deficiëntie aan thymidinekinase (TK) door de mutatie TK+/- —> TK -/- zijn resistent voor de cytotoxische effecten van de pyrimidine-analoog trifluorthymidine (TFT). Cellen zonder deficiëntie aan thymidinekinase zijn gevoelig voor TFT, waardoor het celmetabolisme wordt geremd en er geen celdeling meer plaatsvindt. Dit betekent dat mutantcellen zich in aanwezigheid van TFT kunnen voortplanten en normale cellen, die thymidinekinase bevatten, niet. Analoog hieraan worden ook cellen met een deficiëntie aan HPRT of XPRT geselecteerd door resistentie voor 6-thioguanine (TG) of 8-azaguanine (AG). De eigenschappen van de teststof moeten zorgvuldig worden bekeken als een base-analoog of een met de selecterende stof verwante verbinding aan een van de genmutatietests met zoogdiercellen wordt onderworpen. Eventuele vermoedens omtrent selectieve toxiciteit van de teststof bij mutantcellen en gewone cellen moeten nader worden onderzocht. Bij het testen van chemische stoffen die verwant zijn met de selecterende stof moet worden bevestigd of het selectiesysteem en de selecterende stof bruikbaar zijn (8).

Cellen in een suspensie of een monolaagcultuur worden zowel met als zonder metabole activering gedurende een geschikte periode aan de teststof blootgesteld en overgeënt om de cytotoxiciteit te bepalen en fenotypische expressie mogelijk te maken alvorens de mutanten te selecteren (9)(10)(l l)(12)(13). De cytotoxiciteit wordt meestal bepaald door de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen na de behandelingsperiode te meten. De behandelde culturen blijven een voldoende lange periode, kenmerkend voor elke locus en elk celtype, in groeimedium om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken. De mutantfrequentie wordt bepaald door bekende aantallen cellen te enten in medium met de selecterende stof voor de detectie van mutantcellen en in medium zonder de selecterende stof voor de bepaling van de kloneringsefficiëntie (levensvatbaarheid). Na een geschikte incubatietijd worden de kolonies geteld. De mutantfrequentie wordt bepaald aan de hand van het aantal mutantkolonies in het selectieve medium en het aantal kolonies in het niet-selectieve medium.

▼B

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Voorbereiding**

1.4.1.1. *Cellen*

Er kunnen verschillende soorten cellen voor deze test worden gebruikt, zoals subklonen van de cellijnen L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 of TK6. Van de bij deze test gebruikte cellen moet worden aangetoond dat ze gevoelig zijn voor chemische mutagenen en een hoge kloneringsefficiëntie en een stabiele spontane mutantfrequentie hebben. De cellen moeten op besmetting met mycoplasma worden gecontroleerd en mogen bij besmetting niet worden gebruikt.

De test moet zodanig worden opgezet dat deze een vooraf bepaalde gevoeligheid en onderscheidingsvermogen heeft. Het aantal cellen, culturen en concentraties van de teststof moet aan de hand van deze vooraf bepaalde parameters worden gekozen (14). Het minimale aantal levensvatbare cellen dat de behandeling overleeft en bij elke fase van de test wordt gebruikt, moet op basis van de spontane mutatiefrequentie worden gekozen. Een vuistregel is dat het gebruikte aantal cellen ten minste tien keer zo groot moet zijn als de inverse van de spontane mutatiefrequentie. Aanbevolen wordt echter ten minste 10^6 cellen te gebruiken. Er moeten afdoende gegevens uit het verleden over het gebruikte celsysteem beschikbaar zijn om aan te kunnen nemen dat de test consistente resultaten oplevert.

1.4.1.2. *Media en kweekomstandigheden*

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat), temperatuur, CO_2-concentratie, en vochtigheid). De media moeten worden gekozen op basis van de bij de test gebruikte selectieve systemen en celtypes. Het is vooral belangrijk dat de kweekomstandigheden zodanig worden gekozen dat de celgroei tijdens de expressieperiode en het kolonievormend vermogen van zowel de mutantcellen als de gewone cellen optimaal zijn.

1.4.1.3. *Bereiding van de culturen*

Cellen uit stamculturen worden in een kweekmedium geënt en bij 37 °C geïncubeerd. Het is wellicht nodig reeds aanwezige mutantcellen uit de cultuur te verwijderen voordat deze voor de test wordt gebruikt.

1.4.1.4. *Metabole activering*

De cellen dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) of een combinatie van fenobarbiton en b-naftoflavon (19)(20).

De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10 % (v/v) in het uiteindelijke medium. De keuze en omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen zal wellicht meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie moeten worden gebruikt.

▼B

Een aantal ontwikkelingen, bijvoorbeeld de opbouw van genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen tot expressie komen, kan endogene activering mogelijk maken. Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van het cytochroom P450-isoenzym vuur het metabolisme van de teststof).

1.4.1.5. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspendeerd en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. **Testomstandigheden**

1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de cellen en de S9-activiteit. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn. Water kan door toevoeging van een moleculaire zeef worden verwijderd.

1.4.2.2. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de bepaling van de hoogste concentratie moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit, de oplosbaarheid in het testsysteem en veranderingen in de pH of de osmolaliteit.

De cytotoxiciteit moet met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment worden bepaald aan de hand van adequate indicaties omtrent de integriteit en de groei van de cellen, zoals de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei. Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

Er moeten ten minste vier analyseerbare concentraties worden gebruikt. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten deze concentraties een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken; dit betekent meestal dat de concentratieniveaus niet meer dan een factor 2 tot √10 uit elkaar mogen liggen. Als de maximale concentratie op cytotoxische eflecten is gebaseerd, moet de relatieve overleving (relatieve kloneringsefficiëntie) of de relatieve totale groei daarbij op ongeveer 10-20 % liggen (maar niet lager dan 10 %). Bij stoffen met een betrekkelijk geringe cytotoxiciteit moet de maximale concentratie 5 mg/ml, 5 µl/ml of 0,01 M (de laagste van deze drie) zijn.

▼B

Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen moet de hoogste dosis bij of boven de oplosbaarheidsgrens onder de kweekomstandigheden liggen. De oplosbaarheidsgegevens moeten worden bepaald in het uiteindelijke behandelingsmedium waaraan de cellen worden blootgesteld. Het kan nuttig zijn de oplosbaarheid aan het begin en het eind van de behandeling te bepalen, aangezien de oplosbaarheid tijdens de blootstelling in het testsysteem door de aanwezigheid van bijvoorbeeld cellen. S9 of serum kan veranderen. Onoplosbaarheid kan met het blote oog worden geconstateerd. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

1.4.2.3. *Controles*

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. Wanneer metabole activering wordt gebruikt, moet de voor de positieve controle gebruikte chemische stof activering vereisen om een mutagene reactie te veroorzaken.

Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Metabole activering	Locus	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Zonder exogene metabole activering	HPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosoureum	759-73-9	212-072-2
	TK (kleine en grote kolonies)	Methylmethaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosoureum	759-73-9	212-072-2
Met exogene metabole activering	HPRT	3-Methylcholanthreen	56-49-5	200-276-4
		N-.Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-549-8
		7,1 2-Dimethylbenzanthraceen	57-97-6	200-359-5
	TK (kleine en grote kolonies)	Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
		Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	
		Benzo[*a*]pyreen	50-32-8	200-028-5
		3-Methvlcholanthreen	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimethylamine (voor hoge concentraties van S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5

Ook andere geschikte referentiestoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt, bijvoorbeeld 5-broom-2'-deoxyuridine (CAS-nr. 59-14-3 en EINECS-nr. 200-415-9) als het laboratorium over referentiegegevens uit het verleden beschikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

▼B

Er dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de testgroepen worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.4.3. **Uitvoering**

1.4.3.1. *Behandeling met de teststof*

Delende cellen worden zowel met als zonder metabole activering aan de teststof blootgesteld. De blootstelling moet gedurende een geschikte periode worden uitgevoerd (meestal is drie tot zes uur voldoende). De blootstelling kan een of meer celcycli beslaan.

Voor elke concentratie kan de bepaling met één behandelde cultuur of in duplo worden uitgevoerd. Wanneer één cultuur wordt gebruikt, moet het aantal concentraties worden verhoogd om ervoor te zorgen dat een afdoende aantal culturen kan worden geanalyseerd (d.w.z. ten minste acht analyseerbare concentraties). Voor de negatieve controle (oplosmiddel) moeten duploculturen worden gebruikt.

Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (21)(22).

1.4.3.2. *Meting van de overleving, de levensvatbaarheid en de mutatiefrequentie*

Aan het eind van de blootstellingsperiode worden de cellen gewassen en gekweekt om de overleving te bepalen en expressie van het mutantfenotype mogelijk te maken. Meestal wordt na de behandelingsperiode begonnen met de meting van de cytotoxiciteit door bepaling van de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen.

Voor elke locus is er een bepaalde minimale tijd nodig om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken (voor HPRT en XPRT is ten minste zes tot acht dagen nodig en voor TK ten minste twee dagen). De cellen worden gekweekt in medium met en zonder de selecterende stof(fen) om respectievelijk het aantal mutanten en de kloneringsefficiëntie te bepalen. Aan het eind van de expressieperiode wordt een begin gemaakt met de meting van de levensvatbaarheid (gebruikt voor de berekening van de mutantfrequentie) door uitplating in het niet-selectieve medium.

Als de teststof positief reageert of de $TK^{+/-}$-test met L5178Y, moet bij ten minste een van de testculturen (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de teststof negatief reageert op de $TK^{+/-}$-test met L5178Y, moet bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de $TK^{+/-}$-test met TK6 wordt gebruikt, kan de grootte van de kolonies ook worden geïnventariseerd.

▼B

2. **GEGEVENS**

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Er moeten gegevens worden verstrekt over de bepaling van de cytotoxiciteit en de levensvatbaarheid, het aantal kolonies en de mutantfrequentie bij de behandelde en de controleculturen. Als de teststof positief reageert op de $TK^{+/-}$-test met L5178Y, moeten de kolonies bij ten minste één concentratie van de teststof (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles worden gescoord aan de hand van de criteria voor grote en kleine kolonies. Er is een gedetailleerde analyse gemaakt van de moleculaire en cytogenetische aard van zowel grote als kleine mutantkolonies (23)(24). Bij de $TK^{+/-}$-test worden de kolonies gescoord aan de hand van de criteria voor normale groei (grote kolonies) en langzame groei (kleine kolonies) (25). Mutantcellen die de omvangrijkste genetische beschadigingen hebben opgelopen, hebben een langere verdubbelingstijd en vormen derhalve kleine kolonies. De omvang van deze beschadiging varieert meestal van verlies van het hele gen tot karyotypisch zichtbare chromosoomafwijkingen. Er is een verband gelegd tussen mutanten met kleine kolonies en chemische stoffen die grootschalige chromosoomafwijkingen induceren (26). Minder ernstig aangetaste mutantcellen hebben een groeitempo dat vergelijkbaar is met de oudercellen en vormen grote kolonies.

De overleving (relatieve kloneringsefiiciëntie) of de relatieve totale groei moet worden vermeld. De mutantfrequentie moet worden uitgedrukt als de verhouding tussen het aantal mutantcellen en het aantal overlevende cellen.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet er een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden samengesteld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervolgexperimenten na onduidelijke of negatieve resultaten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen en de omstandigheden bij metabole activering.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een reproduceerbare stijging van de mutantfrequentie. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof in dit systeem als niet-mutageen beschouwd.

▼B

Hoewel de meeste studies duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vitro genmutatietest met zoogdiercellen wijzen erop dat de teststof in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen oenmutaties induceert. Het duidelijkst is een positieve concentratieafhankelijke respons die reproduceerbaar is. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen geen genmutaties induceert.

3. **RAPPORTAGE**

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

— motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Cellen:

— aard en herkomst van de cellen;

— aantal celculturen;

— aantal overentingen, indien van toepassing;

— methoden om de celcultuur in leven te houden, indien van toepassing;

— afwezigheid van mycoplasma.

Testomstandigheden:

— achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;

— samenstelling van het medium, CO_2-concentratie;

— concentratie van de teststof;

— toegevoegd volume medium en teststof;

— incubatietemperatuur;

— incubatietijd;

— duur van de behandeling;

— celdichtheid bij de behandeling;

— aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscntena;

— positieve en negatieve controles;

▼B

— lengte van de expressieperiode (met vermelding van het aantal geënte cellen en schema's voor enting en overenting, indien van toepassing;

— selecterende stoften;

— criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;

— methoden die zijn gebruikt om het aantal levensvatbare en mutantcellen te bepalen;

— definitie van kolonies van een bepaalde omvang en aard (bv. criteria voor „kleine" en „grote" kolonies).

Resultaten:

— tekenen van toxiciteit;

— neerslagverschijnselen;

— gegevens over de pH en de osmolaliteit tijdens de blootstelling aan de teststof, indien bepaald;

— grootte van een gescoorde kolonie voor ten minste de negatieve en positieve controles;

— mogelijkheden van het laboratorium voor de detectie van mutanten met een kleine kolonie bij de $TK^{+/-}$-test met L5178Y, indien van toepassing;

— indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;

— eventuele statistische analyses;

— gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;

— gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;

— mutantfrequentie.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E.H.Y. and Mailing, 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, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H.I. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res., 94, pp. 467-485.

(4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 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 Six Drug Candidates Mutation Res., 223, pp. 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, pp. 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, I. and Myhr. B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavoumin. 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, pp. 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 Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 196, pp. 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, pp. 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, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L.F.Jr., Tindall, K.R., and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191 Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR-191 Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, pp. 133-147.

(13) Turner, N.T., Baltson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers. New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays. Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 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 Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, pp. 365-373.

(16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicïty Test. Mutation Res., 31, pp. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson. K.O., Spector. J.H.S.. Batson A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterisation of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, pp. 61-108.

(18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(19) Elliott, 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-lnduced S9 in: *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara. K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot. R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 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 Airborne Agents. New York. Plenum, pp. 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 Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5. pp. 79 5-801.

(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, pp. 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 Trifluorothymidine-Resistant (TFT^{1}) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, pp. 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, pp. 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, pp. 609-614.

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **ZOOGDIERENCELTRANSFORMATIETEST *IN VITRO***

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. DEFINITIE

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE ONDERZOEKMETHODE

Cultuursystemen van zoogdierencellen kunnen worden gebruikt voor het onderzoek van fenotypische veranderingen *in vitro* die worden geïnduceerd door chemische stoffen die betrokken zijn bij maligne transformaties *in vivo*. Algemeen gebruikte cellen zijn onder meer C3H10T½, 3T3, SHE, en Fischer-rat. De test is gebaseerd op wijzigingen in de celmorfologie, focusvorming of wijzigingen in de afhankelijkheid van de aanhechting in halfvast agar. Er bestaan andere, minder gebruikte systemen die andere fysiologische of morfologische wijzigingen in cellen ten gevolge van blootstelling aan carcinogene chemische stoffen opsporen. Van geen van de eindpunten van de *in-vitro*-proef staat vast dat er een mechanistische band is met kanker. Met enkele testsystemen kunnen tumorpromotoren worden opgespoord. Cytotoxiciteit kan worden bepaald door meting van het effect van de teststof op de kolonievorming (cloningsefficiëntie) of de groeisnelheid van de culturen. De cytotoxiciteitsbepaling kan worden gebruikt om vast te stellen dat blootstelling aan de teststof een toxisch effect heeft gehad, maar kan niet in alle testen worden gebruikt om de transformatiefrequentie te berekenen, aangezien voor sommige testen een langere incubatie en/of opnieuw uitplaten noodzakelijk kunnen zijn.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKMETHODE

Voorbereidingen

C e l l e n

Een verscheidenheid aan cellijnen of primaire cellen is beschikbaar afhankelijk van de toegepaste transformatietest. De onderzoeker moet nagaan of de cellen voor de uit te voeren proef na blootstelling aan bekende carcinogenen de juiste fenotypische wijzigingen vertonen en dient ervoor te zorgen dat de validiteit en betrouwbaarheid van de in zijn laboratorium uitgevoerde test aangetoond en gedocumenteerd wordt.

M e d i u m

De gebruikte media en proefomstandigheden dienen geschikt te zijn voor de uit te voeren transformatietesten.

▼B

Teststof

De teststof mag in cultuurmedia worden bereid of voor de behandeling van de cellen worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte middelen. De uiteindelijke concentratie van het (oplos)middel in het cultuursysteem mag de levensvatbaarheid van de cellen, de groeisnelheid of de mate van voorkomen van transformaties niet beïnvloeden.

Metabole activering

De cellen dienen met en zonder geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Indien evenwel celsoorten worden gebruikt met een intrinsieke metabole activiteit, moet worden nagegaan of de aard van de activiteit geschikt is voor de onderzochte chemische klasse.

Proefomstandigheden

Gebruik van positieve en negatieve controles

Voor elke proef moet een positieve controle worden uitgevoerd waarbij zowel een rechtstreeks werkende verbinding als een verbinding die metabole activering vereist, moeten worden meegenomen: er dient eveneens een negatieve (oplos)middelcontrole te worden gebruikt.

Hierna volgen voorbeelden van stoffen die als positieve controle kunnen worden gebruikt:

— Direct werkende stoffen:

  — ethylmethaansulfonaat,

  — β-propiolacton;

— Verbindingen die metabole activering vereisen:

  — 2-acetylaminofluoreen,

  — 4-dimethylaminoazobenzeen,

  — 7,12-dimethylbenzanthraceen.

Wanneer dat van toepassing is, dient een aanvullende positieve controle van dezelfde chemische klasse als de teststof te worden uitgevoerd.

Blootstellingsconcentraties

Meerdere concentraties van de teststof moeten worden gebruikt. Deze concentraties moeten een concentratieafhankelijk toxisch effect veroorzaken waarbij de hoogste concentratie een laag overlevingspeil geeft en de overleving in de laagste concentratie nagenoeg dezelfde is als die in de negatieve controle. In water relatief onoplosbare stoffen dienen met behulp van geschikte methoden tot de uiterste oplosbaarheidsgrens te worden onderzocht. Voor volledig in water oplosbare, niet-toxische stoffen dient de hoogste concentratie per geval te worden bepaald.

▼B

Uitvoering

De cellen moeten voldoende lang worden blootgesteld. De tijd is afhankelijk van het toegepaste testsysteem en bij langere blootstellingstijden kan het noodzakelijk zijn een nieuwe dosis toe te dienen en gelijktijdig het medium te veranderen (met indien noodzakelijk een vers metabool activeringsmengsel). Cellen met een ontoereikende intrinsieke metabole activiteit moeten met en zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof worden blootgesteld. Na de blootstellingsperiode wordt de teststof van de cellen gewassen en worden de cellen op cultuurmedia gebracht onder omstandigheden die gunstig zijn om het verschijnen van getransformeerde fenotypes te controleren en wordt de mate van voorkomen van de transformaties bepaald. Alle resultaten worden in een onafhankelijke proef bevestigd.

2. **GEGEVENS**

De gegevens moeten in tabellen worden samengevat en kunnen naar gelang van de gebruikte toets in diverse vormen worden voorgesteld, bijvoorbeeld plaattellingen, positieve platen of aantal getransformeerde cellen. Wanneer dat van toepassing is, dient de overleving te worden uitgedrukt als een percentage van het controleniveau en de transformatiefrequentie als het aantal transformaties per aantal overlevenden. De gegevens moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMING

In het verslag van de proef moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— gebruikt celtype, aantal celculturen, methode voor het in stand houden van celculturen;

— proefomstandigheden: concentratie van de teststof, gebruikt (oplos)middel, incubatietemperatuur, incubatietijd, duur en frequentie van de behandeling, celdichtheid tijdens de behandeling, type van het gebruikte exogeen metabool activeringssysteem, positieve en negatieve controles, specificatie van het onderzochte fenotype, gebruikt selectief systeem (wanneer dat van toepassing is); verantwoording voor de keuze van de doses;

— gebruikte methode voor het tellen van het aantal levensvatbare en getransformeerde cellen;

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

▼B

B.22. **ONDERZOEK NAAR DOMINANTE LETALE MUTATIES BIJ KNAAGDIEREN**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. DEFINITIES

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE ONDERZOEKMETHODE

Dominante letale effecten veroorzaken de dood van het embryo of van de foetus. De inductie van dominante letale mutaties door blootstelling aan een chemische stof wijst erop dat de stof het geslachtsweefsel van de proefdiersoort heeft aangetast. Algemeen wordt aangenomen dat dominante letale mutaties het gevolg zijn van beschadiging van de chromosomen (structurele en numerieke anomalieën). Als vrouwtjes worden behandeld, kan de dood van het embryo eveneens het gevolg zijn van toxische effecten.

In het algemeen worden mannetjes aan de teststof blootgesteld en met niet-behandelde, niet-gedekte vrouwtjes gepaard. De diverse geslachtscelstadia kunnen door middel van geregelde intervallen in de paring afzonderlijk worden onderzocht. De toename van het aantal dode implantaten per vrouwtje in de behandelde groep in vergelijking met het aantal dode implantaten per vrouwtje in de controlegroep geeft het verlies na implantatie weer. Het verlies voor implantatie kan worden geschat op grond van tellingen van de corpora lutea of door het totale aantal implantaten per vrouwtje in de behandelde en de controlegroep met elkaar te vergelijken. Het totale dominante letale effect is de som van het verlies voor en na de implantatie. De berekening van het totale dominante letale effect is gebaseerd op de vergelijking van de levende implantaten per vrouwtje in de testgroep met de levende implantaten per vrouwtje in de controlegroep. Een vermindering van het aantal implantaten op bepaalde tijdstippen kan het gevolg zijn van het doodgaan van cellen (bijvoorbeeld van spermatocyten en/of spermatogonia).

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKMETHODE

Voorbereidingen

Zo mogelijk moeten de teststoffen in een isotone zoutoplossing worden opgelost of gesuspendeerd. Niet in water oplosbare chemische stoffen kunnen in geschikte (oplos)middelen worden opgelost of gesuspendeerd. Het gebruikte (oplos)middel mag niet met de teststof interfereren en mag ook geen toxische effecten produceren. Er dienen verse bereidingen van de teststof te worden gebruikt.

▼B

Proefomstandigheden

Toedieningsweg

De teststof moet in het algemeen slechts eenmaal worden toegediend. Op grond van toxicologische gegevens kan een schema met herhaalde behandelingen worden gebruikt. De normale toedieningswegen zijn orale intubatie of intraperitoneale injectie. Andere toedieningswegen kunnen eveneens geschikt zijn.

Proefdieren

Ratten of muizen worden als proefdieren aanbevolen. Gezonde, geslachtelijk volledig rijpe dieren worden willekeurig ingedeeld in te behandelen groepen en controlegroepen.

Aantal en geslacht

Er dient een passend aantal behandelde mannetjes te worden gebruikt, rekening houdend met de spontane variatie van het te onderzoeken biologische kenmerk. Het gekozen aantal moet gebaseerd zijn op de van tevoren vastgestelde detectiegevoeligheid en significantie. Zo moet bijvoorbeeld bij een kenmerkende test het aantal mannetjes in elke dosisgroep voldoende zijn om per paringsinterval 30 à 50 drachtige vrouwtjes te hebben.

Negatieve en positieve controles

In het algemeen moet elk experiment parallelle positieve en negatieve (oplos)middelcontroles omvatten. Indien aanvaardbare positieve controleresultaten uit het recente verleden van in hetzelfde laboratorium verrichte experimenten beschikbaar zijn, kunnen deze worden gebruikt in plaats van een parallelle positieve controle. Positieve controlestoffen moeten in een voldoende lage dosis (bijvoorbeeld MMS, i.p., bij 10 mg/kg) worden gebruikt om de gevoeligheid van de test aan te tonen.

Dosisniveaus

Normaliter moeten drie dosisniveaus worden gebruikt. De hoge dosis moet bij de behandelde dieren tekenen van toxiciteit of verminderde vruchtbaarheid teweegbrengen. In sommige gevallen kan met één enkele hoge dosis worden volstaan.

Hoogste te testen dosis

Niet-toxische stoffen moeten in doses van 5 g/kg bij één enkele toediening of in doses van 1 g/kg/dag bij herhaalde toediening worden getest.

Uitvoering

Er zijn diverse behandelingsschema's beschikbaar. Enkelvoudige toediening van de teststof is de meest toegepaste methode. Er kunnen ook andere behandelingsschema's worden gebruikt.

Na de behandeling laat men individuele mannetjes opeenvolgend na geschikte intervallen, met een of twee niet-behandelde, nog niet-gedekte vrouwtjes paren. De vrouwtjes moeten bij de mannetjes worden gelaten gedurende ten minste één volledige oestruscyclus of tot op het ogenblik dat de paring heeft plaatsgevonden, hetgeen wordt bepaald door de aanwezigheid van sperma in de vagina of door de aanwezigheid van een vaginale plug.

▼B

Het aantal paringen na de behandeling is afhankelijk van het behandelingsschema en moet groot genoeg zijn om alle geslachtscelstadia na de behandeling te kunnen onderzoeken.

De vrouwtjes worden in de tweede helft van de dracht gedood en de inhoud van de uterus wordt onderzocht om het aantal dode en levende implantaties te bepalen. Ook de eierstokken kunnen worden onderzocht om het aantal corpora lutea te bepalen.

2. **GEGEVENS**

De volgende gegevens moeten in tabellen worden weergegeven: aantal mannetjes, aantal drachtige vrouwtjes en aantal niet-drachtige vrouwtjes. De resultaten van elke paring, met inbegrip van de identiteit van elk mannetje en elk vrouwtje, moeten afzonderlijk worden gerapporteerd. Voor elk vrouwtje moet de week van de paring, het dosisniveau van het mannetje en de frequentie van levende en dode implantaten worden aangegeven.

De berekening van het totale dominante letale effect is gebaseerd op de vergelijking van de levende implantaten per vrouwtje in de testgroep met de levende implantaten per vrouwtje in de controlegroep. De verhouding tussen dode en levende implantaten bij de behandelde groep, vergeleken met dezelfde verhouding bij de controlegroep, wordt geanalyseerd om het verlies na implantatie na te gaan.

Als de gegevens van vroegtijdige en laattijdige sterften worden geregistreerd, moet dat uit de tabellen duidelijk blijken. Als het verlies vóór implantatie wordt geschat, moet dat worden gerapporteerd. Het verlies vóór implantatie kan worden berekend als een discrepantie tussen het aantal corpora lutea en het aantal implantaten of als een daling van het gemiddelde aantal implantaten per uterus in vergelijking met controleparingen.

De gegevens worden met behulp van geschikte statistische methoden geëvalueerd.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— diersoort, stam, leeftijd en gewicht van de gebruikte dieren, aantal dieren van elk geslacht in de experimentele en controlegroepen;

— teststof, (oplos)middel, geteste dosisniveaus en verantwoording voor de selectie van de dosering, negatieve en positieve controles, gegevens over de toxiciteit;

— expositiewijze en -duur;

— paringsschema;

— gebruikte methode om te bepalen dat de paring heeft plaatsgevonden;

— tijdstip waarop de dieren worden gedood;

— criteria voor de beoordeling van dominante letale mutaties;

— dosis/responsverhouding (waar dat van toepassing is);

▼B

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

▼B

B.23. TEST OP CHROMOSOOMAFWIJKINGEN IN SPERMATOGONIA VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 48 3 van de OESO: Test op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren veroorzaken (1)(2)(3)(4)(5). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen: het chromosoomtype en het chromatidetype. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Deze methode is niet bedoeld om numerieke afwijkingen te meten en wordt meestal niet voor dat doel gebruikt. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens.

Bij deze test wordt gemeten wat er met de chromosomen van bepaalde kiemcellen (spermatogonia) gebeurt en op grond van het resultaat zullen wellicht voorspellingen kunnen worden gedaan over de inductie van erfelijke mutaties in kiemcellen.

Voor deze test worden meestal knaagdieren gebruikt. Het is een *in vivo* cytogenetische test waarbij chromosoomafwijkingen worden gedetecteerd die zich voordoen bij mitose van spermatogonia. De methode is niet geschikt voor andere doelweefsels.

Om afwijkingen van het chromatidetype in spermatogonia te detecteren, wordt de eerste mitose na de behandeling onderzocht, voordat deze beschadigingen bij latere celdelingen verloren gaan. Aanvullende informatie van behandelde spermatogoniastamcellen kan worden verkregen door de chromosomen bij de meiose te analyseren op afwijkingen van het chromosoomtype tijdens de diakinese-metafase I, wanneer de behandelde cellen spermatocyten worden.

Deze in-vivotest is bedoeld om na te gaan of mutagenen voor somatische cellen ook in kiemcellen mutageen zijn. Daarnaast is de test met spermatogonia geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme *in vivo*, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese.

De testis bevat een aantal generaties spermalogonia met een uiteenlopende gevoeligheid voor chemische stoffen. De geconstateerde afwijkingen vertegenwoordigen dan ook een gecombineerde respons van de behandelde spermatogoniacelpopulaties, waarbij de in grotere aantallen voorkomende gedifferentieerde spermatogonia overheersen. Afhankelijk van hun plaats binnen de testis kunnen verschillende generaties spermatogonia vanwege de fysische en fysiologische barrière van de cellen van Sertoli en de bloed-testisbarrière al dan niet via de grote bloedsomloop bereikbaar zijn.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metaboliet daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

▼B

1.2. DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype: structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype: structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Hiaat: een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Numerieke afwijking: een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte dieren.

Polyploïdie: het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen (*n*) dan het diploïde aantal (d.w.z. 3*n*, 4*n*, enz.).

Structurele afwijking: een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasestopper (bv. colchicine of Colcemid^{R}). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de kiemcellen gemaakt, die worden gekleurd; de cellen in de metafase worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Voorbereiding**

1.4.1.1. *Keuze van de diersoort*

Meestal worden mannetjes van Chinese hamsters of muizen gebruikt. Ook mannetjes van andere geschikte zoogdiersoorten komen echter in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde vowassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsver-schil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal ± 20 % van het gemiddelde gewicht bedragen.

1.4.1.2. *Huisvesting en voeding*

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreeld naar 50-60 %.

1.4.1.3. *Voorbereiding van de dieren.*

Gezonde jonge volwassen mannetjes worden aselect ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren voordat de test begint.

▼B

1.4.1.4. *Bereiding van de doseringen*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspendeerd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. **Testomstandigheden**

1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. *Controles*

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die *in vivo* structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia veroorzaakt bij toediening op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht.

De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Tevens kan waar mogelijk het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide-monomeer	79-06-1	201-173-7
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met chromosoomafwijkingen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

▼B

1.5. UITVOERING

1.5.1. **Aantal dieren**

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare mannetjes bevatten.

1.5.2. **Behandelingsschema**

De teststof wordt bij voorkeur een of twee keer (d.w.z. als één of twee behandelingen) toegediend. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. Voor een ander doseringsschema moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

In de hoogste doseringsgroep worden twee bemonsteringstijdstippen na de behandeling gebruikt. Aangezien de kinetiek van de celcyclus door de teststof kan worden beïnvloed, wordt er één vroeg en één laat bemonsteringstijdstip gebruikt rond 24 en 48 uur na de behandeling. Voor andere doses dan de hoogste dosering moet een bemonsteringstijdstip op 24 uur of 1,5-maal de lengte van de celcyclus na de behandeling worden gekozen, tenzij bekend is dat een ander bemonsteringstijdstip geschikter is voor de detectie van effecten (6).

Daarnaast kunnen ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt. Een vroeger bemonsteringstijdstip zal bijvoorbeeld wellicht beter zijn bij stoffen die tot achterblijvende chromosomen kunnen leiden of S-onafhankelijke effecten kunnen hebben (1).

Per geval moet worden onderzocht of een schema voor herhaalde behandeling nodig is. Na herhaalde behandeling worden de dieren 24 uur (1,5-maal de lengte van de celcyclus) na de laatste behandeling gedood. Waar mogelijk kunnen aanvullende bemonsteringstijdstippen worden gebruikt.

Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafase-stopper (bv. Colcemid^{R} of colchicine). De dieren worden na een adequate wachttijd bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer drie tot vijf uur worden gewacht en voor Chinese hamsters ongeveer vier tot vijf uur.

1.5.3. **Dosisniveaus**

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (7). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden.

▼B

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor de spermatogonia oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen cellen in spermatogniamitose en eerste en tweede meiosemetafase: deze daling mag niet groter zijn dan 50 %).

1.5.4. **Limiettest**

Als een test met één dosis minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. **Toediening van de doses**

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperi-toneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. **Chromosoompreparaten**

Onmiddellijk nadat het dier is gedood worden suspensies gemaakt van cellen uit één testis of beide testes en worden deze in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd.

1.5.7. **Analyse**

Voor elk dier worden minimaal 100 goed gespreide metafases geanalyseerd (d.w.z. ten minste 500 metafases per groep). Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd. Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatieprocedures vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen 2n ± 2 centromeren bevatten.

2. **GEGEVENS**

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk dier in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk dier apart moet het aantal cellen met structurele chromosoomafwijkingen en het aantal chromosoomafwijkingen per cel worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd maar meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen.

▼B

Als zowel mitose als meiose wordt geobserveerd, wordt als maat voor de cytotoxiciteit bij alle behandelde dieren en negatieve controles in een monster van in totaal 100 delende cellen per dier de verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase bepaald om een mogelijk cytotoxisch effect vast te stellen. Als alleen de mitose wordt geobserveerd, moet in ten minste 1 000 cellen voor elk dier de mitotische index worden bepaald.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het relatieve aantal cellen met chromosoomafwijkingen of een duidelijke stijging van het aantal cellen met afwijkingen bij één dosis en één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (8). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia wijzen erop dat de teststof in de kiemcellen van de geteste soort structurele chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de kiemcellen van de geteste soort geen chromosoomafwijkingen induceert.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in het doelweefsel terechtkomen, dient te worden besproken.

3. **RAPPORTAGE**

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

— Motivering voor de keuze van het medium;

— Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren:

— Gebruikte soort/stam;

— Aantal en leeftijd van de dieren;

— Herkomst, huisvesting, voeding, enz.;

— Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

▼B

Testomstandigheden:

— Gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd;

— Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;

— Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;

— Gegevens over de bereiding van de teststof;

— Gegevens over de toediening van de teststof;

— Achtergrond voor de keuze van het tijdstip waarop de dieren gedood worden;

— Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;

— Gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;

— Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema;

— Methoden voor de meting van de toxiciteit;

— Naam van de metafasestopper, gebruikt concentratie en blootstellingsduur;

— Methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;

— Criteria voor het scoren van afwijkingen;

— Aantal geanalyseerde cellen per dier;

— Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten:

— Tekenen van toxiciteit;

— Mitotische index;

— Verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase;

— Aard en aantal van de afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elk dier;

— Totaal aantal afwijkingen per groep;

— Aantal cellen met afwijkingen per groep;

— Indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;

— Eventuele statistische analyses;

— Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles;

— Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;

— Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles;

— Veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

▼B

4. **REFERENTIES**

(1) Adler, L.D., (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spcrmatogonia 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, pp. 477-484.

(2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry, IRL Press. Oxford, Washington DC. pp. 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. pp. 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, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res. 52. pp. 207-209.

(6) Adler, I.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, pp. 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, pp. 313-319.

(8) Lovell, D.P., Anderson. D., Albanese, R., Amphlett. G.E., Clare, 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 Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼M7

———————

▼B

B.25. **ERFELIJKE TRANSLOCATIE BIJ DE MUIS**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. DEFINITIE

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE ONDERZOEKMETHODE

Met de erfelijke translocatietest bij de muis worden structurele en numerieke wijzigingen in de geslachtscelchromosomen van zoogdieren gedetecteerd wanneer zij voorkomen in het nageslacht van de eerste generatie. De soorten chromosoomwijzigingen die gedetecteerd worden, zijn reciproke translocaties en indien het vrouwelijk nageslacht wordt meegerekend, verlies van het X-chromosoom. Dragers van translocaties en XO-vrouwtjes vertonen een verminderde vruchtbaarheid die wordt gebruikt voor de selectie van het F_1-nageslacht met het oog op een cytogenetische analyse. Volledige steriliteit wordt veroorzaakt door bepaalde soorten translocaties (X-autosoom en c-t). Translocaties worden cytogenetisch vastgesteld in meiotische cellen in de diakinesemetafase I van mannelijke dieren, hetzij F_1-mannetjes hetzij mannelijk nageslacht van F_1-vrouwtjes. De XO-vrouwtjes zijn cytogenetisch bepaald door de aanwezigheid van slechts 39 chromosomen in beenmergmitoses.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKMETHODE

Voorbereiding

De teststoffen worden opgelost in een isotonische zoutoplossing. Onoplosbare stoffen worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte (oplos)middelen. Er dienen vers bereide oplossingen van de testverbinding te worden gebruikt. Indien een (oplos)middel wordt gebruikt om het toedienen te vergemakkelijken, mag deze niet interfereren met de teststof en geen toxische effecten veroorzaken.

Toedieningsweg

De normale toedieningswegen zijn orale intubatie of intraperitoneale injectie. Ook andere toedieningswegen kunnen geschikt zijn.

Proefdieren

Deze proef wordt verricht met muizen die gemakkelijk zijn te kweken en cytologisch te analyseren. Er is geen specifieke stam vereist. De gemiddelde nestgrootte bij de stam moet echter groter zijn dan acht en relatief constant.

Er worden gezonde geslachtsrijpe dieren gebruikt.

▼B

Aantal dieren

Het vereiste aantal dieren wordt bepaald door de spontane translocatiefrequentie en het voor een positief resultaat vereiste minimale inductieniveau.

De proef wordt gewoonlijk uitgevoerd door analyse van het mannelijke F_1-nageslacht. Per dosisgroep dienen ten minste 500 mannelijke F_1-nakomelingen te worden onderzocht. Indien ook vrouwelijke F_1-nakomelingen bij het onderzoek worden betrokken, zijn 300 mannetjes en 300 vrouwtjes vereist.

Gebruik van negatieve en positieve controles

Geschikte controlegegevens, afkomstig van parallelle en historische controles, dienen beschikbaar te zijn. Indien aanvaardbare positieve controlegegevens beschikbaar zijn van experimenten die recent in hetzelfde laboratorium zijn uitgevoerd, kunnen deze resultaten gebruikt worden in plaats van een parallelle positieve controle.

Dosisniveau

Een dosisniveau wordt getest, gewoonlijk de hoogste dosis waarbij een minimaal toxisch effect wordt veroorzaakt zonder dat het reproductiegedrag of de overleving wordt beïnvloed. Om de dosis-responsverhouding vast te stellen, zijn nog twee lagere doses vereist. Voor niet-toxische stoffen dient blootstelling aan de hoogste dosis die is toe te passen te worden gebruikt.

Uitvoering

Behandeling en paring

Er zijn twee behandelingsschema's beschikbaar. Een enkele toediening van de teststof wordt het meest gebruikt. Ook kan de teststof zeven dagen per week gedurende 35 dagen worden toegediend. Het aantal paringen na de behandeling wordt bepaald door het behandelingsschema en dient voldoende groot te zijn om alle celstadia van de behandelde geslachtscellen te bemonsteren. Na de paringsperiode worden de vrouwtjes in afzonderlijke kooien ondergebracht. Bij de geboorte worden de datum, de nestgrootte en het geslacht van de nakomelingen geregistreerd. Alle mannelijke nakomelingen worden gespeend en de vrouwelijke nakomelingen worden niet gebruikt, tenzij ze worden meegenomen in de proef.

Onderzoek naar heterozygote translocaties

Een van de volgende twee methoden wordt gebruikt:

— vruchtbaarheidsonderzoek van het F_1-nageslacht gevolgd door onderzoek van eventuele translocatiedragers door middel van een cytogenetische analyse.

— Cytogenetische analyse van alle mannelijke F_1-nakomelingen zonder voorafgaande selectie op basis van een vruchtbaarheidsonderzoek.

a) Vruchtbaarheidsonderzoek

Verminderde vruchtbaarheid van een F_1-individu kan worden vastgesteld door observatie van de nestgrootte en/of analyse van de uterusinhoud van vrouwelijke dieren.

Er dienen criteria te worden vastgelegd voor het bepalen van normale en verminderde vruchtbaarheid van de gebruikte muizenstam.

▼B

Observatie van de nestgrootte: De te testen F_1-mannetjes worden in afzonderlijke kooien geplaatst met vrouwtjes van dezelfde proef of van de kolonie. De kooien worden dagelijks gecontroleerd vanaf de achttiende dag na de paring. Bij de geboorte worden de nestgrootte en het geslacht van de F_2-nakomelingen geregistreerd; hierna worden de nesten niet meer gebruikt. Indien vrouwelijke F_1-nakomelingen worden onderzocht, worden de F_2-nakomelingen uit kleine nesten voor verder onderzoek behouden. Vrouwelijke translocatiedragers worden opgespoord door cytogenetische analyse van een translocatie in een van de mannelijke nakomelingen. XO-vrouwtjes kunnen worden herkend door een verandering in de geslachtsverhouding van de nakomelingen van 1:1 naar 1:2 mannetjes/vrouwtjes. Bij een sequentiële methode worden normale F_1-dieren niet verder onderzocht indien het eerste F_2-nest een vooraf bepaalde normaalwaarde bereikt of overschrijdt; indien dit niet zo is, wordt een tweede of derde F_2-nest onderzocht.

F_1-dieren die niet als normaal kunnen worden geclassificeerd na observatie van maximaal drie F_2-nesten, worden hetzij verder onderzocht door analyse van de uterusinhoud van vrouwelijke dieren hetzij rechtstreeks onderworpen aan een cytogenetische analyse.

Analyse van de uterusinhoud; De kleinere nestgrootte bij translocatiedragers is een gevolg van de dood van embryo's en dus wijst een hoog aantal dode implantaten op de aanwezigheid van een translocatie in het onderzochte dier. Men laat de te testen F_1-mannetjes elk met twee tot drie vrouwtjes paren. De bevruchting kan worden vastgesteld door middel van een dagelijkse controle op vaginale plugs in de morgen. Veertien tot zestien dagen later worden de vrouwtjes gedood en wordt het aantal levende en dode implantaten in de uteri geregistreerd.

b) Cytogenetische analyse

Testespreparaten worden bereid door droging aan de lucht. Translocatiedragers worden opgespoord op grond van de aanwezigheid van multivalente configuraties tijdens de diakinese-metafase I in primaire spermatocyten. Indien ten minste twee cellen met multivalente associaties kunnen worden waargenomen, vormt dit een bewijs dat het onderzochte dier een translocatiedrager is.

Indien voor het kweken geen selectie is gemaakt, worden alle F_1-mannetjes cytogenetisch onderzocht. Per mannetje dienen ten minste 25 diakinesemetafasen I microscopisch te worden onderzocht. Voor F_1-mannetjes met kleine testes en meiotische afbraak vóór de diakinese of voor F_1-vrouwtjes waarbij XO wordt vermoed, is een onderzoek van de mitotische metafasen, de spermatogonia of het beenmerg noodzakelijk. De aanwezigheid van een ongewoon lang en/of kort chromosoom in tien afzonderlijke cellen is een bewijs voor een bepaalde mannelijke steriele translocatie (c-t type). Sommige mannelijke steriliteit veroorzakende X-autosoomtranslocaties kunnen uitsluitend aan de hand van analyse van de bandering van de mitotische chromosomen worden vastgesteld. De aanwezigheid van 39 chromosomen in alle tien mitoses geldt als bewijs voor een XO-toestand bij een vrouwtje.

2. **GEGEVENS**

De gegevens worden in tabellarische vorm gepresenteerd.

Voor elke paringsinterval worden de gemiddelde nestgrootte en de geslachtsverhouding bij de geboorte en bij het spenen vermeld voor de paring van de ouders.

▼B

Voor vruchtbaarheidsonderzoek van F_1-dieren worden de gemiddelde nestgrootten van alle normale paringen en de afzonderlijke nestgrootte voor F_1-translocatiedragers gegeven. Voor de analyse van de uterusinhoud wordt het gemiddelde aantal levende en dode implantaten na normale paring en het individuele aantal levende en dode implantaten voor elke paring van F_1-translocatiedragers vermeld.

Bij cytogenetische analyse van de diakinesemetafase I worden voor elke translocatiedrager het aantal soorten multivalente configuraties en het totaal aantal cellen genoteerd.

Voor steriele F_1-dieren wordt het totaal aantal paringen en de duur van de paartijd vermeld. Het gewicht van de testes en gegevens van de cytogenetische analyse worden opgegeven.

Voor XO-vrouwtjes dienen de gemiddelde nestgrootte, geslachtsverhouding van F_1-nakomelingen en resultaten van de cytogenetische analyse te worden vermeld.

Indien mogelijke F_1-translocatiedragers vooraf geselecteerd zijn op basis van vruchtbaarheidsonderzoekingen, dienen de tabellen te vermelden hoeveel ervan bevestigde translocatieheterozygoten waren.

De gegevens van negatieve en positieve controleproeven worden op dezelfde manier voorgesteld.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMING

In het verslag van de proef moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— gebruikte stam, leeftijd van de dieren, gewicht van behandelde dieren;

— aantal ouderdieren van elk geslacht in experimentele en controlegroepen;

— proefomstandigheden, gedetailleerde beschrijving van de behandeling, dosisniveaus, oplosmiddelen, paringsschema;

— aantal en geslacht van de nakomelingen per vrouwtje, aantal en geslacht van voor translocatieanalyse gekweekte nakomelingen;

— tijdstip en criteria voor de translocatieanalyse;

— aantal en nauwkeurige beschrijving van translocatiedragers, inclusief gegevens over het kweken en de uterusinhoud (wanneer dat van toepassing is);

— cytogenetische methoden en resultaten van de microscopische analyse, bij voorkeur met foto's;

— statistische evaluatie;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

▼B

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

▼B

B.26. **SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)**

1. **METHODE**

De methode die voor deze subchronische orale toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 408 (1998).

1.1. INLEIDING

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een chemische stof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests of toxiciteitstests met herhaalde toediening (28 dagen) eerste informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de subchronische orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Het onderzoek van 90 dagen levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde langdurige blootstelling vanaf de tijd na het spenen en de groeitijd tot aan de volgroeidheid. Het onderzoek zal informatie opleveren over de belangrijkste toxische effecten, er zullen organen die beschadigd kunnen worden en de mogelijkheid van accumulatie worden aangegeven, en er kan een inschatting worden gemaakt van een blootstellingsniveau zonder schadelijk effect, dat kan worden gebruikt bij de keuze van dosisniveaus voor chronische onderzoeken en voor de vaststelling van veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens.

De methode legt extra nadruk op de neurologische eindpunten en geeft een indicatie van de immunologische effecten en de effecten voor de voortplantingsorganen. Bovendien wordt benadrukt dat het van groot belang is de dieren klinisch zorgvuldig te observeren, om zoveel mogelijk informatie te verkrijgen. Met dit onderzoek moeten chemische stollen geïdentificeerd kunnen worden die neurotoxische of immunologische effecten kunnen hebben of die schadelijk voor de voortplantingsorganen kunnen zijn, waardoor verder diepteonderzoek gerechtvaardigd kan worden.

Zie ook algemene inleiding deel B.

1.2. DEFINITIES

Dosis: is de hoeveelheid teststof die wordt toegediend. De dosis wordt uitgedrukt in gewicht (g, mg) of in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (bv. mg/kg), of als constante voedingsconcentraties (ppm).

Dosering: is een algemene term die de dosis alsook de frequentie daarvan en de doseringsperiode omvat.

NOAEL: is de afkorting voor het niveau zonder waarneembaar schadelijk effect en is de hoogste dosis waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van het onderzoek leven, wordt necropsie verricht.

▼B

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Voorbereiding van de dieren**

Voor het onderzoek worden gezonde dieren gebruikt die ten minste vijf dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden zijn gehouden als tijdens de test en die niet eerder voor experimenten zijn gebruikt. De proefdieren worden op basis van kenmerken als soort, stam. oorsprong, geslacht, gewicht en/of leeftijd ingedeeld. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. De kooien worden zodanig neergezet dat mogelijke effecten door de plaatsing daarvan tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer.

1.4.2. **Voorbereiding van de doses**

De teststof kan via een maagsonde, met de voeding of met het drinkwater worden toegediend. De wijze van de orale toediening hangt af van het doel van het onderzoek en van de fysisch-chemische eigenschappen van het restmateriaal.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspendeerd. Het verdient aanbeveling om in eerste instantie een oplossing/suspensie in water te overwegen. Als dit niet mogelijk is, kan een oplossing/emulsie in achtereenvolgens plantaardige olie (bv. maïsolie) of een ander medium worden overwogen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn. De stabiliteit van de teststof tijdens de toediening moet worden vastgesteld.

1.4.3. **Proefomstandigheden**

1.4.3.1. *Proefdieren*

De voorkeur wordt gegeven aan ratten, maar er kunnen ook andere soorten knaagdieren worden gebruikt, bijvoorbeeld muizen. De proef dient te worden uitgevoerd met stammen van gezonde, jonge volgroeide dieren die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. De toediening moet zo snel mogelijk na het spenen beginnen maar in ieder geval voordat de dieren negen weken oud zijn. Per geslacht mag bij het begin van het onderzoek het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan ±20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie van een langdurig chronische-toxiciteitsonderzoek. moeten dieren van dezelfde stam en oorsprong voor beide onderzoeken worden gebruikt.

1.4.3.2. *Aantal en geslacht*

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste 20 dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Op basis van de aanwezige kennis van de chemische stof of een stof die daar veel op lijkt, verdient het overweging een extra satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) op te nemen in de controlegroep en in de groep met het hoogste dosisniveau, om na de behandeling te kunnen nagaan of er sprake is van reversibiliteit of persistentie van eventuele toxische effecten. De duur van deze nabehandelingsperiode moet worden vastgesteld in overeenstemming met de waargenomen effecten.

▼B

1.4.3.3. *Dosisniveaus*

Ten minste drie dosisniveaus en een bijbehorende controle zijn vereist, tenzij een limiettest wordt uitgevoerd (zie 1.4.3.4). De dosisniveaus kunnen gebaseerd zijn op de resultaten van onderzoeken met herhaalde toediening of van verkennende onderzoeken, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante materialen beschikbaar zijn. Indien er geen beperkingen vanwege de fysisch-chemische aard of de biologische effecten van de teststof zijn, moet het hoogste dosisniveau worden gekozen om toxiciteit te veroorzaken, maar niet de dood of ernstige pijn. Er moet een afnemende reeks dosisniveaus worden gekozen om elke doseringsgerelateerde respons en een niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau aan te tonen. Doorgaans zijn twee- tot viervoudige intervallen optimaal voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van 6 à 10) tussen twee doseringen.

De controlegroep moet een onbehandelde groep of een mediumcontrolegroep zijn, voorzover een medium wordt gebruikt voor de toediening van de teststof. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Indien een medium wordt gebruikt, moet het medium aan de controlegroep in het voor de proef maximaal gebruikte volume worden toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en een geringere voedingsopname veroorzaakt, kan een paargevoede controlegroep nuttig zijn om onderscheid te maken tussen een vermindering vanwege de eetbaarheid of vanwege toxicologische veranderingen in het testmodel.

Er moet rekening worden gehouden met de navolgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is: effecten op de absorptie, distributie, metabolisme of retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische karakteristieken daarvan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren.

1.4.3.4. *Limiettest*

Indien een test bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en met gebruikmaking van de procedures die voor deze studie worden beschreven, een niveau zonder schadelijk effect oplevert en indien toxiciteit op grond van informatie over qua samenstelling aanverwante stoffen niet te verwachten is, hoeft wellicht niet het uitvoeren van een volledig onderzoek met gebruikmaking van drie doseringsniveaus overwogen te worden. De limiettest moet worden uitgevoerd tenzij het blootstellingsniveau van de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

1.5. PROCEDURE

1.5.1. **Toediening van de doses**

De dieren krijgen gedurende een periode van 90 dagen, 7 dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Voor elk ander doseringsinterval, bv. vijf dagen per week, moet een goede reden zijn. Indien de teststof via een maagsonde aan het dier wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. De maximale hoeveelheid vloeistof die in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het maximale volume dat voor de proef wordt gebruikt, mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve bij oplossingen in water, waarvan het volume maximaal 2 ml/100 g lichaamsgewicht mag bedragen. Afgezien van irriterende of bijtende stoffen die normaliter bij hogere concentraties ergere effecten vertonen, moet de variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

▼B

Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten geregeld worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen. Indien een onderzoek gedurende een periode van 90 dagen wordt gebruikt als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moet in beide onderzoeken dezelfde voeding worden gebruikt.

1.5.2. **Waarnemingen**

De observatieperiode moet ten minste 90 dagen duren. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog gedurende een gepaste periode zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na de toediening van de dosis. De klinische conditie van de dieren moet geregistreerd worden. Ten minste tweemaal per dag, normaliter aan het begin en eind van elke dag, moeten alle dieren worden onderzocht op tekenen van ziekelijkheid of sterfte.

Ten minste eenmaal vóór de eerste blootstelling (om vergelijkingen op hetzelfde gebied te kunnen trekken) en eenmalig een week daarna moeten alle dieren aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. De gegevens moeten zorgvuldig geregistreerd worden, bij voorkeur met behulp van scoringssystemen die door het proeflaboratorium expliciet zijn gedefinieerd. Er moet getracht worden verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Er dient onder meer te worden gelet op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, her voorkomen van secreties en excreties, en autonome activiteiten (bv. tranenvloed, piloerectie, pupilgrootte, abnormaal ademhalingspatroon). Ook veranderingen in de manier van lopen, de houding en de reactie op de behandeling alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotypen (bv. abnormaal poetsgedrag, blijven ronddraaien) of bizar gedrag (bv. zelfverminking, achteruit lopen) moeten geregistreerd worden (1).

Vóór de toediening van de teststof en na beëindiging van het onderzoek wordt een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een even geschikt apparaat. Dit onderzoek wordt bij voorkeur op alle dieren verricht, maar ten minste op die in de groepen met het hoge dosisniveau en in de controlegroepen. Wanneer oogafwijkingen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

Tegen het einde van de blootstellingsperiode maar in geen geval vóór de elfde week moeten onderzoeken naar de sensorische reacties op verschillende soorten stimuli (1) (bv. auditieve, visuele en proprioceptieve stimuli) (2), (3), (4), alsmede een bepaling van de grijpkracht (5) en van de motorische activiteit (6) worden verricht. Meer informatie over de procedures die kunnen worden gevolgd, is te vinden in de desbetreffende literatuur. Er kunnen evenwel ook andere dan de genoemde procedures worden toegepast.

De uitvoering van functionele waarnemingen tegen het eind van het onderzoek kan achterwege worden gelaten indien andere onderzoeken al gegevens over functionele waarnemingen hebben opgeleverd en uit de dagelijkse klinische waarnemingen geen functionele gebreken zijn gebleken.

▼B

In uitzonderingsgevallen kunnen functionele waarnemingen ook achterwege worden gelaten bij groepen die anders tekenen van toxiciteit vertonen in een mate die aanzienlijk zou interfereren met de uitvoering van de functionele test.

1.5.2.1. *Lichaamsgewicht en voedsel-/waterverbruik*

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet ook het waterverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Het meten van het waterverbruik kan ook worden overwogen bij voedsel- of maagsondeonderzoeken, gedurende welke de drinkactiviteit kan veranderen.

1.5.2.2. *Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen*

Van een bepaalde plek moeten bloedmonsters worden genomen die, voorzover van toepassing, onder gepaste omstandigheden bewaard moeten worden. Aan het einde van de testperiode moeten de monsters worden genomen vlak vóór het doden van de dieren of als onderdeel van de dodingsprocedure.

Aan het einde van de testperiode en indien tussentijds bloedmonsters zijn genomen, moeten de volgende hematologische onderzoeken worden venijn: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de bloedplaatjes en meting van een maat voor het stollingsvermogen.

Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nier en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op de bloedmonsters die van elk dier zijn genomen vlak vóór het doden daarvan of als onderdeel van de dodingsprocedure (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren). Op dezelfde wijze als bij de hematologische onderzoeken kunnen tussentijds bloedmonsters worden genomen ten behoeve van klinisch-biochemische tests. Het is aan te bevelen in de nacht voordat de bloedmonsters worden genomen de dieren voedsel te onthouden ([1]). Bepalingen in plasma of serum moeten het volgende omvatten: natrium, kalium, glucose, totaal cholesterol, ureum, bloedureum. stikstof, creatinine, totaal eiweit en albumine, en meer dan twee enzymen die symptomatisch zijn voor hepatocellulaire effecten (zoals alanineaminotransferase. aspartaataminotransferase, alkalinefosfatase, gammaglutamyl-transpeptidase en sorbitoldehydrogenase). Er kunnen ook metingen worden verricht van extra enzymen (van hepatische of andere oorsprong) en galzuren, die onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie kunnen opleveren.

Als optie kunnen tijdens de laatste week van het onderzoek de volgende urineonderzoeken worden verricht, waarbij op regelmatige tijdstippen urinemonsters moeten worden genomen: uitzien, volume, osmolaliteit of relatieve dichtheid, pH, eiwit, glucose en bloed, bloedcellen.

Bovendien moet worden overwogen serummarkers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. Andere bepalingen die uitgevoerd moeten worden wanneer de bekende eigenschappen van de teststof invloed hebben of kunnen hebben op de bijbehorende metabolische profielen: calcium, fosfor, triglyceriden bij nuchtere toestand, bepaalde hormonen, methemoglobine en cholinesterase-activiteit. Deze moeten voor chemische stoffen in bepaalde klassen of per geval geïdentificeerd worden.

([1]) Voor een aantal metingen serum en plasma, met name voor glucose, is het aan te bevelen de nacht ervoor de dieren voedsel te onthouden. De belangrijkste reden hiervoor is dat de verhoogde variabiliteit die onvermijdelijk voortvloeit uit het nuttigen van voedsel, ertoe zou leiden dat subtielere effecten verborgen en de interpretatie moeilijker zou worden. Aan de andere kant kan het 's nachts onthouden van voedsel echter interfereren met bet algemene metabolisme van de dieren en. met name in voedingsonderzoeken, de dagelijkse blootstelling aan de teststof verstoren. Indien ervoor wordt gekozen 's nachts voedsel te onthouden, moeten de klinisch-biochemische bepalingen worden uitgevoerd na de functionele waarnemingen van het onderzoek.

▼B

Algemeen is een flexibele aanpak nodig, afhankelijk van de diersoorten en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stol.

Wanneer historische basisgegevens ontoereikend zijn, moet worden overwogen of het noodzakelijk is vóór aanvang van de toediening hematologische en klinisch-biochemische variabelen te bepalen: het is algemeen niet aan te bevelen deze gegevens vóór de behandeling te genereren (7).

1.5.2.3. *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Lever, nieren, bijnieren, testes, epididymides, uterus, ovaria, thymus, milt, hersenen en het hart van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten zo nodig ontdaan worden van aanhechtend weefsel, en ze moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen.

De volgende weefsels moeten in een medium worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek geschikt is: elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (alle relevante delen, waaronder cerebrum, cerebellum en merg/brug), ruggenmerg (op drie niveaus: cervicaal, middenthoracaal en lumbaal), hypofyse, schildklier, bijschildklier, thymus, slokdarm, speekselklieren, maag. dunne en dikke darmen (met inbegrip van de eilandjes van Peyer), lever, alvleesklier, nieren, bijnieren, milt, hart, luchtpijp en longen (behandeling door opblazen met een fixatief en vervolgens onderdompelen), aorta, geslachtsklieren, uterus, bijbehorende geslachtsorganen, borstklieren van wijfjes, prostaat, urineblaas, galblaas (muizen), lymfklieren (bij voorkeur één lymfklier op de toedieningsroute en één op een afstand van de toedieningsroute om systemische effecten op te vangen), perifere zenuw (grote beenzenuw of scheenbeen) bij voorkeur zeer dicht bij de spier, een beenmergsectie (en/of een vers beenmergaspiraat), huid en ogen (indien tijdens de oftalmologische onderzoeken veranderingen werden waargenomen). Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard.

1.5.2.4. *Histopathologisch onderzoek*

Bij alle dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht.

Alle macroscopisch waarneembare beschadigingen moeten onderzocht worden.

Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

▼B

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. GEGEVENS

Er moeten individuele gegevens voor iedere testgroep worden verstrekt. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humaan moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren dat beschadigingen vertoont, de aard van de beschadigingen en het percentage dieren dat elk type beschadiging vertoont.

Voorzover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

2.2. VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.2.1. **Teststof:**

— fysieke aard, zuiverheid en fysico-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens;

— medium (waar van toepassing): rechtvaardiging van het gekozen medium wanneer dat geen water is.

2.2.2. **Diersoort:**

— gebruikte diersoort en stam;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;

— gewicht van elk dier aan het begin van de proef.

2.2.3. **Proefomstandigheden:**

— redenen voor de keuze van het dosisniveau;

— details over de samenstelling van de teststof en voedselbereiding, gerealiseerde concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

— details over de toediening van de teststof;

— toegepaste, werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voorzover van toepassing;

— details over de kwaliteit van het voedsel en drinkwater.

2.2.4. **Resultaten:**

— lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;

— waar van toepassing voedselverbruik en waterverbruik;

— gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis, inclusief toxiciteitsverschijnselen;

▼B

— aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (al dan niet reversibel);

— uitgevoerd oftalmologisch onderzoek;

— bepalingen van de activiteit van de zintuigen, de grijpkracht en de motorische activiteit (indien beschikbaar);

— uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten;

— uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en alle resultaten;

— lichaamsgewicht, orgaangewichten en verhoudingen lichaams-/orgaangewicht van gestorven dieren;

— bevindingen bij de necropsie;

— een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— indien beschikbaar absorptiegegevens;

— waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

3. **REFERENTIES**

(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.). Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691—704.

(4) Moser, V.C, Mc Daniel, K.M., Philips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol, 108, pp. 267—283.

(5) Meyer O.A.., Tilson, H. A., Byrd, W.C., Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233—236.

(6) Crofton, K. M., Howard, J.L., Moser V. C. Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13. pp. 599—609.

(7) Weingand, K., Brown, G., Hall, R. *et al*. (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29. pp. 198—201.

▼B

B.27. **SUBCHRONISCHE ORALE TOXICITEITSTEST: TOXICITEITSONDERZOEK (ORAAL) OP DIEREN ANDERS DAN KNAAGDIEREN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (90 DAGEN)**

1. **METHODE**

De methode die voor deze subchronische orale toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 409 (1998).

1.1. INLEIDING

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische eigenschappen van een chemische stof moet aan de hand van acute-toxiciteitstests of toxiciteitstests met herhaalde toediening (28 dagen) eerst informatie over de toxiciteit worden verkregen. Daarna kan de subchronische orale toxiciteit door middel van herhaalde toediening worden bepaald. Het onderzoek van 90 dagen levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde blootstelling gedurende een periode van snelle groei tot aan de jonge volgroeidheid. Het onderzoek zal informatie opleveren over de belangrijkste toxische effecten, er zullen organen die beschadigd kunnen worden en de mogelijkheid van accumulatie worden aangegeven, en er kan een inschatting worden gemaakt van een blootstellingsniveau zonder schadelijk effect, dat kan worden gebruikt bij de keuze van dosisniveaus voor chronische onderzoeken en voor de vaststelling van veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens.

Met de testmethode kunnen negatieve effecten van blootstelling aan een chemische stof bij diersoorten anders dan knaagdieren worden geïdentificeerd. De test wordt uitsluitend gebruikt:

— indien uit effecten die in andere studies zijn vastgesteld, blijkt dat er behoefte is aan verduidelijking/karakterisering in een tweede diersoort anders dan knaagdieren;

— indien uit toxicokinetische studies blijkt dar het gebruik van een specifieke diersoort anders dan knaagdieren de beste keuze als proefdier is, of

— indien andere specifieke redenen het gebruik van diersoorten anders dan knaagdieren rechtvaardigen.

Zie ook algemene inleiding deel B.

1.2. DEFINITIES

Dosis: is de hoeveelheid teststof die wordt toegediend. De dosis wordt uitgedrukt in gewicht (g, mg) of in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (bv. mg/kg), of als constante voedingsconcentraties (ppm).

Dosering: is een algemene term die de dosis alsook de frequentie daarvan en de doseringsperiode omvat.

NOAEL: is de afkorting voor het niveau zonder waarneembaar schadelijk effect en is de hoogste dosis waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van het onderzoek leven, wordt necropsie verricht.

▼B

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Keuze van de diersoort**

De meest gebruikte diersoort anders dan, knaagdieren is de hond, die van een bepaald ras moet zijn; de beagle wordt in dit verband vaak gebruikt. Ook andere diersoorten, bv. zwijnen en minivarkens, kunnen gebruikt worden. Primaten zijn niet aan te bevelen en voor het gebruik daarvan moeten goede redenen zijn. Er moeten jonge, gezonde dieren worden gebruikt. In het geval van honden moet met de toediening van de dosis bij voorkeur worden begonnen als de honden 4-6 maanden maar in geen geval meer dan 9 maanden oud zijn. Indien het onderzoek wordt uitgevoerd als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moeten dieren van dezelfde soort/ras voor beide onderzoeken worden gebruikt.

1.4.2. **Voorbereiding van de dieren**

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren gebruikt die onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden zijn gehouden als tijdens de test en die niet eerder voor experimenten zijn gebruikt. De duur van de acclimatisering hangt af van de gekozen diersoort en de oorsprong daarvan. In dit verband gelden de volgende aanbevelingen: ten minste vijf dagen voor honden of voor dit doel speciaal gefokte varkens uit een eigen kolonie en ten minste twee weken als deze dieren van externe oorsprong zijn. De proefdieren worden op basis van kenmerken als soort, stam, oorsprong, geslacht, gewicht en/of leeftijd ingedeeld. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. De kooien worden zodanig neergezet dat mogelijke effecten door de plaatsing daarvan tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer.

1.4.3. **Voorbereiding van de doses**

De teststof kan met de voeding, met het drinkwater, via een maagsonde of in capsules worden toegediend. De wijze van de orale toediening hangt af van het doel van het onderzoek en van de fysisch-chemische eigenschappen van het testmateriaal.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspendeerd. Het verdient aanbeveling om in eerste instantie een oplossing suspensie in water te overwegen. Als dit niet mogelijk is, kan een oplossing/emulsie in achtereenvolgens plantaardige olie (bv. maïsolie) of een ander medium worden overwogen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn. De stabiliteit van de teststof tijdens de toediening moet worden vastgesteld.

1.5. PROCEDURE

1.5.1. **Aantal en geslacht van de dieren**

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste acht dieren (vier wijfjes en vier mannetjes) worden gebruikt. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Aan het einde van het onderzoek moeten voldoende dieren overblijven om een zinvolle evaluatie van de toxische effecten mogelijk te maken. Op basis van de aanwezige kennis van de chemische stof of een stof die daar veel op lijkt, verdient het overweging een extra satellietgroep van acht dieren (vier per geslacht) op te nemen in de controlegroep en in de groep met het hoogste dosisniveau, om na de behandeling te kunnen nagaan of er sprake is van reversibiliteit of persistentie van eventuele toxische effecten. De duur van deze nabehandelingsperiode moet worden vastgesteld in overeenstemming met de waargenomen effecten.

▼B

1.5.2. **Dosisniveaus**

Ten minste drie dosisniveaus en een bijbehorende controle zijn vereist, tenzij een limiettest wordt uitgevoerd (zie 1.5.3). De dosisniveaus kunnen gebaseerd zijn op de resultaten van onderzoeken met herhaalde toediening of van verkennende onderzoeken, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante materialen beschikbaar zijn. Indien er geen beperkingen vanwege de fysisch-chemische aard of de biologische effecten van de teststof zijn, moet het hoogste dosisniveau worden gekozen om toxiciteit te veroorzaken, maar niet de dood of ernstige pijn. Er moet een afnemende reeks dosisniveaus worden gekozen om elke doseringsgerelateerde respons en een niveau zonder schadelijk effect (NOAEL) op het laagste dosisniveau aan te tonen. Doorgaans zijn twee- tot viervoudige intervallen optimaal voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van 6 à 10) tussen twee doseringen.

De controlegroep moet een onbehandelde groep of een mediumcontrolegroep zijn, voorzover een medium wordt gebruikt voor de toediening van de teststof. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Indien een medium wordt gebruikt, moet het medium aan de controlegroep in het voor de proef maximaal gebruikte volume worden toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en een geringere voedingsopname veroorzaakt, kan een paargevoede controlegroep nuttig zijn om onderscheid te maken tussen een vermindering vanwege de eetbaarheid of vanwege toxicologische veranderingen in het testmodel.

Er moet rekening worden gehouden met de navolgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is: effecten op de absorptie, distributie, metabolisme of retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische karakteristieken daarvan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren.

1.5.3. **Limiettest**

Indien een test bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/'kg lichaamsgewicht/dag en met gebruikmaking van de procedures die voor deze studie worden beschreven, een niveau zonder schadelijk effect oplevert en indien toxiciteit op grond van informatie over qua samenstelling aanverwante stoffen niet te verwachten is, hoeft wellicht niet het uitvoeren van een volledig onderzoek met gebruikmaking van drie doseringsniveaus overwogen te worden. De limiettest moet worden uitgevoerd tenzij het blootstellingsniveau van de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

1.5.4. **Toediening van de doses**

De dieren krijgen gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Voor elk ander doseringsinterval, bv. vijf dagen per week. moet een goede reden zijn. Indien de teststof via een maagsonde aan het dier wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. De maximale hoeveelheid vloeistof die in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Normaliter moet het volume zo laag mogelijk worden gehouden. Afgezien van irriterende of bijtende stoffen die normaliter bij hogere concentraties ergere effecten vertonen, moet de variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

▼B

Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses dagelijks op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten geregeld worden aangepast om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen. Indien een onderzoek gedurende een periode van 90 dagen wordt gebruikt als voorstudie van een langdurig chronisch toxiciteitsonderzoek, moet in beide onderzoeken dezelfde voeding worden gebruikt.

1.5.5. **Waarnemingen**

De observatieperiode moet ten minste 90 dagen duren. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog gedurende een gepaste periode zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na de toediening van de dosis. De klinische conditie van de dieren moet geregistreerd worden. Ten minste tweemaal per dag, normaliter aan het begin en eind van elke dag moeten alle dieren worden onderzocht op tekenen van ziekelijkheid of sterfte.

Ten minste eenmaal vóór de eerste blootstelling (om vergelijkingen op hetzelfde gebied te kunnen trekken) en eenmalig een week daarna moeten alle dieren aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. Er moet getracht worden verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Alle waargenomen toxiciteitsverschijnselen moeten zorgvuldig worden geregistreerd, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst ervan. Er dient onder meer te worden gelet op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, het voorkomen van secreties en excreties, en autonome activiteiten (bv. tranenvloed, pilo-crectie, pupilgrootte, abnormaal ademhalingspatroon). Ook veranderingen in de manier van lopen, de houding en de reactie op de behandeling alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotypen (bv. abnormaal poetsgedrag. blijven ronddraaien) of bizar gedrag moeten geregistreerd worden.

Vóór de toediening van de teststof en na beëindiging van het onderzoek wordt een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een even geschikt apparaat. Dit onderzoek wordt bij voorkeur op alle dieren verricht, maar ten minste op die in de groepen met het hoge dosisniveau en in de controlegroepen. Wanneer oogafwijkingen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

1.5.5.1. *Lichaamsgewicht en voedsel-/waterverbruik*

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet ook het waterverbruik ten minste wekelijks worden gemeten. Het meten van het waterverbruik kan ook worden overwogen bij voedsel- of maagsondeonderzoeken, gedurende welke de drinkactiviteit kan veranderen.

▼B

1.5.5.2. *Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen*

Van een bepaalde plek moeten bloedmonsters worden genomen die, voorzover van toepassing, onder gepaste omstandigheden bewaard moeten worden. Aan het einde van de testperiode moeten de monsters worden genomen vlak vóór het doden van de dieren of als onderdeel van de dodingsprocedure.

Aan het begin van de testperiode moeten de volgende hematologische onderzoeken worden verricht: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de bloedplaatjes en meting van een maat voor het stollingsvermogen, zoals prothrombinetijd of thromboplastinetijd. Deze onderzoeken moeten vervolgens om de maand of halverwege de testperiode en ten slotte aan het einde van de test worden herhaald.

Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nier en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op bloedmonsters die van elk dier worden genomen aan het begin van de testperiode, om de maand of halverwege de test en ten slotte aan het einde van de testperiode. Tot de testgebieden die overwogen moeten worden, behoren elektrolytisch evenwicht, koolhydraatstofwisseling en de lever- en nierwerking. De keuze van specifieke tests wordt beïnvloed door waarnemingen van de werking van de teststof. Vóór het nemen van de bloedmonsters moet de dieren gedurende een voor die diersoort gepaste periode voedsel worden onthouden. Tot de aanbevolen onderzoeken behoren de meting van calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucose bij nuchtere toestand, alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumeiwit.

Ten minste aan het begin, vervolgens halverwege en ten slotte aan het einde van de studie moeten urine-onderzoeken worden verricht, waarbij de urinemonsters op regelmatige tijdstippen genomen moeten worden. Het volgende moet worden onderzocht: uitzien, volume, osmolaliteit of relatieve dichtheid, pH, eiwit, glucose en bloed/bloedcellen. Wanneer nodig kunnen hieraan nog parameters worden toegevoegd om het onderzoek van de waargenomen effecten te verlengen.

Bovendien moet worden overwogen markers van algemene weefselbeschadiging te onderzoeken. Andere bepalingen die nodig kunnen zijn voor een adequate toxicologische evaluatie zijn: analyse van lipiden, hormonen, het zuur-base-evenwicht. methemoglobine en cholinesteraseremming. Wanneer nodig kunnen hieraan nog klinisch-chemische parameters worden toegevoegd om het onderzoek van de waargenomen effecten te verlengen. Deze moeten voor chemische stoffen in bepaalde klassen of per geval geïdentificeerd worden.

Algemeen is een flexibele aanpak nodig afhankelijk van de diersoort en het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

1.5.5.3. *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Lever, nieren, bijnieren, testes, epididymides. uterus, ovaria, thymus, milt, hersenen en het hart van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten zo nodig ontdaan worden van aanhechtend weefsel, en ze moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen.

▼B

De volgende weefsels moeten in een medium worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek geschikt is: elk macroscopisch waarneembaar letsel, hersenen (alle relevante delen, waaronder cerebrum cerebellum en merg/brug), ruggenmerg (op drie niveaus: cervicaal, middenthoracaal en lumbaal), hypofyse. ogen, schildklier, bijschildklier, thymus, slokdarm, speekselklieren, maag, dunne en dikke darmen (met in begrip van de eilandjes van Peyer), lever, galblaas, alvleesklier, nieren, bijnieren, milt, hart, luchtpijp en longen, aorta, geslachtsklieren, uterus, bijbehorende geslachtsorganen, borstklieren van wijfjes, prostaat. urineblaas, lymfklieren (hij voorkeur één lymfklier op de toedieningsroute en één op een afstand van de toedieningsroute om systemische effecten op te vangen), perifere zenuw (grote beenzenuw of scheenbeen) bij voorkeur zeer dicht bij de spier, een beenmergsectie (en/of een vers beenmergaspiraat) en huid. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard.

1.5.5.4. *Histopathologisch onderzoek*

Bij alle dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht.

Alle macroscopisch waarneembare beschadigingen moeten onderzocht worden.

Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

2.1. GEGEVENS

Er moeten individuele gegevens voor iedere testgroep worden verstrekt. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humaan moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van het verloop in de tijd, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren dat beschadigingen vertoont, de aard van de beschadigingen en het percentage dieren dat elk type beschadiging vertoont.

Voorzover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

2.2. VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

▼B

2.2.1. **Teststof:**

— fysieke aard. zuiverheid en fysico-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens;

— medium (waar van toepassing): rechtvaardiging van het gekozen medium wanneer dat geen water is.

2.2.2. **Diersoort:**

— gebruikte diersoort en stam;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, leefomstandigheden, voeding enz.;

— gewicht van elk dier aan het begin van de proef.

2.2.3. **Proefomstandigheden:**

— redenen voor de keuze van het dosisniveau;

— details over de samenstelling van de teststof en voedselbereiding, gerealiseerde concentratie, — stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

— details over de toediening van de teststof;

— toegepaste, werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voorzover van toepassing;

— details over de kwaliteit van het voedsel en het drinkwater.

2.2.4. **Resultaten:**

— lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;

— waar van toepassing voedselverbruik en waterverbruik;

— gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis, inclusief toxiciteitsverschijnselen;

— aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (al dan niet reversibel);

— uitgevoerd oftalmologisch onderzoek;

— uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten;

— uitgevoerde klinisch-biochemischc onderzoeken en alle resultaten;

— lichaamsgewicht, orgaangewichten en verhoudingen lichaams-/orgaangewicht van gestorven dieren;

— bevindingen bij de necropsie;

— een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— indien beschikbaar absorptiegegevens;

— waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

▼B

B.28. **SUBCHRONISCHE DERMALE TOXICITEITSTEST 90 DAGEN-TEST MET HERHAALDE DERMALE TOEDIENING AAN KNAAGDIERSOORTEN**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. DEFINITIES

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE ONDERZOEKMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 90 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen bij verscheidene groepen proefdieren op de huid aangebracht. Er wordt een dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks op tekenen van toxiciteit onderzocht. Op de dieren die tijdens het onderzoek sterven en die welke aan het eind van de proefnemingen nog in leven zijn, wordt necropsie verricht.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKMETHODE

1.6.1. ***Voorbereidingen***

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Voor her onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen groepen en controlegroepen ingedeeld. Kort voor de proefneming wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt. Het dier kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur voor de proef worden uitgevoerd. Gewoonlijk zal het dier ongeveer om de week opnieuw moeten worden geknipt of geschoren. Bij het knippen of scheren van de vacht moet erop worden geler dar de huid niet wordt beschadigd. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor de aanbrenging van de teststof worden onthaard. Bij het bepalen van de oppervlakte die moet worden onthaard, en de afmetingen van het verband moet rekening worden gehouden met her gewicht van het dier. Bij proefnemingen met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemalen, moer de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. De teststof wordt gedurende vijf tot zeven dagen per week dagelijks aangebracht.

1.6.2. *Proefomstandigheden*

1.6.2.1. Proefdieren

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten, konijnen of cavia's. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzaak hiervan moet worden aangetoond. Bij het begin van het onderzoek mag het gewicht van de dieren niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Indien een studie naar de subchronische dermale toxiciteit wordt verricht ter voorbereiding op een chronisch onderzoek, dienen in beide studies dezelfde soort en stam te worden gebruikt.

▼B

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste twintig dieren (tien wijfjes en tien mannetjes) met een gezonde huid worden gebruikt. De vrouwtjes moeten nulliparae zijn en mogen niet drachtig zijn. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satelliet groep van twintig dieren (tien per geslacht) gedurende 90 dagen met het hoge dosisniveau worden behandeld en nog gedurende 28 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of vertraagd tot uiting komen.

1.6.2.3. Dosisniveaus

Er zijn ten minste drie dosisniveaus vereist, met een controle of een mediumcontrole indien een medium wordt gebruikt. De blootstellingsduur dient ten minste zes uur per dag te bedragen. De teststof moet iedere dag op dezelfde tijd worden toegediend; op gezette tijden (iedere week of om de veertien dagen) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Afgezien van de toediening van de teststof, moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als de dieren in de proefgroep. Indien ter vergemakkelijking van de dosering gebruik wordt gemaakt van een medium, moet aan de dieren in de mediumcontrolegroep de dosis op dezelfde wijze worden toegediend als aan de dieren in de behandelde groepen en moet deze dosis even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Wanneer er een bruikbare schatting van de menselijke blootstelling bestaat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau nauwelijks waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de geringe dosis en in de tussengroepen alsmede in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien toediening van de teststof tot ernstige huidirritatie leidt, moeten de concentraties worden verlaagd, wat vermindering of uitblijven van andere toxische effecten bij het hoge dosisniveau tot gevolg kan hebben. Indien de huid ernstig is beschadigd, kan het bovendien noodzakelijk zijn de studie te beëindigen en een nieuwe studie met lagere concentraties te beginnen.

1.6.3. Hoogste te testen dosis

Indien bij een voorafgaand onderzoek bij een dosisniveau van 1 000 mg/kg of een hoger niveau, dat is gerelateerd aan het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, geen toxische effecten optreden, zijn verdere proeven wellicht niet noodzakelijk.

1.6.4 Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden onderzocht op tekenen van toxiciteit. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de toxiciteitsverschijnselen zich voor het eerst voordoen, en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden vastgelegd.

▼B

1.6.5. *Uitvoering*

De dieren moeten apart in kooien worden ondergebracht. De dieren worden in het ideale geval gedurende een periode van 90 dagen, zeven dagen per week, met de teststof behandeld.

Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 28 dagen onbehandeld blijven om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. De blootstellingsduur moet zes uur per dag bedragen.

De teststof moet gelijkmatig worden verdeeld over een oppervlakte van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen mag de te bedekken oppervlakte kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet met een zo dun en gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag worden bedekt.

De teststof moet voor de duur van de blootstelling door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Dit gedeelte van de huid moet op een geschikte wijze nog verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof oraal opnemen. Om dit te voorkomen kunnen hulpmiddelen worden gebruikt waarmee de dieren in hun bewegingsvrijheid worden belemmerd, maar het is niet aan te bevelen de bewegingsvrijheid van de dieren volledig te beperken,

Aan het eind van de blootstellingsperiode wordt de testerende teststof waar mogelijk met water van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte schoonmaakmethode.

Alle dieren moeten dagelijks worden gecontroleerd; tekenen van toxiciteit moeten samen met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden, de mate en de duur ervan worden genoteerd. Bij het observeren van de dieren in de kooien moet aandacht worden besteed aan veranderingen in huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Het verbruik van voer moet wekelijks worden gemeten en de dieren moeten iedere week worden gewogen. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of verkeerde huisvesting. Na afloop van de onderzoekperiode wordt op alle overlevende dieren van de behandelde groepen, afgezien van die in de satellietgroepen, necropsie verricht. Indien stervende dieren worden aangetroffen, moeten zij worden verwijderd; ook op hen wordt necropsie verricht.

Bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, worden gewoonlijk de volgende onderzoekingen verricht:

a) Voor de blootstelling aan de teststof en na afloop van het onderzoek dient bij voorkeur bij alle dieren, maar ten minste bij de groep met de hoge dosis en de controlegroep oogonderzoek met behulp van een oogspiegel of een ander voor dit doel geschikt instrument plaats te vinden. Indien er veranderingen in de ogen worden vastgesteld, moeten alle dieren worden onderzocht.

b) Aan het einde van de onderzoekperiode vindt een hematologisch onderzoek plaats, dat onder meer omvat: bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, telling van de erytrocyten, totaaltelling en gedifferentieerde telling van de leukocyten, alsmede meting van de stollingseigenschappen zoals stollingstijd, protrombinetijd en tromboplastinetijd, of telling van de bloedplaatjes.

▼B

c) Aan het einde van de onderzoekperiode dienen klinische en biochemische bepalingen op het bloed te worden verricht. Voor alle studies in aanmerking komende testen zijn: elektrolytenbalans, koolhydraatstofwisseling, alsmede de lever- en nierfunctie. De selectie van specifieke testen is afhankelijk van de waarnemingen met betrekking tot het werkingsmechanisme van de stof. Het onderzoek is eventueel uit te breiden met metingen van: calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, nuchter glucosegehalte (met een aan de diersoort aangepaste periode van vasten), serumglutamaatpyruvaattransaminase ([1]), serumglutamaatoxaalacetaattransaminase ([2]), ornithinedecarboxylase, gammaglutamyltranspeptidase, ureumstikstof, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumproteïne. Voor een goede toxicologische evaluatie kan de bepaling van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit noodzakelijk zijn. Om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden kan zo nodig verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht.

d) Routinematig urineonderzoek is alleen vereist wanneer daartoe op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit een indicatie bestaat.

In het geval van ontoereikende basisgegevens uit het verleden dient de bepaling van hematologische en klinisch-biochemische parameters voordat met de dosering wordt begonnen aandacht te krijgen.

Macroscopische necropsie

Op alle dieren moet een volledige macroscopische necropsie worden verricht, waarbij het uitwendige lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen, alsmede de schedel-, borst- en buikholte en hun inhoud worden onderzocht. De lever, nieren, bijnieren en testes moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen. De volgende organen en weefsels moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek: alle organen die met het blote oog zichtbare letsels vertonen, hersenen — inclusief delen van medulla/pons, cortex cerebelli en cortex cerebri, hypofyse, schildklier/bijschildklieren, thymusweefsel, (luchtpijp), longen, hart, aorta, speekselklieren, lever, milt, nieren, bijnieren, alvleesklier, geslachtsklieren, secundaire geslachtsorganen, galblaas (indien aanwezig), slokdarm, maag, duodenum, jejunum, ileum, blinde darm, colon, rectum, urineblaas, representatieve lymfklieren, (vrouwelijke borstklier), (dijbeenspieren), perifere zenuwen, (ogen), (borstbeen met beenmerg), (dijbeen — inclusief gewrichtsvlak), (ruggenmerg op drie plaatsen — cervicaal, mediothoracaal en lumbaal) en (traanklieren). (De tussen haakjes vermelde weefsels hoeven alleen te worden onderzocht als daarvoor aanwijzingen zijn vanwege toxicologische waarnemingen of als het orgaan is aangetast.)

Histopathologisch onderzoek

a) Op de normale en behandelde huid en de organen en weefsels van alle dieren in de controlegroep en in de groep die de hoogste dosis heeft ontvangen, moet een volledig histopathologisch onderzoek worden verricht.

b) Alle met het blote oog zichtbare letsels moeten worden onderzocht.

([1]) Thans bekend als serumalanineaminotransferase.
([2]) Thans bekend als serumaspartaataminotransferase.

▼B

c) De aangetaste organen dienen in dieren in andere dosisgroepen te worden onderzocht.

d) Bij gebruikmaking van ratten dienen de longen van de dieren in de groep die een lage dosis heeft ontvangen en van die in de tussengroep histopathologisch te worden onderzocht op tekenen van infectie, aangezien op deze manier een goed beeld van de gezondheidstoestand van de dieren wordt verkregen. Verder routinematig histopathologisch onderzoek is bij de dieren in deze groepen niet vereist, maar moet steeds worden verricht op de organen die in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen, letsels bleken te vertonen.

e) Wordt van een satellietgroep gebruik gemaakt, dan moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de weefsels en organen waar bij andere behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden.

2. **GEGEVENS**

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat: het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat letsels vertoont, de aard van de letsels en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De resultaten moeten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

— diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voer, enzovoort;

— proefomstandigheden;

— dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;

— waar mogelijk, het dosisniveau waarop geen effect is waargenomen;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;

— tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot het einde van de proef in leven bleven;

— beschrijving van toxische of andere effecten;

— tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over voer en lichaamsgewicht;

— oftalmologische bevindingen;

— uitgevoerd hematologisch onderzoek en resultaten;

— uitgevoerd klinisch-biochemisch onderzoek en resultaten (resultaten van het urineonderzoek inbegrepen);

— bevindingen van de necropsie;

▼B

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— waar toepasselijk, statistische verwerking van de resultaten;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

▼M4

B.29. SUBCHRONISCHE INHALATIETOXICITEIT: ONDERZOEK VAN 90 DAGEN

SAMENVATTING

Deze herziene testmethode B.29 is ontworpen om de toxiciteit van een teststof via de inhalatieweg gedurende een subchronische periode (90 dagen) volledig te karakteriseren, en robuuste gegevens op te leveren voor kwantitatieve beoordelingen van de inhalatierisico's. Groepen van tien mannelijke en 10 vrouwelijke knaagdieren worden gedurende een periode van 90 dagen (13 weken) 6 uur per dag blootgesteld aan a) de teststof bij drie of meer concentraties, b) gefilterde lucht (negatieve controle) en/of c) het medium (mediumcontrole). De dieren worden doorgaans vijf dagen per week blootgesteld, maar zeven dagen per week is ook toegestaan. Er worden altijd zowel mannetjes als vrouwtjes getest, maar zij kunnen bij verschillende concentratieniveaus worden blootgesteld indien bekend is dat een van beide geslachten gevoeliger is voor een bepaalde teststof. Deze methode geeft de onderzoeksleider de flexibiliteit om satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen), het tussentijds doden van dieren, bronchoalveolaire lavage, neurologische tests en aanvullende klinisch-pathologische en histopathologische beoordelingen in het onderzoek op te nemen, om de toxiciteit van een teststof beter te kunnen karakteriseren.

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 413 (2009) van de OESO. Testrichtlijn 413 (TG 413), de oorspronkelijke testrichtlijn voor subchronische inhalatie, werd in 1981 vastgesteld (1). Deze testmethode B.29 (die gelijkwaardig is aan de herziene versie van TG 413 (2009)) is bijgewerkt om haar in overeenstemming te brengen met de stand van de wetenschap en om te voldoen aan de huidige en toekomstige regelgevingsbehoeften.

2. Onderzoek naar subchronische inhalatietoxiciteit wordt in de eerste plaats gebruikt om de concentraties waarmee de risico's voor werknemers op de werkplek worden beoordeeld in regelgeving vast te leggen. Ook wordt het gebruikt om de risico's voor mensen te beoordelen in de woonomgeving, het verkeer en het milieu. Met deze methode kunnen nadelige effecten na herhaalde dagelijkse blootstelling aan een teststof door inhalatie gedurende 90 dagen (ongeveer 10 % van de levensduur van een rat) worden gekarakteriseerd. De uit onderzoek naar subchronische inhalatietoxiciteit verkregen gegevens kunnen worden gebruikt voor kwantitatieve risicobeoordelingen en voor de keuze van de concentraties voor onderzoek naar chronische toxiciteit. Deze testmethode is niet specifiek bedoeld voor het testen van nanomaterialen. De in de context van deze testmethode gebruikte definities zijn opgenomen in het laatste deel van dit hoofdstuk en in GD 39 (2).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

3. Het testlaboratorium moet alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen voordat het onderzoek wordt uitgevoerd. Dit komt de kwaliteit van het onderzoek ten goede en zorgt ervoor dat het gebruik van dieren tot een minimum wordt beperkt. Voor de keuze van geschikte testconcentraties kan onder meer gebruik worden gemaakt van informatie over de identiteit, chemische structuur en fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de resultaten van eventuele in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests; de voorgenomen toepassing(en) en de potentiële blootstelling van de mens; de beschikbare (Q)SAR-gegevens en toxicologische gegevens over chemische stoffen met een verwante structuur; en aan ander onderzoek met herhaalde blootstelling ontleende gegevens. In het geval van verwachte of in de loop van het onderzoek waargenomen neurotoxiciteit, kan de onderzoeksleider ervoor kiezen om geschikte evaluaties op te nemen, zoals een „functional observational battery" (FOB) en meting van de motorische activiteit. Hoewel de timing van de blootstellingen ten opzichte van specifiek onderzoek een kritieke factor kan vormen, mogen deze nieuwe activiteiten niet interfereren met de basisopzet van het onderzoek.

▼M4

4. Verdunningen van bijtende of irriterende teststoffen kunnen worden getest bij concentraties die de gewenste mate van toxiciteit opleveren. Zie GD 39 (2) voor nadere informatie. Bij blootstelling van dieren aan deze materialen moeten de doelconcentraties laag genoeg zijn om geen hevige pijn en angst te veroorzaken, maar wel toereikend zijn om de concentratie/responscurve uit te breiden tot niveaus die stroken met de wetenschappelijke en regelgevingsdoelstellingen van de test. Deze concentraties moeten per geval worden gekozen, bij voorkeur op basis van een adequaat opgezet bereikbepalingonderzoek dat informatie oplevert over het kritische eindpunt, eventuele irritatiedrempels en het moment van optreden (zie de punten 11 tot en met 13). De keuze voor een bepaalde concentratie moet worden gemotiveerd.

5. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevige en voortdurende angst vertonen, moeten op humane wijze worden gedood. Stervende dieren worden op dezelfde wijze beschouwd als dieren die tijdens de test sterven. De OESO-leidraad inzake humane eindpunten (3) bevat criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

6. Er worden gezonde jonge volwassen knaagdieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Als een andere soort wordt gebruikt, moet dit worden gemotiveerd.

Voorbereiding van de dieren

7. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Op de dag waarop zij willekeurig worden ingedeeld, moeten de jonge volwassen dieren zeven tot negen weken oud zijn en een lichaamsgewicht hebben dat niet meer dan 20 % afwijkt van het gemiddelde gewicht voor elk geslacht. De dieren worden willekeurig gekozen, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren en vóór het begin van de test gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

Dierhouderij

8. De dieren moeten individueel worden gemerkt, bij voorkeur met onderhuidse transponders, om de waarnemingen te vergemakkelijken en verwarring te voorkomen. De temperatuur van de ruimte waar de proefdieren verblijven, moet 22 ± 3 °C zijn. De relatieve vochtigheid wordt idealiter tussen 30 en 70 % gehouden, maar wanneer water als medium wordt gebruikt zal dit niet altijd mogelijk zijn. Voor en na de blootstelling worden de dieren over het algemeen groepsgewijs in kooien ondergebracht, waarbij zij naar geslacht en concentratie worden gescheiden; het aantal dieren per kooi mag echter niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord en moet zodanig worden gekozen dat er zo min mogelijk dieren verloren gaan als gevolg van kannibalisme en gevechten. Wanneer de dieren uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan acclimatisatie voor de fixeerbuizen noodzakelijk zijn. De fixeerbuizen mogen geen onnodige lichamelijke, thermische of immobilisatiestress voor de dieren opleveren. De immobilisatie kan van invloed zijn op fysiologische eindpunten zoals de lichaamstemperatuur (hyperthermie) en/of het ademminuutvolume. Als er generieke gegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat geen significante veranderingen als gevolg van de immobilisatie optreden, is geen voorafgaande gewenning aan de fixeerbuizen noodzakelijk. Dieren die met hun hele lijf aan een aerosol worden blootgesteld, worden tijdens de blootstelling individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij het testaerosol filteren door de vacht van hun kooigenoten. Er kan gebruik worden gemaakt van gebruikelijk en gecertificeerd laboratoriumvoeder, behalve tijdens de blootstelling, met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater uit de waterleiding. Er wordt kunstlicht gebruikt met een cyclus van 12 uur licht/12 uur donker.

▼M4

Inhalatiekamers

9. Bij de keuze van de inhalatiekamer wordt rekening gehouden met de aard van de teststof en het doel van de test. Blootstelling via de neus alleen heeft de voorkeur (hieronder vallen blootstelling via de kop alleen, blootstelling via de neus alleen en blootstelling via de snuit alleen). Blootstelling via de neus alleen heeft over het algemeen de voorkeur voor studies van vloeibare of vaste aerosolen en voor dampen die kunnen condenseren tot aerosolen. Speciale doelstellingen van de studie kunnen beter worden verwezenlijkt door blootstelling van het hele lijf, maar dit moet in het studieverslag worden gemotiveerd. Om bij gebruik van een kamer voor het hele lijf te zorgen voor een stabiele atmosfeer, mag het totale volume van de testdieren niet meer dan 5 % van het volume van de kamer innemen. De technische principes voor blootstelling via de neus alleen en blootstelling van het hele lijf, alsook de specifieke voor- en nadelen ervan, zijn uiteengezet in GD 39 (2).

TOXICITEITSONDERZOEK

Limietconcentraties

10. Anders dan bij acuut onderzoek zijn er geen vastgestelde limietconcentraties bij onderzoek naar subchronische inhalatietoxiciteit. Bij het vaststellen van de maximale geteste concentratie moet rekening worden gehouden met: 1) de maximaal haalbare concentratie, 2) het niveau waaraan mensen in het ongunstigste geval zouden worden blootgesteld („worst case”), 3) de noodzaak een toereikende zuurstoftoevoer in stand te houden, en/of 4) overwegingen met het oog op dierenwelzijn. Indien geen op reële gegevens gebaseerde grenswaarden beschikbaar zijn, kunnen de limietwaarden voor acute-toxiciteitsonderzoek van Verordening (EG) nr. 1272/2008 (13) worden gebruikt (d.w.z. tot een maximale concentratie van 5 mg/l voor aerosolen, 20 mg/l voor dampen en 20 000 ppm voor gassen); zie GD 39 (2). Als het nodig is deze limietwaarden te overschrijden voor het testen van gassen of zeer vluchtige teststoffen (bv. koelmiddelen), moet dit worden gemotiveerd. De limietconcentratie moet tot onmiskenbare toxiciteit leiden zonder onnodige stress bij de dieren te veroorzaken of hun levensduur te beïnvloeden (3).

Bereikbepalingonderzoek

11. Alvorens te beginnen met het hoofdonderzoek, is het doorgaans nodig een bereikbepalingonderzoek uit te voeren. Een bereikbepalingonderzoek is uitgebreider dan een verkennende test, omdat het zicht niet beperkt tot de keuze van de concentratie. De tijdens een bereikbepalingonderzoek opgedane kennis kan ervoor zorgen dat het hoofdonderzoek succesvol verloopt. Een bereikbepalingonderzoek kan bijvoorbeeld technische informatie opleveren met betrekking tot analysemethoden, deeltjesgroottebepaling, het herkennen van toxische mechanismen, klinisch-pathologische en histopathologische gegevens, en schattingen van mogelijke NOAEL- en MTC-concentraties in het hoofdonderzoek. De onderzoeksleider kan ervoor kiezen het bereikbepalingonderzoek te gebruiken om de drempelwaarde voor irritatie van de luchtwegen (bv. door middel van histopathologisch onderzoek van de luchtwegen, het testen van de longfunctie, of bronchoalveolaire lavage), de hoogste concentratie die zonder onnodige stress door de dieren wordt verdragen en de parameters waarmee de toxiciteit van een teststof het best kan worden gekarakteriseerd, te bepalen.

12. Een bereikbepalingonderzoek kan één of meer concentratieniveaus omvatten. Afhankelijk van de gekozen eindpunten worden bij elk concentratieniveau drie tot zes mannetjes en drie tot zes vrouwtjes blootgesteld. Een bereikbepalingonderzoek duurt ten minste vijf dagen en doorgaans niet langer dan 28 dagen. In het testverslag moet de keuze van de concentraties voor het hoofdonderzoek worden gemotiveerd. Het hoofdonderzoek heeft tot doel een verband tussen concentratie en respons aan te tonen op basis van wat naar verwachting het gevoeligste eindpunt zal zijn. De lage concentratie is bij voorkeur de concentratie waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld („no-observed adverse effect”), de hoge concentratie moet tot onmiskenbare toxiciteit leiden zonder onnodige stress bij de dieren te veroorzaken of hun levensduur te beïnvloeden (3).

▼M4

13. Bij het kiezen van de concentratieniveaus voor het bereikbepalingonderzoek moet met alle beschikbare informatie rekening worden gehouden, met inbegrip van structuur-activiteitrelaties en gegevens over vergelijkbare stoffen (zie punt 3). Een bereikbepaling onderzoek kan de vanuit mechanistisch oogpunt als het meest gevoelig beschouwde eindpunten bevestigen of weerleggen, bv. cholinesteraseremming door organofosfaten, vorming van methemoglobine door voor erytrocyten toxische stoffen, schildklierhormonen (T_3, T_4) voor thyreotoxische stoffen, eiwit, LDH, of neutrofielen in bronchoalveolaire lavage voor onschadelijke, slecht oplosbare deeltjes of longirritatie veroorzakende aerosolen.

Hoofdonderzoek

14. Het hoofdonderzoek naar subchronische toxiciteit omvat doorgaans drie concentratieniveaus en, waar nodig, parallelle negatieve controles (luchtcontroles) en/of mediumcontroles (zie punt 18). Voor de keuze van geschikte blootstellingsniveaus moet gebruik worden gemaakt van alle beschikbare gegevens, met inbegrip van de resultaten van onderzoek naar systemische toxiciteit, metabolisme en kinetiek (er moet speciaal op worden gelet dat hoge concentratieniveaus waardoor kinetische processen worden verzadigd, worden vermeden). Elke testgroep bestaat uit twintig knaagdieren (tien mannetjes en tien vrouwtjes) die over een periode van 13 weken gedurende vijf dagen per week telkens 6 uur per dag aan de teststof worden blootgesteld (de totale duur van het onderzoek is ten minste 90 dagen). De dieren mogen ook zeven dagen per week worden blootgesteld (bv. bij het testen van geneesmiddelen die worden geïnhaleerd). Indien bekend is dat een van beide geslachten gevoeliger is voor een bepaalde teststof, kunnen beide geslachten bij verschillende concentratieniveaus worden blootgesteld om het verband tussen concentratie en respons nauwkeuriger te kunnen bepalen, zoals beschreven in punt 15. Als andere knaagdiersoorten dan ratten uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan de maximale blootstellingsduur worden aangepast om soortspecifieke symptomen van angst te minimaliseren. Indien een blootstellingsduur van minder dan 6 uur/dag wordt gebruikt, of er onderzoek naar blootstelling van het hele lijf met een lange tijdsduur (bv. 22 uur/dag) moet worden verricht, moet dit worden gemotiveerd (zie GD 39 (2)). Tijdens de blootstellingsperiode krijgen de dieren geen voeder, tenzij de blootstelling langer duurt dan 6 uur. Tijdens een blootstelling van het hele lijf kan de dieren water worden gegeven.

15. De gekozen doelconcentraties moeten het mogelijk maken de doelorganen te identificeren en een duidelijk verband tussen concentratie en respons aan te tonen:

— het hoge concentratieniveau moet toxische effecten veroorzaken, maar niet tot aanhoudende verschijnselen of sterfte leiden die een deugdelijke evaluatie belemmeren;

— het (de) tussenliggende concentratieniveau(s) moeten zodanig zijn verdeeld dat een gradatie in toxische effecten tussen de lage en hoge concentratie wordt verkregen;

— het lage concentratieniveau moet weinig of geen tekenen van toxiciteit opleveren.

Tussentijds doden van dieren

16. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren bij elk blootstellingsniveau worden verhoogd met het aantal dieren dat voor de voltooiing van het onderzoek zal worden gedood. Het tussentijds doden van dieren moet worden gemotiveerd, en er moet op adequate wijze rekening mee worden gehouden bij de statistische analysen.

▼M4

Satellietonderzoek (reversibiliteitsonderzoek)

17. Een satellietonderzoek (reversibiliteitsonderzoek) kan worden gebruikt voor observatie van reversibiliteit, persistentie of vertraagd tot uiting komen van toxiciteit gedurende een geschikte periode van ten minste 14 dagen na de behandeling. Satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen) bestaan uit tien mannetjes en tien vrouwtjes die gelijktijdig met de proefdieren in het hoofdonderzoek worden blootgesteld. Satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen) moeten bij het hoogste concentratieniveau aan de teststof worden blootgesteld en waar nodig moeten er parallelle luchtcontroles en/of mediumcontroles zijn (zie punt 18).

Controledieren

18. De dieren voor de parallelle negatieve controle (luchtcontrole) worden op identieke wijze behandeld als de dieren in de testgroepen, behalve dat zij worden blootgesteld aan gefilterde lucht in plaats van aan de teststof. Wanneer voor het verkrijgen van de testatmosfeer water of een andere stof wordt gebruikt, moet in plaats van een negatieve controlegroep (luchtcontrolegroep) een mediumcontrolegroep in het onderzoek worden opgenomen. Waar mogelijk moet water worden gebruikt als het medium. Wanneer water wordt gebruikt als het medium moeten de controledieren worden blootgesteld aan lucht met dezelfde relatieve luchtvochtigheid als voor de blootgestelde groepen wordt gebruikt. De keuze van een geschikt medium vindt plaats op basis van een correct uitgevoerde voorstudie of van historische gegevens. Als de toxiciteit van een medium niet goed bekend is, kan de onderzoeksleider ervoor kiezen zowel een negatieve controle (luchtcontrole) als een mediumcontrole te gebruiken, maar dit wordt sterk afgeraden. Indien uit historische gegevens blijkt dat een medium niet toxisch is, is een negatieve controlegroep (luchtcontrolegroep) niet nodig, en wordt alleen een mediumcontrole gebruikt. Indien een voorstudie van een in een medium bereide teststof uitwijst dat er geen toxiciteit optreedt, volgt hieruit dat het medium bij de geteste concentratie niet toxisch is en dat deze mediumcontrole moet worden gebruikt.

BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Toediening van concentraties

19. De dieren worden aan de teststof blootgesteld in de vorm van gas, damp, aerosol of een mengsel daarvan. De te testen fysische toestand hangt af van de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, de gekozen concentraties en/of de meest waarschijnlijke fysische vorm waarin de teststof bij hantering en gebruik aanwezig is. Hygroscopische en chemisch reactieve teststoffen moeten worden getest in drogeluchtomstandigheden. Er dient op te worden gelet dat er geen explosieve concentraties optreden. Deeltjesmateriaal kan aan mechanische processen worden onderworpen om een kleinere deeltjesgrootte te verkrijgen. Nadere richtsnoeren zijn opgenomen in GD 39 (2).

Deeltjesgrootteverdeling

20. Voor alle aerosolen en voor dampen die tot aerosolen kunnen condenseren, wordt de deeltjesgrootte bepaald. Om blootstelling van alle relevante delen van de ademhalingswegen mogelijk te maken, worden aerosolen met een massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) tussen 1 en 3 μm en een geometrische standaardafwijking (σ_g) tussen 1,5 en 3,0 aanbevolen (4). Hoewel redelijkerwijs moet worden getracht deze normwaarden te halen, wordt het oordeel van een deskundige gegeven als dit niet mogelijk blijkt. Metaaldampdeeltjes kunnen bijvoorbeeld kleiner zijn dan deze normwaarde, en geladen deeltjes en vezels juist groter.

▼M4

Bereiding van de teststof in een medium

21. In het ideale geval wordt de teststof zonder medium getest. Indien het noodzakelijk is een medium te gebruiken om een geschikte deeltjesgrootte en concentratie van de teststof te verkrijgen, wordt de voorkeur gegeven aan water. Wanneer een teststof wordt opgelost in een medium, moet de stabiliteit ervan worden aangetoond.

CONTROLE VAN DE BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Luchtdoorstroming in de kamer

22. Tijdens elke blootstelling wordt de luchtdoorstroming in de blootstellingskamer zorgvuldig geregeld, voortdurend gecontroleerd en ten minste elk uur geregistreerd. De real-time controle van de concentratie (of stabiliteit in de tijd) van de testatmosfeer is een integrale meting van alle dynamische parameters waarbij indirect alle relevante dynamische parameters voor het verkrijgen van de atmosfeer kunnen worden geregeld. Indien de concentratie real-time wordt gecontroleerd, kan de frequentie waarmee de luchtdoorstroming wordt gemeten, worden teruggebracht tot één meting per blootstelling per dag. Wanneer kamers voor blootstelling via de neus alleen worden gebruikt, moet er in het bijzonder op worden gelet dat de uitgeademde lucht niet opnieuw wordt ingeademd. Het zuurstofgehalte moet ten minste 19 % bedragen en het kooldioxidegehalte niet meer dan 1 %. Als er redenen zijn om aan te nemen dat deze normwaarde niet kan worden gehaald, moet de zuurstof- en kooldioxideconcentratie worden gemeten. Wanneer uit de metingen op de eerste blootstellingsdag blijkt dat de waarden voor deze gassen op het juiste niveau liggen, zijn geen verdere metingen nodig.

Temperatuur en relatieve vochtigheid in de kamer

23. De temperatuur in de kamer moet op 22 ± 3 °C worden gehouden. Voor zover mogelijk wordt, zowel bij blootstelling via de neus alleen als bij blootstelling van het hele lijf, tijdens elke blootstelling de relatieve vochtigheid in het ademhalingsgebied van de dieren doorlopend gecontroleerd en ten minste elk uur geregistreerd. De relatieve vochtigheid wordt bij voorkeur tussen 30 en 70 % gehouden, al zal dit niet altijd haalbaar (bv. wanneer mengsels op waterbasis worden getest) of meetbaar zijn vanwege interferentie tussen de teststof en de testmethode.

Teststof: nominale concentratie

24. Waar mogelijk wordt de nominale concentratie in de blootstellingskamer berekend en geregistreerd. De nominale concentratie is de massa van de gegenereerde teststof gedeeld door het totale luchtvolume dat door het inhalatiekamersysteem wordt geleid. De nominale concentratie wordt niet gebruikt om de blootstelling van de dieren te karakteriseren, maar een vergelijking tussen de nominale concentratie en de feitelijke concentratie vormt een aanwijzing voor het rendement van het testsysteem en kan bijgevolg worden gebruikt om problemen bij het genereren te ontdekken.

Teststof: feitelijke concentratie

25. De feitelijke concentratie is de concentratie van de teststof zoals bemonsterd in het ademhalingsgebied van de dieren in een inhalatiekamer. De feitelijke concentraties kunnen worden verkregen door toepassing van specifieke methoden (bv. rechtstreekse bemonstering of op adsorptie of een chemische reactie gebaseerde methoden, gevolgd door analytische karakterisering) of niet-specifieke methoden, zoals gravimetrische filteranalyse. Gravimetrische analysen zijn alleen aanvaardbaar voor aerosolen van poeders met één component of aerosolen van vloeistoffen met een geringe vluchtigheid en moeten worden ondersteund met passende specifieke karakteriseringen van de teststof voorafgaand aan de studie. De concentratie van aerosolen van

▼M4

poeders met meerdere componenten kan ook door middel van gravimetrische analyse worden bepaald. In dat geval zijn echter analytische gegevens vereist die aantonen dat de samenstelling van het materiaal in de lucht vergelijkbaar is met die van het uitgangsmateriaal. Als deze informatie niet beschikbaar is, kan het nodig zijn in de loop van de studie op gezette tijden een nieuwe analyse van de teststof (idealiter in de toestand in de lucht) uit te voeren. Voor geaerosoliseerde stoffen die kunnen verdampen of sublimeren, moet worden aangetoond dat met de gekozen methoden alle fasen zijn verzameld.

26. Er wordt zo mogelijk één partij van de teststof gebruikt gedurende het onderzoek en het testmonster wordt bewaard onder omstandigheden waarbij de zuiverheid, homogeniteit en stabiliteit behouden blijven. Voor aanvang van de studie worden de teststof, met inbegrip van de zuiverheid, en indien technisch mogelijk de identiteit en de hoeveelheden van vastgestelde verontreinigingen en onzuiverheden gekarakteriseerd. Dit kan onder meer met de volgende gegevens worden aangetoond: retentietijd en relatief piekoppervlak, moleculair gewicht op basis van massaspectroscopie of gaschromatografie, of andere schattingen. Hoewel het testlaboratorium niet verantwoordelijk is voor de identiteit van het testmonster, kan het raadzaam zijn dat het testlaboratorium de karakterisering van de opdrachtgever ten minste in beperkte mate bevestigt (bv. kleur, fysische aard enz.).

27. De blootstellingsatmosfeer wordt zo constant mogelijk gehouden. Een voorziening voor real-time controle, zoals een aerosol-fotometer voor aerosolen, of een totaal-koolwaterstofanalysator voor dampen, kunnen worden gebruikt om de stabiliteit van de blootstellingsvoorwaarden aan te tonen. De feitelijke concentratie in de kamer moet gedurende elke blootstellingsdag voor elk blootstellingsniveau ten minste 3 keer worden gemeten. Als dit vanwege de beperkte luchtdoorstroming of lage concentraties niet mogelijk is, is één monster per blootstellingsperiode aanvaardbaar. In het ideale geval wordt dit monster in dat geval gedurende de volledige blootstellingsperiode verzameld. Het verschil tussen individuele monsters van de kamerconcentratie en de gemiddelde kamerconcentratie mag bij gassen en dampen niet meer dan ± 10 % en bij vloeibare of vaste aerosolen niet meer dan ± 20 % bedragen. De equilibratietijd van de kamer (t_{95}) wordt berekend en gerapporteerd. De blootstellingsduur omvat de tijd waarin de teststof wordt gegenereerd. Hierbij wordt rekening gehouden met de equilibratietijd van de kamer (t_{95}) en de vervaltijd. In GD 39 (2) zijn richtsnoeren voor het schatten van t_{95} opgenomen.

28. Voor zeer complexe mengsels bestaande uit dampen/gassen en aerosolen (bv. verbrandingsatmosferen en teststoffen die zijn ontleend aan doelgerichte eindproducten of apparaten), kan elke fase zich in een inhalatiekamer verschillend gedragen. Daarom moet van elke fase (damp/gas en aerosol) ten minste één indicatorstof (analyt) worden gekozen, normaliter het voornaamste werkzame bestanddeel in het mengsel. Wanneer de teststof een mengsel is, wordt de analytische concentratie vermeld voor het totale mengsel, en niet slechts voor het werkzame bestanddeel of de indicatorstof (analyt). Aanvullende informatie over feitelijke concentraties is opgenomen in GD 39 (2).

Teststof: deeltjesgrootteverdeling

29. De deeltjesgrootteverdeling van aerosolen wordt voor ieder concentratieniveau ten minste wekelijks bepaald met behulp van een cascade-impactor of een alternatief instrument, zoals een aerodynamische deeltjesgroottemeter. Indien kan worden aangetoond dat de met een cascade-impactor en het alternatieve instrument verkregen resultaten gelijkwaardig zijn, mag het alternatieve instrument gedurende de hele studie worden gebruikt.

▼M4

30. Parallel aan het primaire instrument wordt een tweede instrument, zoals een gravimetrisch filter of een impinger/gas bubbler gebruikt om de doeltreffendheid van de verzameling met het primaire instrument te bevestigen. De door middel van deeltjesgrootteanalyse en filteranalyse verkregen massaconcentraties moeten in redelijke mate overeenkomen (zie GD 39 (2)). Indien in een vroeg stadium van de studie de gelijkwaardigheid bij alle geteste concentraties kan worden aangetoond, zijn verdere bevestigende metingen niet nodig. Met het oog op het dierenwelzijn moeten maatregelen worden genomen om zo veel mogelijk te voorkomen dat niet-overtuigende gegevens worden verkregen waardoor herhaling van het onderzoek noodzakelijk is.

31. Voor dampen wordt de deeltjesgrootte bepaald indien de mogelijkheid bestaat dat de dampen condenseren waardoor aerosolvorming optreedt of indien in een dampatmosfeer deeltjes worden gedetecteerd waarbij gemengde fasen kunnen optreden.

WAARNEMINGEN

32. De dieren worden voor, tijdens en na de blootstellingsperiode klinisch geobserveerd. Afhankelijk van de reactie van de dieren tijdens de blootstelling kunnen frequentere observaties nodig zijn. Indien het observeren van de dieren wordt belemmerd door het gebruik van fixeerbuizen, slecht verlichte kamers voor het hele lijf, of ondoorzichtige atmosferen, moeten de dieren zorgvuldig worden geobserveerd na afloop van de blootstelling. Door de volgende dag vóór de blootstelling te observeren kan eventuele reversibiliteit of verergering van toxische effecten worden beoordeeld.

33. Alle observaties worden geregistreerd en van elk dier wordt een apart overzicht bijgehouden. Wanneer dieren om redenen van dierenwelzijn worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

34. Bij externe observaties van de dieren in de kooien wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en gedragspatronen. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Een meting van de rectale temperatuur kan ondersteunende gegevens opleveren voor met de behandeling of opsluiting verband houdende reflectoire bradypneu of hypo-/hyperthermie. In het onderzoeksprotocol kunnen aanvullende beoordelingen worden opgenomen, zoals kinetiek, biomonitoring, longfunctie, retentie van slecht oplosbare stoffen die zich in longweefsel ophopen, en gedragsveranderingen.

LICHAAMSGEWICHT

35. Het gewicht van elk dier wordt kort voor de eerste blootstelling geregistreerd, op dag 0 en vervolgens twee keer per week (bijvoorbeeld op vrijdag en maandag, om het herstel gedurende een weekend zonder blootstelling aan te tonen, of volgens een tijdsinterval om de systemische toxiciteit te kunnen beoordelen), alsook op het moment waarop het dier sterft of wordt geëuthanaseerd. Indien er gedurende de eerste vier weken geen effecten optreden, kan het lichaamsgewicht van de dieren gedurende het vervolg van de studie wekelijks worden gemeten. Indien satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen) worden gebruikt, moeten de dieren in deze groepen ook gedurende de hele herstelperiode wekelijks gewogen worden. Bij de beëindiging van het onderzoek moeten alle dieren kort voordat zij worden gedood, worden gewogen om een onvertekende berekening van de verhouding tussen orgaangewichten en lichaamsgewicht mogelijk te maken.

VOEDSEL- EN WATERVERBRUIK

36. Het voedselverbruik wordt wekelijks gemeten. Het waterverbruik kan ook worden gemeten.

▼M4

KLINISCHE PATHOLOGIE

37. Voor alle dieren, met inbegrip van de dieren in de controlegroepen en satellietgroepen (reversibiliteitsgroepen), worden klinisch-pathologische beoordelingen uitgevoerd wanneer zij worden gedood. Het tijdsinterval tussen het einde van de blootstelling en de aftapping van het bloed moet worden geregistreerd, met name wanneer het desbetreffende eindpunt snel naar de uitgangswaarde terugkeert. Voor parameters met een korte plasmahalfwaardetijd (bv. COHb, CHE, en MetHb) is het wenselijk om na het einde van de blootstelling monsters te nemen.

38. Tabel 1 bevat een lijst van de klinisch-pathologische parameters die doorgaans voor elk toxicologisch onderzoek vereist zijn. Urineonderzoek hoeft niet routinematig te worden uitgevoerd, maar kan worden verricht wanneer dit op grond van de verwachte of waargenomen toxiciteit nuttig wordt geacht. De onderzoeksleider kan ervoor kiezen aanvullende parameters te beoordelen om de toxiciteit van een teststof beter te kunnen karakteriseren (bijv. cholinesterase, lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine of Heinz-lichaampjes, creatinekinase, verhouding myeloïde/erytroïde cellen, troponines, arteriële bloedgassen, lactaatdehydrogenase, sorbitoldehydrogenase, glutamaatdehydrogenase, en gamma-glutamyltranspeptidase.

Tabel 1

Klinisch-pathologische standaardparameters

Hematologisch	
Telling van de erytrocyten	Totale telling van de leukocyten
Hematocriet	Gedifferentieerde telling van de leukocyten
Hemoglobinegehalte	Telling van de bloedplaatjes
Hemoglobinegehalte per erytrocyt	Stollingsvermogen (een van de mogelijkheden kiezen):
Gemiddeld volume van de erytrocyten	— Prothrombinetijd
Hemoglobinegehalte per volume-eenheid erytrocyten	— Stollingstijd
Reticulocyten	— Partiële thromboplastinetijd
Klinisch-chemisch	
Glucose (*)	Alanineaminotransferase
Totaal cholesterol	Aspartaataminotransferase
Triglyceriden	Alkalische fosfatase
Bloedureumstikstof	Kalium
Totaal bilirubine	Natrium
Creatinine	Calcium
Totaal eiwit	Fosfor
Albumine	Chloride
Globuline	
Urineonderzoek (facultatief)	
Voorkomen (kleur en troebelheid)	Totaal eiwit
Volume	Glucose
Soortelijk gewicht of osmolaliteit	Bloed/bloedcellen
pH	

(*) omdat een lange vastperiode tot systematische fouten in de glucosemetingen voor de behandelde versus de controledieren kan leiden, moet de onderzoeksleider bepalen of het passend is om de dieren te laten vasten. Indien een vastperiode wordt gebruikt, moet deze zijn afgestemd op de gebruikte diersoort; voor de rat kan dit 16 uur zijn (een nacht vasten). De bepaling van het glucosegehalte in nuchtere toestand kan plaatsvinden na een nacht vasten tijdens de laatste week van de blootstelling, of na een nacht vasten voorafgaand aan de obductie (in het laatste geval gelijktijdig met de bepaling van alle andere klinisch-pathologische parameters).

▼**M4**

39. Wanneer er aanwijzingen zijn dat afzetting en retentie primair in de onderste luchtwegen (d.w.z. de alveolen) plaatsvindt, kan bronchoalveolaire lavage de aangewezen techniek zijn voor kwantitatieve analyse van op hypothesen gebaseerde dosis-effectparameters, waarbij de nadruk ligt op alveolitis, longontsteking en fosfolipidose. Op deze manier kunnen veranderingen in de dosis-responsverhouding en het verloop in de tijd van alveolair letsel adequaat worden onderzocht. De bronchoalveolaire lavagevloeistof kan worden geanalyseerd met betrekking tot de totale en gedifferentieerde tellingen van de leukocyten, totaal eiwit, en lactaatdehydrogenase. Ook parameters die wijzen op lysosomale beschadigingen, fosfolipidose, fibrose en door irritatie of allergie veroorzaakte ontstekingen, kunnen worden overwogen; het kan hierbij onder meer gaan om de bepaling van pro-inflammatoire cytokinen/chemokinen. Bronchoalveolaire lavagemetingen vormen doorgaans een aanvulling op de resultaten van histopathologisch onderzoek, maar kunnen deze niet vervangen. In GD 39 (2) zijn richtsnoeren voor het uitvoeren van longlavage opgenomen.

OFTALMOLOGISCH ONDERZOEK

40. Met behulp van een oftalmoscoop of een ander geschikt apparaat wordt vóór de toediening van de teststof bij alle dieren, en bij de beëindiging van het onderzoek bij alle hogeconcentratie- en controlegroepen, een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd van de fundus, refractieve media, iris en bindvliezen. Indien er veranderingen in de ogen worden vastgesteld, moeten alle dieren in de andere groepen worden onderzocht, met inbegrip van de satellietgroep (reversibiliteitsgroep).

MACROPATHOLOGIE EN ORGAANGEWICHTEN

41. Op alle proefdieren, met inbegrip van de dieren die tijdens de test sterven of met het oog op het dierenwelzijn uit het onderzoek worden genomen, wordt macroscopische obductie uitgevoerd, indien mogelijk na volledig uitbloeden. Voor ieder dier moet worden geregistreerd hoeveel tijd er is verstreken tussen het einde van hun laatste blootstelling en het moment waarop zij zijn gedood. Als het niet mogelijk is onmiddellijk nadat een dood dier is aangetroffen een obductie te verrichten, wordt het dier gekoeld (niet bevroren) bij een temperatuur die laag genoeg is om de autolyse tot een minimum te beperken. De obductie wordt zo spoedig mogelijk verricht, normaliter binnen een of twee dagen. Alle met het blote oog waarneembare pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd, met bijzondere aandacht voor veranderingen in de luchtwegen.

42. Tabel 2 bevat een lijst van de organen en weefsels die tijdens de macroscopische obductie in een geschikt medium moeten worden bewaard voor histopathologisch onderzoek. Het is aan de onderzoeksleider om te beoordelen of de organen en weefsels tussen **[**vierkante haken**]** en alle andere organen en weefsels worden bewaard. De **vet** weergegeven organen moeten zo spoedig mogelijk na de sectie ontdaan worden van aanhechtend weefsel en nat worden gewogen om uitdroging te voorkomen. De schildklier en epididymides moeten alleen worden gewogen indien dit nodig is, omdat bij het ontdoen van aanhechtend weefsel artefacten kunnen ontstaan die het histopathologische onderzoek kunnen belemmeren. Weefsels en organen moeten worden gefixeerd in 10 % gebufferde formaldehyde of een ander geschikt fixeermiddel zodra de obductie is verricht, en ten minste 24 tot 48 uur vóór het ontdoen van aanhangend weefsel, afhankelijk van het gebruikte fixeermiddel.

▼M4

Tabel 2

Tijdens de macroscopische obductie bewaarde organen en weefsels

Bijnieren	Slokdarm
Aorta	[Reukkolf]
Beenmerg (en/of vers aspiraat)	**Ovaria**
Hersenen (inclusief coupes van cerebrum, cerebellum en medulla/pons)	Alvleesklier
Blindedarm	Bijschildklieren
Colon	Perifere zenuwen (nervus ischiadicus of nervus tibialis), bij voorkeur dicht bij de spier
Duodenum	Hypofyse
[**Epididymides**]	Prostaat
[Ogen (netvlies, oogzenuw) en oogleden]	Rectum
Dijbeen en kniegewricht	Speekselklieren
Galblaas (indien aanwezig)	Zaadblaasjes
[Klieren van Harder]	Huid
Hart	Ruggenmerg (cervicaal, middenthoracaal en lumbaal)
Ileum	**Milt**
Jejunum	Borstbeen
Nieren	Maag
[Traanklieren (extraorbitaal)]	Tanden
Larynx (3 niveaus, inclusief de steel van de epiglottis)	**Testes**
Lever	**Thymus**
Long (alle lobben op één niveau, inclusief de hoofdbronchiën)	**Schildklieren**
Lymfeklieren van de longhilus, met name bij slecht oplosbare teststoffen in deeltjesvorm. Voor grondiger onderzoek en/of studies met een immunologische focus kunnen aanvullende lymfeklieren worden overwogen, bv. uit de mediastinale, cervicale/submandibulaire en/of auriculaire streek.	[Tong]
Lymfeklieren (distaal van de porte d'entrée)	Luchtpijp (ten minste 2 niveaus, inclusief 1 lengtecoupe door de carina en 1 dwarscoupe)
Borstklier (vrouwelijk)	[Ureter]
Spieren (dij)	[Urinebuis]
Weefsels van de nasofarynx (ten minste 4 niveaus; 1 niveau moet het nasofaryngaal kanaal en het nasofarynx-geassocieerd lymfatisch weefsel (nasal associated lymphoid tissue, NALT) omvatten.	[Urineblaas]
	Uterus
	Doelorganen
	Alle macroscopisch waarneembare letsels en massa's

▼M4

43. De longen worden in hun geheel verwijderd, gewogen en ingedruppeld met een geschikt fixeermiddel bij 20-30 cm waterdruk om ervoor te zorgen dat de longstructuur intact blijft (5). De coupes worden voor alle lobben op één niveau, inclusief de hoofdbronchiën, gemaakt, maar als longlavage wordt uitgevoerd, worden van de niet gespoelde lob op drie niveaus coupes gemaakt (geen seriële coupes).

44. Ten minste 4 niveaus van de weefsels van de nasofarynx worden onderzocht, waarvan er één het nasofaryngaal kanaal moet omvatten (5)(6)(7)(8)(9), om adequaat onderzoek mogelijk te maken van het plaveiselcelepitheel, overgangsepitheel (respiratoir zonder trilharen), ademhalingsepitheel (respiratoir met trilharen) en reukepitheel, alsmede het drainerend lymfatisch weefsel (NALT) (10)(11). Er worden drie niveaus van de larynx onderzocht; een van deze niveaus moet de steel van de epiglottis omvatten (12). Er worden ten minste twee niveaus van de luchtpijp onderzocht, inclusief één lengtecoupe door de carina van de splitsing van de extrapulmonale bronchiën, en één dwarscoupe.

HISTOPATHOLOGIE

45. Alle in tabel 2 genoemde organen en weefsels worden histopathologisch onderzocht bij de controle- en hogeconcentratiegroepen, en bij alle dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden gedood. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan de luchtwegen, doelorganen, en macroscopisch waarneembaar letsel. De organen en weefsels die in de hogeconcentratiegroep letsel vertonen worden bij alle groepen onderzocht. De onderzoeksleider kan ervoor kiezen bij meer groepen histopathologisch onderzoek te verrichten, om een duidelijk verband tussen concentratie en respons aan te tonen. Indien van een satellietgroep (reversibiliteitsgroep) gebruik wordt gemaakt, dan wordt histopathologisch onderzoek verricht op alle weefsels en organen waar bij de behandelde groepen effecten blijken te zijn opgetreden. Indien er bij de hogeblootstellingsgroep buitensporig veel vroegtijdige sterfte of andere problemen optreden die afbreuk doen aan de significantie van de gegevens, wordt de groep die bij de op een na hoogste concentratie is blootgesteld, histopathologisch onderzocht. Getracht moet worden om de macroscopische waarnemingen te correleren aan microscopische bevindingen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

46. Voor elk dier apart worden gegevens over lichaamsgewicht, voedselverbruik, klinische pathologie, orgaangewichten en histopathologie vermeld. Daarnaast worden de gegevens van de klinische observatie in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat specifieke toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of om redenen van dierenwelzijn is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen. Alle resultaten, zowel numerieke als incidenteel, moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen aanvaarde statistische methode mag worden gebruikt; de statistische methoden worden bij de opzet van het onderzoek gekozen.

Testverslag

47. In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen:

Proefdieren en dierhouderij:

— beschrijving van de omstandigheden van de kooi, met inbegrip van: aantal (of verandering in het aantal) dieren per kooi, strooisel, omgevingstemperatuur en relatieve vochtigheid, lichtregime en identificatie van de voeding;

▼M4

— gebruikte soort/stam en motivering voor het gebruik van een ander soort dan ratten; herkomst en historische gegevens kunnen worden vermeld, indien zij betrekking hebben op dieren die zijn blootgesteld onder vergelijkbare omstandigheden wat betreft blootstelling, huisvesting en vasten;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— randomiseringsmethode;

— beschrijving van de eventuele conditionering voorafgaand aan de test, met inbegrip van voeding, quarantaine en behandeling voor ziekte.

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen (met inbegrip van de isomeersamenstelling);

— identificatiegegevens en, indien bekend, CAS-nummer (Chemical Abstracts Service).

Medium:

— motivatie voor het gebruik van het medium en voor de keuze ervan (indien een ander medium dan water wordt gebruikt);

— historische of parallelle gegevens waaruit blijkt dat het medium niet interfereert met de uitkomst van de studie.

Inhalatiekamer:

— gedetailleerde beschrijving van de inhalatiekamer, met inbegrip van de afmetingen en een schematische weergave;

— herkomst en beschrijving van de apparatuur die voor de blootstelling van dieren en het verkrijgen van de atmosfeer is gebruikt;

— apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid, de deeltjesgrootte en de feitelijke concentratie;

— herkomst van de lucht en systeem dat voor de conditionering is gebruikt;

— toegepaste methoden voor de kalibratie van de apparatuur voor het verkrijgen van een homogene testatmosfeer;

— drukverschil (positief of negatief);

— blootstellingspoorten per kamer (blootstelling via de neus alleen); locatie van de dieren in de kamer (blootstelling van het hele lijf);

— stabiliteit van de testatmosfeer;

— locatie van temperatuur- en vochtigheidssensoren en bemonstering van de testatmosfeer in de kamer;

— behandeling van de aangevoerde/geëxtraheerde lucht;

— luchtdebiet, luchtdebiet per blootstellingspoort (blootstelling via de neus alleen) of dierbelasting per kamer (blootstelling van het hele lijf);

— equilibratietijd van de kamer (t_{95});

— aantal volumeveranderingen per uur;

— meetapparaten (indien van toepassing).

Blootstellingsgegevens:

— motivering van de keuze van de doelconcentratie in de hoofdstudie;

▼M4

— nominale concentraties (totale massa van de in de inhalatiekamer geleide teststof, gedeeld door het door de kamer geleide luchtvolume);

— feitelijke concentraties van de in het ademhalingsgebied van de dieren verzamelde teststof; voor mengsels die heterogene fysische vormen produceren (gassen, dampen, aerosolen) kan elke vorm afzonderlijk worden geanalyseerd;

— alle luchtconcentraties worden in massa-eenheden vermeld (mg/l, mg/m^3 enz.), in plaats van in volume-eenheden (ppm, ppb enz.);

— deeltjesgrootteverdeling, massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) en geometrische standaardafwijking (σ_g), onder vermelding van de wijze waarop zij zijn berekend. De individuele deeltjesgrootteanalysen worden vermeld.

Testomstandigheden:

— details van de bereiding van de teststof, met inbegrip van details van de procedures die zijn gevolgd om de deeltjesgrootte van vast materiaal te verlagen of oplossingen van de teststof te bereiden;

— een beschrijving (bij voorkeur met een schematische voorstelling) van de apparatuur die voor het verkrijgen van de testatmosfeer en de blootstelling van de dieren aan de testatmosfeer is gebruikt;

— details van de apparatuur die wordt gebruikt om de temperatuur in de kamer, de vochtigheid en de luchtdoorstroming in de kamer te controleren (d.w.z. ontwikkeling van een kalibratiecurve);

— details van de apparatuur die wordt gebruikt om monsters te verzamelen voor de bepaling van de kamerconcentratie en deeltjesgrootteverdeling;

— details van de toegepaste chemische analysemethode en de validering van die methode (met inbegrip van de efficiëntie van de recovery van de teststof uit het bemonsteringsmedium);

— randomiseringsmethode voor het indelen van de dieren in test- en controlegroepen;

— details van de voeder- en waterkwaliteit (waaronder aard en herkomst van het voeder en herkomst van het water);

— motivering van de keuze van de testconcentraties.

Resultaten:

— een tabel met de temperatuur, vochtigheid en luchtdoorstroming van de kamer;

— een tabel met de nominale en feitelijke concentratiegegevens van de kamer;

— een tabel met de deeltjesgroottegegevens met inbegrip van gegevens over de verzameling van het analytisch monster, de deeltjesgrootteverdeling en de berekening van de MMAD en σ_g;

— een tabel met gegevens over de respons en het concentratieniveau voor elk dier (bv. dieren met toxiciteitsverschijnselen, met inbegrip van sterfte, en de aard, hevigheid, tijdstip van aanvang en duur van de effecten);

▼M4

— een tabel met het gewicht van elk dier;

— een tabel met het voedselverbruik;

— een tabel met klinisch-pathologische gegevens;

— voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar.

Bespreking en interpretatie van de resultaten:

— speciale aandacht wordt besteed aan de beschrijving van de methoden die zijn toegepast om te voldoen aan de criteria van deze testmethode, bv. de limietconcentratie of de deeltjesgrootte;

— er wordt aandacht besteed aan de inhaleerbaarheid van deeltjes in het licht van de algemene bevindingen, in het bijzonder als niet aan de deeltjesgroottecriteria kan worden voldaan;

— in de algehele beoordeling van de studie wordt aandacht besteed aan de consistentie van de methoden die voor de bepalingen van de nominale en feitelijke concentratie zijn toegepast, alsmede aan het verband tussen de feitelijke en de nominale concentratie;

— er wordt aandacht besteed aan de waarschijnlijke doodsoorzaak en overheersende werking (systemisch of plaatselijk);

— er wordt een toelichting gegeven als dieren op humane wijze moesten worden gedood omdat zij pijn hadden of tekenen van hevige en voortdurende angst vertoonden, op basis van de criteria in de OESO-leidraad voor humane eindpunten (3);

— het doelorganen (de doelorganen) moet (moeten) worden aangegeven;

— het NOAEL en LOAEL moet worden bepaald.

LITERATUUR:

(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, pp. 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. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

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

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

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

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

(13) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006 (PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1).

▼**M4**

Aanhangsel 1

DEFINITIE

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M4

B.30. **ONDERZOEK NAAR CHRONISCHE TOXICITEIT**

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 452 (2009) van de OESO. De oorspronkelijke TG 452 werd in 1981 vastgesteld. De ontwikkeling van deze herziene testmethode B.30 werd noodzakelijk geacht in het licht van recente ontwikkelingen op het gebied van dierenwelzijn en wettelijke voorschriften (1)(2)(3)(4). De actualisering van deze testmethode B.30 is gelijktijdig uitgevoerd met de herziening van hoofdstuk B.32 van deze bijlage, Carcinogeniteitsonderzoek, en hoofdstuk B.33 van deze bijlage, Gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit, en had tot doel aanvullende informatie te verkrijgen met behulp van de bij het onderzoek gebruikte dieren en nadere bijzonderheden over de keuze van de dosis te verschaffen. Deze testmethode is bedoeld voor gebruik bij het testen van een breed scala van stoffen, waaronder bestrijdingsmiddelen en industriële chemische stoffen.

2. Het meeste onderzoek naar chronische toxiciteit wordt uitgevoerd bij knaagdiersoorten en deze testmethode is daarom voornamelijk bedoeld voor onderzoek dat bij deze soorten wordt verricht. Als dergelijk onderzoek ook bij andere diersoorten dan knaagdieren moet worden uitgevoerd, kunnen de principes en procedures van deze testmethode, met de nodige aanpassingen, ook samen met die in hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen) (5), worden toegepast, zoals bedoeld in OESO-leidraad nr. 116 over het opzetten en uitvoeren van onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (6).

3. De drie belangrijkste toedieningswegen bij onderzoek naar chronische toxiciteit zijn de orale, de dermale en de inhalatieweg. De keuze van de toedieningsweg is afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de voornaamste blootstellingsroute bij de mens. Nadere informatie over de keuze van de blootstellingsroute wordt verschaft in OESO-leidraad nr. 116 (6).

4. Deze testmethode spitst zich toe op blootstelling via de orale weg, de meest gebruikte route bij onderzoek naar chronische toxiciteit. Hoewel langetermijnonderzoek naar chronische toxiciteit met blootstelling via de dermale of de inhalatieweg ook noodzakelijk kan zijn om de risico's voor de menselijke gezondheid te beoordelen, en/of vereist kan zijn op grond van bepaalde regelgevingskaders, zijn beide blootstellingsroutes technisch bijzonder complex. Dergelijk onderzoek dient per geval te worden opgezet, hoewel de hier beschreven testmethode voor het beoordelen en evalueren van chronische toxiciteit bij orale toediening kan worden gebruikt als basis voor een protocol voor dermaal en inhalatieonderzoek, rekening houdend met aanbevelingen ten aanzien van de behandelingsperiode, klinische en pathologische parameters enz. Er zijn OESO-richtsnoeren beschikbaar voor de toediening van teststoffen via de inhalatieweg (6)(7) en de dermale weg (6). Bij het opzetten van langetermijnonderzoek naar blootstelling via de inhalatieweg moet met name aandacht worden geschonken aan hoofdstuk B.8 van deze bijlage (8) en hoofdstuk B.29 van deze bijlage (9), samen met de OESO-leidraad voor acuut inhalatieonderzoek (7). In geval van tests die via de dermale weg worden uitgevoerd, dient hoofdstuk B.9 van deze bijlage (10) te worden geraadpleegd.

▼M4

5. Het onderzoek naar chronische toxiciteit levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde blootstelling gedurende een aanzienlijk deel van de levensduur van de gebruikte diersoort. Het onderzoek zal informatie opleveren over de toxische effecten van de teststof, de doelorganen aanwijzen en de mogelijkheid van accumulatie aangeven. Daarnaast kan er een inschatting worden gemaakt van het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld. Aan de hand van deze inschatting kunnen vervolgens veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens worden vastgesteld. Bovendien wordt benadrukt dat het van groot belang is de dieren klinisch zorgvuldig te observeren, om zo veel mogelijk informatie te verkrijgen.

6. De doelstellingen van het onder deze testmethode vallende onderzoek omvatten:

— het vaststellen van de chronische toxiciteit van een teststof;

— het vaststellen van de doelorganen;

— het karakteriseren van de dosis-responsverhouding;

— het vaststellen van een niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (No-Observed Adverse Effect Level, NOAEL) of een uitgangspunt voor het bepalen van een benchmarkdosis (BMD);

— het voorspellen van chronische toxische effecten bij niveaus waaraan mensen worden blootgesteld;

— het verschaffen van gegevens om hypothesen over de werkingswijze te toetsen (6).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

7. Bij het beoordelen en evalueren van de toxicologische kenmerken van een teststof moet het testlaboratorium, alvorens het onderzoek uit te voeren, alle beschikbare informatie over de teststof in aanmerking nemen, zodat de opzet van het onderzoek zodanig kan worden afgestemd dat doelmatiger wordt getest op potentiële chronische toxiciteit en het gebruik van dieren wordt geminimaliseerd. Bij het opzetten van het onderzoek kan onder meer gebruik worden gemaakt van informatie over de identiteit, chemische structuur en fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de resultaten van eventuele in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests; de voorgenomen toepassing(en) en de potentiële blootstelling van de mens; de beschikbare (Q)SAR-gegevens en toxicologische gegevens over chemische stoffen met een verwante structuur; de beschikbare toxicokinetische gegevens (kinetiek bij zowel eenmalige toediening als herhaalde toediening, indien beschikbaar), en aan ander onderzoek met herhaalde blootstelling ontleende gegevens. De chronische toxiciteit mag pas worden bepaald nadat eerst toxiciteitsgegevens zijn verkregen van toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening gedurende 28 dagen en/of 90 dagen. Als onderdeel van de algemene beoordeling van de potentiële schadelijke gezondheidseffecten van een bepaalde teststof (11)(12)(13)(14) moet een gefaseerde benadering van de chronische-toxiciteitstests worden overwogen.

8. Voordat met het onderzoek wordt begonnen, moet worden bepaald welke statistische methoden gezien de opzet van de proeven en de doelstellingen het best geschikt zijn voor de analyse van de uitkomsten. Zo moet onder meer worden overwogen of de statistische gegevens tevens een correctie voor overleving en een analyse in geval van voortijdige beëindiging van één of meer groepen moeten omvatten. Aanwijzingen voor de juiste statistische analysen en belangrijke verwijzingen naar internationaal erkende statistische methoden worden gegeven in richtsnoer nr. 116 (6) en richtsnoer nr. 35 over de analyse en evaluatie van onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (15).

▼M4

9. Bij het uitvoeren van onderzoek naar chronische toxiciteit moeten altijd de richtsnoeren en overwegingen worden gevolgd die worden beschreven in het OESO-leidraad nr. 19 betreffende het herkennen, beoordelen en gebruiken van klinische symptomen als humane eindpunten voor proefdiergebruik bij veiligheidsbeoordelingen (16), en met name punt 62 ervan. In dat punt wordt verklaard dat wanneer een dier bij onderzoek met herhaalde toediening klinische symptomen met een voortschrijdend karakter vertoont die leiden tot een verdere verslechtering van de toestand van het dier, op basis van de beschikbare informatie moet worden overwogen of het dier op humane wijze moet worden gedood. Hierbij moet tevens worden overwogen hoe de waarde van de informatie die kan worden gewonnen door het dier in kwestie te handhaven in het onderzoek zich verhoudt tot de algehele conditie van het dier. Als wordt besloten het dier in het onderzoek te handhaven, moet de frequentie van de waarnemingen zo nodig worden verhoogd. Het kan ook zijn dat het mogelijk is de pijn of angst te verlichten door de toediening van de dosis tijdelijk stop te zetten of de testdosis te verminderen, zonder dat dit het doel van het onderzoek nadelig beïnvloedt.

10. Nadere aanwijzingen en een bespreking van de principes voor de keuze van de dosis bij onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit zijn te vinden in leidraad nr. 116 (6) en twee publicaties van het International Life Sciences Institute (17)(18). Welke strategie voor dosiskeuze uiteindelijk wordt toegepast, is afhankelijk van de primaire doelstelling of doelstellingen van het onderzoek (punt 6). Bij het kiezen van de juiste dosisniveaus moet een evenwicht worden getroffen tussen enerzijds de gevarenscreening en anderzijds de karakterisering van de lagedosisrespons en de wisselwerking tussen de twee. Dit is met name relevant in situaties waarin gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (hoofdstuk B.33 van deze bijlage) moet worden uitgevoerd (punt 11).

11. Er moet worden nagegaan of gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (hoofdstuk B.33 van deze bijlage) kan worden uitgevoerd in plaats van afzonderlijke studies naar chronische toxiciteit (deze testmethode B.30) en carcinogeniteit (hoofdstuk B.32 van deze bijlage). De gecombineerde test kost minder tijd en geld dan twee afzonderlijke studies, zonder dat dit ten koste gaat van de gegevenskwaliteit van de onderzoeksfasen. Bij uitvoering van gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (hoofdstuk B.33 van deze bijlage) moet echter zorgvuldig rekening worden gehouden met de principes voor dosiskeuze (punt 9 en de punten 20 tot en met 25); bovendien kan de uitvoering van afzonderlijke studies verplicht zijn uit hoofde van bepaalde regelgevingskaders.

12. De definities die in de context van deze testmethode worden gebruikt, zijn te vinden aan het eind van dit hoofdstuk en in leidraad nr. 116 (6).

PRINCIPE VAN DE TEST

13. De teststof wordt dagelijks in trapsgewijs stijgende doses aan diverse groepen proefdieren toegediend, normaal gezien twaalf maanden achter elkaar, hoewel afhankelijk van de wettelijke voorschriften een kortere of langere duur kan worden gekozen (zie punt 33). De gekozen duur moet voldoende lang zijn zodat de eventuele effecten van cumulatieve toxiciteit tot uiting komen, zonder de storende effecten van geriatrische veranderingen. Afwijkingen van een blootstellingsduur van twaalf maanden moeten worden verantwoord, met name als voor een kortere duur wordt gekozen. De teststof wordt normaal gezien toegediend via de orale weg, hoewel ook de inhalatie- of de dermale weg geschikt kan zijn. Het onderzoek kan ook zo worden opgezet dat sommige dieren tussentijds worden gedood, bv. na drie en zes maanden, en dat met het oog hierop nieuwe groepen proefdieren kunnen worden toegevoegd (zie punt 19). Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden gedood, wordt obductie verricht. Dieren die aan het eind van het onderzoek nog in leven zijn worden gedood en ook hierop wordt obductie verricht.

▼M4

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

14. Deze testmethode heeft hoofdzakelijk betrekking op de beoordeling en evaluatie van chronische toxiciteit bij knaagdieren (zie punt 2). Op grond van bepaalde regelgevingskaders kan echter vergelijkbaar onderzoek bij niet-knaagdieren vereist zijn. De keuze van de soort moet worden verantwoord. Bij het opzetten en uitvoeren van onderzoek naar chronische toxiciteit bij andere diersoorten dan knaagdieren moeten, zo nodig, de in deze testmethode beschreven principes als uitgangspunt worden genomen, in combinatie met de principes in hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen) (5). Nadere informatie over de keuze van de soort en de stam is te vinden in leidraad nr. 116 (6).

15. In deze testmethode wordt de voorkeur gegeven aan ratten, maar er kunnen ook andere knaagdiersoorten worden gebruikt, bijvoorbeeld muizen. Aan het gebruik van ratten en muizen als experimentele modellen wordt de voorkeur gegeven vanwege hun betrekkelijk korte levensduur, het grootschalige gebruik ervan bij farmacologisch en toxicologisch onderzoek, hun gevoeligheid voor tumorinductie en de beschikbaarheid van voldoende gekarakteriseerde stammen. Vanwege deze kenmerken is een grote hoeveelheid informatie over hun fysiologie en pathologie beschikbaar. Er worden jonge gezonde volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. Het onderzoek naar chronische toxiciteit uitgevoerd bij dieren van dezelfde stam en herkomst als die welke zijn gebruikt voor het inleidende toxiciteitsonderzoek van kortere duur. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

16. De dieren kunnen individueel of in kleine groepjes van hetzelfde geslacht worden ondergebracht; individuele hokken moeten alleen worden overwogen als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is (19)(20)(21). De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve luchtvochtigheid ten minste 30 % moet bedragen en, behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte, bij voorkeur niet hoger mag zijn dan 70 %, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. Het voer moet aan alle behoeften van de geteste soort voldoen en het gehalte aan onzuiverheden in het voer, met inbegrip van maar niet beperkt tot residuen van bestrijdingsmiddelen, persistente organische verontreinigende stoffen, fyto-oestrogenen, zware metalen en mycotoxinen, die van invloed kunnen zijn op de resultaten van het onderzoek, moet zo laag mogelijk zijn. Van tijd tot tijd moet er analytische informatie over het gehalte aan nutriënten en onzuiverheden in het voer worden samengesteld, ten minste aan het begin van het onderzoek en wanneer er veranderingen zijn in de gebruikte partij. Deze informatie moet in het eindverslag worden opgenomen. Ook over het bij het onderzoek gebruikte drinkwater moet analytische informatie worden verstrekt. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende vermenging van de teststof te zorgen en te voldoen aan de voedingsbehoeften van de dieren wanneer die teststof via het voer wordt toegediend.

Voorbereiding van de dieren

17. Er worden gezonde dieren gebruikt die gedurende ten minste zeven dagen aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. Bij knaagdieren moet de toediening van de dosis zo snel mogelijk na het spenen en de acclimatisatie beginnen en bij voorkeur voordat de dieren acht weken oud zijn. Van de proefdieren worden de volgende kenmerken vastgelegd: soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en leeftijd. Aan het begin van het onderzoek moeten de gewichtsverschillen tussen de geslachten minimaal zijn en niet meer bedragen dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht van elk geslacht.

▼M4

De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. Na de willekeurige indeling mogen er binnen de geslachten geen significante verschillen in lichaamsgewicht zijn tussen de groepen. Als er statistisch significante verschillen zijn, moet de willekeurige indeling zo mogelijk opnieuw worden uitgevoerd. Aan elk dier moet een uniek identificatienummer worden toegekend in de vorm van een permanent merkteken dat met behulp van een tatoeage, een onder de huid ingebrachte microchip of via een andere geschikte methode wordt aangebracht.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

18. Beide geslachten moeten worden gebruikt. Er moet een voldoende groot aantal dieren worden gebruikt om een grondige biologische en statistische evaluatie aan het einde van het onderzoek mogelijk te maken. Bij gebruik van knaagdieren moeten normaal gezien bij elk dosisniveau ten minste 20 dieren per geslacht per groep worden gebruikt. Bij gebruik van niet-knaagdieren wordt aanbevolen ten minste 4 dieren per geslacht per groep te gebruiken. Bij onderzoek waarbij muizen zijn betrokken, is het mogelijk dat per dosisgroep meer dieren nodig zijn om alle vereiste hematologische bepalingen uit te voeren.

Dieren tussentijds doden, satellietgroepen en verklikkerdieren

19. Als onderdeel van het onderzoek kunnen sommige dieren (ten minste 10 dieren/geslacht/groep) tussentijds worden gedood, bijvoorbeeld na zes maanden voor de chronische-toxiciteitsfase, om informatie te verschaffen over de ontwikkeling van toxicologische veranderingen en mechanistische informatie, indien dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Als dergelijke informatie al beschikbaar is uit eerder toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening van de teststof, is het tussentijds doden van dieren mogelijk niet wetenschappelijk gerechtvaardigd. Ook satellietgroepen kunnen in het onderzoek worden opgenomen om de reversibiliteit van eventuele toxicologische effecten als gevolg van de onderzochte teststof te controleren. Hiervoor wordt doorgaans alleen het hoogste dosisniveau van het onderzoek met controlegroep gebruikt. Tijdens het onderzoek kan zo nodig ook een aanvullende groep verklikkerdieren (doorgaans vijf dieren per geslacht) worden opgenomen met het oog op de monitoring van de ziektestatus (22). Als dieren tussentijds zullen worden gedood, of satelliet- of verklikkergroepen in het onderzoek zullen worden opgenomen, moet het aantal dieren in de onderzoeksopzet worden vermeerderd met het aantal dieren dat voor afronding van het onderzoek zal worden gedood. Deze dieren moeten normaal gezien aan dezelfde waarnemingen worden onderworpen, met inbegrip van waarnemingen met betrekking tot het lichaamsgewicht, het voedsel- en waterverbruik, hematologische en klinisch-biochemische metingen en pathologisch onderzoek, als de dieren in de chronische-toxiciteitsfase van het hoofdonderzoek, hoewel de metingen (in de groepen met dieren die tussentijds worden gedood) ook kunnen worden beperkt tot specifieke, belangrijke parameters als neurotoxiciteit of immunotoxiciteit.

Dosisgroepen en dosering

20. Aanwijzingen voor alle aspecten van de dosiskeuze en het interval tussen de dosisniveaus zijn te vinden in leidraad nr. 116 (6). Ten minste drie dosisniveaus en een bijbehorende controle zijn vereist, tenzij een limiettest wordt uitgevoerd (zie punt 27). De dosisniveaus worden doorgaans gebaseerd op de resultaten van korter onderzoek met herhaalde toediening of van bereikbepalingonderzoek, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante stoffen beschikbaar zijn.

▼M4

21. Tenzij dit vanwege de fysisch-chemische aard of biologische kenmerken van de teststof onmogelijk is, moet de hoogste dosis normaliter zodanig worden gekozen dat de voornaamste doelorganen en toxische effecten worden vastgesteld zonder dat dit leed, ernstige toxiciteit, ziekteverschijnselen of sterfte veroorzaakt. Het hoogste dosisniveau moet, rekening houdend met de in punt 22 beschreven factoren, zodanig worden gekozen dat er tekenen van toxiciteit optreden, die bijvoorbeeld blijken uit een lichte achteruitgang van de gewichtstoename (ca. 10 %).

22. Afhankelijk van het doel van het onderzoek (zie punt 6), kan echter een hoogste dosis worden gekozen die lager is dan de dosis waarbij tekenen van toxiciteit optreden, bv. als een dosis een zorgwekkend schadelijk effect heeft dat niettemin weinig invloed heeft op de levensduur of het lichaamsgewicht. De hoogste dosis mag niet hoger zijn dan 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag (limietdosis: zie punt 27).

23. De dosisniveaus en het interval tussen de dosisniveaus kunnen zo worden gekozen dat een dosisrespons en een NOAEL of ander beoogd resultaat van het onderzoek, bv. een BMD (zie punt 25), bij het laagste dosisniveau worden vastgesteld. Factoren die moeten worden meegewogen bij de toediening van lagere doses omvatten de verwachte helling van de dosis-responscurve, de doses waarbij belangrijke veranderingen in het metabolisme of de toxische werking kunnen optreden, de verwachte locatie van een drempelwaarde of de verwachte locatie van een uitgangspunt voor extrapolatie naar lage doses.

24. Het gekozen interval tussen de dosisniveaus hangt van de kenmerken van de teststof af en kan niet in deze testmethode worden voorgeschreven, maar doorgaans leveren twee- tot viervoudige intervallen goede testresultaten op wanneer zij worden gebruikt voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van ongeveer 6 à 10) tussen twee doseringen. In het algemeen moet het gebruik van factoren boven de 10 worden vermeden en worden verantwoord als deze toch worden gebruikt.

25. Zoals nader wordt beschreven in leidraad nr. 6 (6), moet bij de keuze van de dosis rekening worden gehouden met het volgende:

— bekende of vermoedelijke niet-lineariteiten of buigpunten in de dosisrespons;

— toxicokinetiek en dosisbereiken waarbij metabolische inductie, verzadiging of niet-lineariteit tussen externe en interne doses al dan niet optreden;

— precursorletsels en merkstoffen die het effect of indicatoren die de werking van de voornaamste fundamentele biologische processen aangeven;

— de voornaamste (of vermoedelijke) aspecten van de werkingswijze, zoals doses waarbij de cytotoxiciteit begint toe te nemen, hormoonniveaus verstoord raken, homeostatische mechanismen het onderspit delven enz.;

— gebieden van de dosis-responscurve die een bijzonder robuuste schatting behoeven, bv. op het gebied van de verwachte BMD of een vermoedelijke drempelwaarde;

— de verwachte blootstellingsniveaus bij de mens.

▼M4

26. De controlegroep wordt niet of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, met medium behandeld. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Als er een medium wordt gebruikt, wordt aan de controlegroep de hoogste gebruikte mediumdosis van de dosisgroepen toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en deze een geringere voedingsopname veroorzaakt omdat de voeding daardoor minder appetijtelijk is, kan een aanvullende paargevoede controlegroep dienen als een meer geschikte controle.

27. Indien op grond van tijdens inleidend onderzoek verkregen informatie kan worden verwacht dat een test op één dosisniveau dat overeenstemt met ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek waarschijnlijk geen schadelijke effecten geeft en als, op grond van gegevens van tests met structureel verwante stoffen, geen toxiciteit wordt verwacht, kan een volledig onderzoek waarbij van drie dosisniveaus gebruik wordt gemaakt mogelijk achterwege blijven. Een limiet van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag kan van toepassing zijn, tenzij het blootstellingsniveau bij de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

Bereiding en toediening van doses van de teststof

28. De teststof wordt normaal gezien oraal, met de voeding of het drinkwater, of via een maagsonde toegediend. Nadere informatie over de toedieningswegen en -methoden is te vinden in leidraad nr. 116 (6). De toedieningsweg en de toedieningsmethode zijn afhankelijk van het doel van het onderzoek, de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, de biologische beschikbaarheid ervan en de voornaamste blootstellingsroute en -methode bij de mens. De keuze van de toedieningsweg en de toedieningsmethode moet worden gemotiveerd. In het belang van het welzijn van de dieren moet de orale maagsonde normaal gesproken alleen worden gekozen in geval van agentia waarvoor de gekozen toedieningsweg- en methode redelijk overeenkomen met de mogelijke blootstelling van de mens (bijvoorbeeld bij geneesmiddelen). Bij in de voeding of het milieu voorkomende chemische stoffen zoals bestrijdingsmiddelen wordt de teststof doorgaans toegediend via de voeding of het drinkwater. In sommige scenario's, bijvoorbeeld bij beroepsmatige blootstelling, kan toediening via andere wegen geschikter zijn.

29. Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspendeerd. Er moet rekening worden gehouden met de volgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is: effecten op de absorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken ervan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren. Aanbevolen wordt eerst na te gaan of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/emulsie in olie (bv. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxische kenmerken daarvan bekend zijn. Er moet informatie beschikbaar zijn over de stabiliteit van de teststof en de homogeniteit van de doseeroplossingen of het voer (naargelang hetgeen van toepassing is) onder de toedieningsomstandigheden (bv. dieet).

30. Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Bij langetermijnonderzoek naar toxiciteit waarbij de teststof via het voer wordt toegediend, mag de concentratie van de teststof in de voeding de bovengrens van 5 % van de totale hoeveelheid voer normaal gesproken niet overschrijden om onevenwichtigheden in de voeding te vermijden. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (mg/kg voer of ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier (mg/kg lichaamsgewicht), berekend op weekbasis, worden gebruikt. Aangeven moet worden welk alternatief is gebruikt.

▼M4

31. Bij orale toediening wordt de teststof dagelijks (zeven dagen per week) aan de dieren toegediend, doorgaans gedurende twaalf maanden (zie ook punt 33), hoewel afhankelijk van de wettelijke voorschriften een langere duur nodig kan zijn. Elk ander doseringsschema, bv. vijf dagen per week, moet worden gemotiveerd. Bij toediening via de huid worden de dieren normaal gesproken ten minste 6 uur per dag, zeven dagen per week met de teststof behandeld, zoals wordt beschreven in hoofdstuk B.9 van deze bijlage (10), gedurende twaalf maanden. Blootstelling via inhalatie geschiedt 6 uur per dag, zeven dagen per week, maar ook blootstelling gedurende vijf dagen is mogelijk, indien dit wordt verantwoord. De blootstellingsperiode duurt doorgaans twaalf maanden. Als andere knaagdiersoorten dan ratten uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan de maximale blootstellingsduur worden aangepast om soortspecifieke symptomen van angst te minimaliseren. Een blootstellingsduur van minder dan 6 uur per dag moet worden gemotiveerd. Zie ook hoofdstuk B.8 van deze bijlage (8).

32. Indien de teststof via een maagsonde aan de dieren wordt toegediend, moet dit iedere dag op hetzelfde tijdstip gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. Normaliter zal eenmaal per dag één dosis worden toegediend; als een stof lokale irritaties veroorzaakt, kan de dagelijkse doseersnelheid mogelijk worden gehandhaafd door de toe te dienen dosis te splitsen (tweemaal per dag). Het maximale vloeistofvolume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume moet zo laag mogelijk worden gehouden als praktisch uitvoerbaar is en mag bij knaagdieren normaliter niet meer dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht bedragen (22). Variaties in het testvolume moeten tot een minimum worden beperkt door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus hetzelfde constante volume kan worden gebruikt. Een uitzondering vormen mogelijk bijtende of irriterende stoffen, die moeten worden verdund om ernstige lokale effecten te vermijden. Tests bij concentraties die waarschijnlijk een bijtende of irriterende werking hebben op het maag-darmkanaal, moeten worden vermeden.

Duur van het onderzoek

33. Hoewel deze testmethode in de eerste plaats is opgezet als een onderzoek van twaalf maanden naar de chronische toxiciteit, maakt de onderzoeksopzet ook een kortere (bv. 6 of negen maanden) of langere (bv. 18 of 24 maanden) onderzoeksduur mogelijk, afhankelijk van de eisen van de regelgeving of met het oog op specifieke mechanistische doeleinden. Afwijkingen van een blootstellingsduur van twaalf maanden moeten worden verantwoord, met name als voor een kortere duur wordt gekozen. Satellietgroepen die zijn opgenomen ter controle van de omkeerbaarheid van eventuele toxicologische veranderingen als gevolg van de onderzochte teststof moet dosering worden onthouden gedurende niet minder dan vier weken en niet meer dan een derde van de totale onderzoeksduur nadat de blootstelling is gestaakt. Nadere aanwijzingen, onder meer over de overleving tijdens het onderzoek, zijn te vinden in leidraad nr. 116 (6).

WAARNEMINGEN

34. Alle dieren moeten worden onderzocht op ziekelijkheid of sterfte, gewoonlijk aan het begin en einde van elke dag, ook tijdens de weekends en de feestdagen. De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na toediening van de dosis via een maagsonde.

▼M4

35. Alle dieren moeten ten minste eenmaal voor de eerste blootstelling aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen (om intra-individuele vergelijking mogelijk te maken), aan het einde van de eerste week van het onderzoek en vervolgens elke maand. Het waarnemingsprotocol moet zodanig worden opgezet dat verschillen tussen individuele waarnemers worden geminimaliseerd en onafhankelijk zijn van de testgroep. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. De gegevens moeten zorgvuldig worden opgetekend, bij voorkeur met behulp van scoringssystemen die door het testlaboratorium expliciet zijn gedefinieerd. Er moet worden getracht verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Tekenen waarop moet worden gelet zijn onder meer (maar niet alleen): veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding, en onwillekeurige reacties zoals traanvorming, rechtopstaan van het haar, verandering van de pupilgrootte en een ongewoon ademhalingspatroon. Ook verandering in gang, houding en reactiviteit op vastpakken, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotiep gedrag (bijvoorbeeld overmatige lichaamsverzorging, herhaaldelijk ronddraaien) of bizar gedrag (bijvoorbeeld zelfverminking, achteruitlopen) moeten worden opgetekend (24).

36. Vóór de eerste toediening van de teststof wordt bij alle dieren een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een ander geschikt apparaat. Bij beëindiging van het onderzoek wordt dit oftalmologisch onderzoek bij alle dieren verricht, maar ten minste bij die in de hogedosisgroep en in de controlegroep. Als met de behandeling samenhangende veranderingen in de ogen worden geconstateerd, moeten alle dieren worden onderzocht. Als de structurele analyse of andere informatie wijst op oculaire toxiciteit, moet de frequentie van het oogonderzoek worden verhoogd.

37. Voordat met het onderzoek wordt begonnen en met tussenpozen van drie maanden tot ten hoogste twaalf maanden na aanvang van het onderzoek, alsmede bij beëindiging van het onderzoek (als dit langer duurt dan twaalf maanden) kunnen, in geval van chemische stoffen waarvoor uit eerdere toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening gedurende 28 dagen en/of 90 dagen is gebleken dat deze kunnen leiden tot neurotoxische effecten, facultatief onderzoeken van de sensorische reacties op verschillende soorten stimuli (24) (bijvoorbeeld van auditieve, visuele en proprioceptieve aard) (25)(26)(27), alsmede een bepaling van de grijpkracht (28) en de motorische activiteit (29) worden verricht. Meer informatie over de procedures die kunnen worden gevolgd, is te vinden in de desbetreffende literatuur. Er kunnen evenwel ook andere dan de genoemde procedures worden toegepast.

38. In geval van chemische stoffen waarvoor uit eerder toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening gedurende 28 dagen en/of 90 dagen is gebleken dat deze kunnen leiden tot immunotoxische effecten kan facultatief nader onderzoek van dit eindpunt worden verricht bij beëindiging van het onderzoek.

Lichaamsgewicht. voedsel-/waterverbruik en voedselefficiëntie

39. Aan het begin van het onderzoek moeten alle dieren de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gewogen en daarna ten minste één keer per maand. Ook het voedselverbruik en de voedselefficiëntie moeten de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand. Het waterverbruik moet de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand als de stof met het drinkwater wordt toegediend. Meting van het waterverbruik moet ook worden overwogen bij onderzoek waarbij de drinkactiviteit verandert.

▼M4

Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen

40. Bij onderzoek waarbij knaagdieren zijn betrokken, wordt na drie, zes en twaalf maanden, alsook bij beëindiging van het onderzoek (als dit langer duurt dan twaalf maanden) hematologisch onderzoek verricht op ten minste tien mannetjes en tien vrouwtjes per groep, waarbij telkens dezelfde dieren worden gebruikt. Bij muizen moeten mogelijk dieren in satellietgroepen worden gebruikt om alle vereiste hematologische bepalingen te verrichten (zie punt 18). Bij onderzoek met andere soorten dan knaagdieren worden monsters genomen bij een kleiner aantal dieren (bijvoorbeeld 4 dieren per geslacht en per groep bij onderzoek bij honden), op tussentijdse bemonsteringstijdstippen en bij beëindiging van het onderzoek, zoals beschreven voor knaagdieren. Er hoeven bij knaagdieren of andere soorten dan knaagdieren na drie maanden geen metingen te worden verricht als er geen effect is opgetreden op de hematologische parameters in een eerder onderzoek van 90 dagen met vergelijkbare dosisniveaus. Er moeten bloedmonsters worden genomen en daarbij dient te worden genoteerd uit welk lichaamsdeel en hoe de monsters zijn genomen, bijvoorbeeld door middel van een hartpunctie of uit de retro-orbitale sinus, onder verdoving.

41. De volgende parameters worden onderzocht (30): totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de erytrocyten, telling van de bloedplaatjes, hemoglobinegehalte, hematocriet, gemiddeld volume van de erytrocyten (Mean Corpuscular Volume, MCV), hemoglobinegehalte per erytrocyt (Mean Corpuscular Haemoglobin, MCH), hemoglobinegehalte per volume-eenheid erytrocyten (Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration, MCHC), prothrombinetijd en geactiveerde partiële thromboplastinetijd. Afhankelijk van de toxiciteit van de teststof kunnen ook andere hematologische parameters worden gemeten, zoals de Heinz-lichaampjes of andere morfologische afwijkingen van de erytrocyten of methemoglobine. In het algemeen moet een flexibele aanpak worden gehanteerd, afhankelijk van het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde teststof. Als de teststof een effect heeft op het hematopoëtisch systeem, moeten mogelijk ook reticulocytentellingen en beenmergcytologie worden getest, hoewel deze niet routinematig hoeven te worden onderzocht.

42. Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nieren en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op bloedmonsters die van ten minste tien mannetjes en 10 vrouwtjes per groep worden genomen, met dezelfde intervallen als wordt aangegeven voor hematologisch onderzoek, waarbij telkens dezelfde dieren worden gebruikt. Bij muizen moeten mogelijk dieren in satellietgroepen worden gebruikt om alle vereiste klinisch-biochemische bepalingen te verrichten. Bij onderzoek met andere soorten dan knaagdieren worden monsters genomen bij een kleiner aantal dieren (bijvoorbeeld 4 dieren per geslacht en per groep bij onderzoek bij honden), op tussentijdse bemonsteringstijdstippen en bij beëindiging van het onderzoek, zoals beschreven voor knaagdieren. Er hoeven na drie maanden geen metingen te worden verricht, noch bij knaagdieren noch bij andere diersoorten, als er in een eerder onderzoek van 90 dagen bij vergelijkbare dosisniveaus geen effect op klinisch-biochemische parameters is geconstateerd. Het verdient aanbeveling om de dieren (met uitzondering van muizen) vóór de bloedafname een nacht te laten vasten. De volgende parameters worden onderzocht (30): glucose, ureum (ureumstikstof), creatinine, totaal eiwit, albumine, calcium, natrium, kalium, totaal cholesterol, ten minste twee tests voor een hepatocellulaire evaluatie (alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, glutamaatdehydrogenase, totaal galzuren) (31), en ten minste twee tests voor hepatobiliaire evaluatie (alkalische fosfatase, gamma-glutamyltransferase, 5'-nucleotidase, totaal bilirubine, totaal galzuren) (31). Naargelang hetgeen van toepassing is, kunnen andere klinisch-chemische parameters als triglyceriden bij nuchtere toestand, specifieke hormonen en cholinesterase worden gemeten, afhankelijk van de toxiciteit van de teststof. In het algemeen is een flexibele aanpak nodig, afhankelijk van het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

▼M4

43. Bij ten minste tien mannetjes en tien vrouwtjes per groep moet de urine worden geanalyseerd, waarbij op dezelfde regelmatige tijdstippen urinemonsters moeten worden genomen als bij de hematologische en klinisch-chemische monsters. Metingen na drie maanden hoeven niet te worden verricht als bij het urineonderzoek in een eerder onderzoek van 90 dagen bij vergelijkbare dosisniveaus geen effect is geconstateerd. De volgende lijst van parameters is afkomstig uit een deskundige aanbeveling inzake klinisch-pathologisch onderzoek (30): uitzien, volume, osmolaliteit of soortelijk gewicht, pH, totaal eiwit, en glucose. Andere bepalingen omvatten keton, urobilinogeen, bilirubine en occult bloed. Indien nodig kunnen hieraan nog andere parameters worden toegevoegd om het onderzoek van de waargenomen effecten verder uit te breiden.

44. Er wordt in het algemeen van uitgegaan dat in geval van onderzoek bij honden basisgegevens voor hematologische en klinisch-biochemische variabelen vereist zijn vóór aanvang van de behandeling, maar dat die voor onderzoek bij knaagdieren niet hoeven te worden bepaald (30). Als de basisgegevens uit het verleden (zie paragraaf 50) ontoereikend zijn, moet worden overwogen om dergelijke gegevens alsnog te genereren.

Pathologie

Macroscopische obductie

45. Bij alle dieren in het onderzoek moet normaal gesproken een volledige macroscopische obductie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Het is echter mogelijk dat (bij de groepen met dieren die tussentijds moeten worden gedood of in de satellietgroepen) de metingen moeten worden beperkt tot specifieke, belangrijke parameters als neurotoxiciteit of immunotoxiciteit (zie punt 19). Bij deze dieren hoeft geen obductie te worden uitgevoerd en kunnen ook de in de volgende punten beschreven vervolgprocedures achterwege blijven. De onderzoeksleider bepaalt van geval tot geval of obductie op de verklikkerdieren noodzakelijk is.

46. Voor alle dieren, behalve die welke op grond van het tweede deel van punt 45 worden uitgesloten, moeten de orgaangewichten worden bepaald. De bijnieren, de hersenen, de epididymides, het hart, de nieren, de lever, de eierstokken, de milt, de testes, de schildklier (gewogen na fixatie, inclusief bijschildklieren) en de baarmoeder van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten worden ontdaan van aanhechtend weefsel, naargelang hetgeen van toepassing is, en moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. In een onderzoek dat gebruikmaakt van muizen is weging van de bijnieren facultatief.

47. De volgende weefsels moeten in een fixeermiddel worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek (32) geschikt is (de weefsels tussen rechte haken zijn facultatief):

elk macroscopisch waarneembaar letsel	hart	alvleesklier	maag (voormaag, kliermaag)
bijnier	ileum	bijschildklier	[tanden]
aorta	jejunum	perifere zenuw	testis
hersenen (inclusief coupes van cerebrum, cerebellum en medulla/pons)	nier	hypofyse	thymus
blindedarm	traanklier (extraorbitaal)	prostaat	schildklier
cervix	lever	rectum	[tong]

▼M4

coagulans afscheidende klier	long	speekselklier	luchtpijp
colon	lymfeklieren (zowel oppervlakkig als dieper gelegen)	zaadblaasje	urineblaas
duodenum	borstklier (verplicht bij vrouwtjes en facultatief bij mannetjes, indien zichtbaar ontleedbaar)	skeletspier	uterus (inclusief cervix)
epididymis	[bovenste luchtwegen, inclusief neus, neusschelpen en paranasale sinussen]	huid	[ureter]
oog (inclusief netvlies)	slokdarm	ruggenmerg (drie niveaus: cervicaal, mediothoracaal en lumbaal)	[urinebuis]
[dijbeen met gewricht]	[reukkolf]	milt	vagina
galblaas (bij andere diersoorten dan ratten)	ovarium	[borstbeen]	coupe van het beenmerg en/of vers beenmergaspiraat
klier van Harder			

Organen die paarsgewijs voorkomen, bv. nieren en bijnieren, moeten beide worden bewaard. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze kunnen worden aangetast, moeten worden bewaard. Bij onderzoek waarbij de dermale toedieningsweg wordt gebruikt, moeten de organen worden bewaard die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld en is het van essentieel belang dat specifieke monsters van de huid op de toedieningslocatie worden genomen en bewaard. Bij inhalatieonderzoek moet de lijst van luchtwegweefsels die moeten worden bewaard en onderzocht, worden gebaseerd op de aanbevelingen in hoofdstuk B.8 van deze bijlage (8) en hoofdstuk B.29 van deze bijlage (9). In geval van andere organen/weefsels (en in aanvulling op de specifiek bewaarde weefsels van de luchtwegen) moeten de organen worden onderzocht die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld.

Histopathologie

48. Er zijn aanwijzingen beschikbaar voor beste praktijken voor de uitvoering van toxicologisch-pathologisch onderzoek (32). Ten minste het volgende histopathologische onderzoek dient te worden verricht:

— alle weefsels van de dieren in de hogedosisgroep en de controlegroep;

— alle weefsels van dieren die tijdens het onderzoek stierven of werden gedood;

— alle weefsels die macroscopische abnormaliteiten vertonen;

— doelweefsels of weefsels die met de behandeling samenhangende veranderingen vertonen in de hogedosisgroep en van alle dieren in alle andere dosisgroepen;

— organen die paarsgewijs voorkomen, bijvoorbeeld nieren en bijnieren, moeten beide worden onderzocht.

▼M4

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

49. Voor elk dier worden apart gegevens verstrekt over alle geëvalueerde parameters. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of om redenen van dierenwelzijn moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van de aanvang, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren met letsel, de aard van het letsel en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De gemiddelden en standaarddeviaties (voor continue testgegevens) van de dieren waarbij toxische effecten of letsels voorkomen, worden in tabelvorm samengevat, in aanvulling op de inschaling van de letsels.

50. Bij de interpretatie van de onderzoeksresultaten kunnen controlegegevens uit het verleden nuttig zijn, bv. wanneer er aanwijzingen zijn dat de gegevens van de parallelle controlegroepen aanzienlijk afwijken van de recente gegevens van de controledieren in dezelfde testfaciliteit/kolonie. Controlegegevens uit het verleden die ter evaluatie worden aangeboden, moeten afkomstig zijn uit hetzelfde laboratorium, verband houden met dieren van dezelfde leeftijd en stam, en zijn gegenereerd gedurende de vijf jaar die zijn voorafgegaan aan het onderzoek in kwestie.

51. Voor zover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het opzetten van het onderzoek worden gekozen (zie punt 8). Bij de selectie moet zo nodig worden gecorrigeerd voor overleving.

Testverslag

52. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en fysisch-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens;

— herkomst van de stof;

— partijnummer;

— certificaat van chemische analyse.

Medium (indien van toepassing):

— motivering voor de keuze van het medium (wanneer dat geen water is).

Proefdieren:

— gebruikte diersoort/stam en motivering van de keuze;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren bij aanvang van de test;

▼M4

— herkomst, huisvesting, voeding enz.;

— gewicht van elk dier aan het begin van de test.

Testomstandigheden:

— motivering voor de gekozen toedieningsweg en de keuze van de dosis;

— toegepaste statistische methoden voor analyse van de gegevens, indien van toepassing;

— bijzonderheden over de formulering van de teststof, respectievelijk de samenstelling van het voer;

— analytische gegevens over de bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

— de toedieningsweg en bijzonderheden over de toediening van de teststof;

— bij inhalatieonderzoek, alleen via de neus of via het hele lichaam;

— werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (mg/kg of ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voor zover van toepassing;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

Resultaten (er moeten samengevatte gegevens in tabelvorm en gegevens voor elk dier apart worden verstrekt):

— overlevingsgegevens;

— lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;

— voedselverbruik, voedselefficiëntie, indien berekend, en waterverbruik, indien van toepassing;

— gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosisniveau, met inbegrip van toxiciteitsverschijnselen;

— aard, frequentie (en indien beoordeeld, ernst) en duur van de klinische waarnemingen (van voorbijgaande aard dan wel blijvend);

— uitgevoerd oftalmologisch onderzoek;

— hematologische tests;

— klinisch-biochemische tests;

— urinalysetests;

— resultaten van eventueel onderzoek naar neurotoxiciteit of immunotoxiciteit;

— lichaamsgewicht aan het einde van het onderzoek;

— orgaangewichten (en hun verhoudingen, indien van toepassing);

— obductiebevindingen;

— een gedetailleerde beschrijving van alle met de behandeling samenhangende histopathologische bevindingen;

— indien beschikbaar, absorptiegegevens.

▼M4

Statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing

Bespreking van de resultaten, waaronder:

— dosis-responsverhoudingen;

— beoordeling van eventuele informatie over de werkingswijze;

— bespreking van eventuele modelleringsbenaderingen;

— bepaling van BMD, NOAEL of LOAEL;

— controlegegevens uit het verleden;

— relevantie voor de mens.

Conclusies

LITERATUUR:

(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) Hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Subchronische orale toxiciteitstest: toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen).

(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 nr. 116, beschikbaar op de openbare website voor onderzoeksrichtlijnen van de OESO op 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) Hoofdstuk B.8 van deze bijlage, Subacute inhalatietoxiciteit: onderzoek van 28 dagen.

(9) Hoofdstuk B.29 van deze bijlage, Subchronische inhalatietoxiciteit: onderzoek van 90 dagen.

(10) Hoofdstuk B.9 van deze bijlage, Toxiciteit (dermaal) bij herhaalde toediening (28 dagen).

(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) Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (PB L 276 van 20.10.2010, blz. 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**

Aanhangsel 1

DEFINITIE

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze testmethode wordt getest..

▼B

B.31. **ONDERZOEK NAAR DE PRENATALE ONTWIKKELINGS-TOXICITEIT**

1. **METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 414 (2001) van de OESO.

1.1. INLEIDING

Deze testmethode voor ontwikkelingstoxiciteit is bedoeld om algemene informatie te verschaffen over de effecten van prenatale blootstelling op het drachtige proefdier en het zich ontwikkelende organisme in utero; daarbij kunnen de effecten op het moederdier en het afsterven, structurele abnormaliteiten of afwijkende groei bij de foetus worden bepaald. Functionele gebreken zijn weliswaar een belangrijk aspect van ontwikkeling, maar zijn niet in deze testmethode opgenomen. Hierop kan worden getest door een apart onderzoek uit te voeren of door als uitbreiding van dit onderzoek de testmethode voor ontwikkelingsneurotoxiciteit uit te voeren. Voor informatie over het testen op functionele gebreken en andere postnatale effecten kan waar nodig de testmethode voor het reproductietoxiciteitsonderzoek over twee generaties en het onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit worden geraadpleegd.

Specifieke aanpassingen van deze testmethode op basis van specifieke kennis omtrent bijvoorbeeld de fysisch-chemische of toxicologische eigenschappen van de teststof kunnen in bepaalde gevallen nodig zijn. Dergelijke aanpassingen zijn aanvaardbaar wanneer overtuigend wetenschappelijk bewijsmateriaal erop wijst dat de test door de aanpassing meer informatie oplevert. In zo'n geval dient het wetenschappelijk bewijsmateriaal zorgvuldig in het verslag te worden vermeld.

1.2. DEFINITIES

Ontwikkelingstoxicologie: de bestudering van schadelijke effecten op het zich ontwikkelende organisme die kunnen voortvloeien uit blootstelling vóór de bevruchting, tijdens de prenatale ontwikkeling of postnataal tot het tijdstip van geslachtelijke rijping. De belangrijkste uitingen van ontwikkelingstoxiciteit zijn: 1) dood van het organisme, 2) structurele abnormaliteiten, 3) afwijkende groei en 4) functionele gebreken. Ontwikkelingstoxicologie werd vroeger vaak teratologie genoemd.

Schadelijk effect: een aan de behandeling gerelateerde afwijking van de normale toestand die het vermogen van een organisme om te overleven, zich te reproduceren of zich aan de omgeving aan te passen vermindert. In het kader van de ontwikkelingstoxicologie in de ruimste zin vallen hier alle effecten onder die de normale ontwikkeling van de vrucht zowel voor als na de geboorte storen.

Afwijkende groei: een afwijking in het gewicht of de grootte van een of meer organen of het lichaam van een jong.

Afwijkingen (anomalieën): structurele afwijkingen in de ontwikkeling; hieronder vallen zowel misvormingen als variaties (28).

Misvorming/ernstige abnormaliteit: een structurele verandering die als schadelijk voor het dier wordt beschouwd (en ook dodelijk kan zijn) en meestal zelden voorkomt.

▼B

Variatie/lichte abnormaliteit: een structurele verandering die wordt geacht weinig of geen nadelige gevolgen voor het dier te hebben; deze kan van voorbijgaande aard zijn en betrekkelijk vaak in de controlepopulatie voorkomen.

Vrucht: alles wat in enige fase van de ontwikkeling vanaf de bevruchting tot de geboorte uit een bevruchte eicel ontstaat, met inbegrip van de extra-embryonale vliezen alsmede het embryo of de foetus.

Implantatie (innesteling): de hechting van de blastocyst aan de epitheelbekleding van de uterus, met inbegrip van de penetratie door het epitheel van de uterus en de inbedding in het endometrium.

Embryo: de vroege of ontwikkelingsfase van een organisme, meer in het bijzonder het ontwikkelingsproduct van de bevruchting van een eicel nadat de lange as verschenen is en totdat alle belangrijke structuren aanwezig zijn.

Embryotoxiciteit: schadelijke effecten op de normale structuur, ontwikkeling, groei en/of levensvatbaarheid van een embryo.

Foetus: het ongeboren jong in de post-embryonale periode.

Foetotoxiciteit: schadelijke effecten op de normale structuur, ontwikkeling, groei en/of levensvatbaarheid van een foetus.

Abortus: de voortijdige uitstoting uit de uterus van de producten van de conceptie: het embryo of een niet-levensvatbare foetus.

Resorptie: een vrucht die na de implantatie in de uterus sterft en wordt of is geresorbeerd.

Vroege resorptie: aanwijzingen voor implantatie zonder als zodanig te herkennen embryo/foetus.

Late resorptie: een dood embryo of een dode foetus met uiterlijke degeneratieve veranderingen.

NOAEL: afkorting voor „no-observed-adverse-effect level” (dosis zonder waargenomen schadelijke effecten): de hoogste dosis of het hoogste blootstellingsniveau waarbij geen aan de behandeling verbonden schadelijke effecten worden waargenomen.

1.3. REFERENTIESTOF

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt aan drachtige dieren toegediend, normaal gesproken ten minste vanaf de implantatie tot één dag voor de dag waarop ze zullen worden gedood en deze dag dient zo dicht mogelijk bij de normale werpdatum te liggen zonder het risico te lopen dat er gegevens verloren gaan door een voortijdige worp. De testmethode is niet bedoeld om uitsluitend de organogenese-periode te onderzoeken (d.w.z. dag 5-15 bij knaagdieren en dag 6-18 bij het konijn), maar ook de effecten vanaf een eventuele pre-implantatie gedurende de gehele dracht tot de dag vóór de keizersnede. Kort voor de keizersnede worden de vrouwtjes gedood, wordt de inhoud van de uterus onderzocht en worden de foetussen onderzocht op van buitenaf zichtbare anomalieën en veranderingen in zachte weefsels en het skelet.

▼B

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Keuze van de diersoort**

Er wordt aanbevolen de test bij de meest relevante soort uit te voeren en laboratoriumsoorten en -stammen te gebruiken die meestal bij tests op prenatale ontwikkelingstoxiciteit worden gebruikt. Van de knaagdiersoorten verdient de rat de voorkeur en van de niet-knaagdieren het konijn. Als een andere soort wordt gebruikt, dient hiervoor een motivering te worden gegeven.

1.5.2. **Huisvesting en voeding**

De temperatuur in de proefdierruimte dient voor knaagdieren 22 °C (+ 3 °C) en voor konijnen 18 °C (+ 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

De dekking gebeurt in daarvoor geschikte kooien. Dieren die gedekt zijn worden bij voorkeur apart gehuisvest, maar ook groepjes met kleine aantallen dieren zijn aanvaardbaar.

1.5.3. **Voorbereiding van de dieren**

Er worden gezonde dieren gebruikt die gedurende ten minste 5 dagen aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. De kenmerken van de proefdieren qua soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en/of leeftijd worden vastgelegd. De dieren van alle testgroepen dienen zo veel mogelijk hetzelfde gewicht en dezelfde leeftijd te hebben. Op elk dosisniveau worden jonge volwassen vrouwtjes gebruikt die nog geen jongen hebben gehad. De vrouwtjes worden door mannetjes van dezelfde soort en stam gedekt en dekking door mannetjes met dezelfde ouders wordt vermeden. Voor knaagdieren is dag 0 van de dracht de dag waarop een vaginale prop en/of sperma wordt waargenomen. Voor konijnen is dag 0 meestal de dag van de coïtus of kunstmatige inseminatie als deze techniek wordt gebruikt. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer. Vrouwtjes die gedekt zijn worden aselect ingedeeld in de controle- en behandelingsgroepen en als de vrouwtjes in groepjes gedekt zijn, worden de dieren in elk groepje gelijkelijk over de groepen verdeeld. Ook vrouwtjes die door hetzelfde mannetje bevrucht zijn, worden gelijkelijk over de groepen verdeeld.

1.6. UITVOERING

1.6.1. **Aantal en geslacht van de dieren**

Elke test- en controlegroep bevat een zodanig aantal vrouwtjes dat er bij obductie ongeveer 20 vrouwtjesdieren met implantatieplaatsen zijn. Groepen met minder dan 16 dieren met implantatieplaatsen zullen wellicht niet aan de eisen voldoen. Sterfte bij moederdieren maakt het onderzoek niet noodzakelijkerwijs onbruikbaar, mits deze niet hoger ligt dan ongeveer 10 %.

▼B

1.6.2. **Bereiding van de doses**

Als een medium of een ander additief wordt gebruikt om de toediening te vergemakkelijken, moet op de volgende kenmerken worden gelet: de effecten op de resorptie, de distributie, het metabolisme en de retentie of uitscheiding van de teststof, de effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken kunnen wijzigen en de effecten op het verbruik van voer of water of de voedingstoestand van de dieren. Het medium mag geen toxische effecten op de ontwikkeling of de voortplanting hebben.

1.6.3. **Dosering**

Normaal gesproken wordt de teststof dagelijks toegediend vanaf de implantatie (bv. dag 5 na de dekking) tot de dag vóór de geplande keizersnede. Als er voorbereidende onderzoeken beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen grote kans is op verlies vóór implantatie, kan de behandeling worden uitgebreid tot de volledige drachtperiode vanaf de dekking tot één dag voor de dag waarop de dieren zullen worden gedood. Het is bekend dat een onjuiste behandeling of stress tijdens de dracht tot prenataal verlies kan leiden. Om prenataal verlies door niet aan de behandeling gerelateerde factoren te voorkomen worden onnodige manipulaties van drachtige dieren en stress door externe factoren zoals geluiden vermeden.

Er worden ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controlegroep gebruikt. Gezonde dieren worden aselect in de behandelde en controlegroepen ingedeeld. De dosisniveaus worden zodanig gekozen dat er sprake is van geleidelijk oplopende toxische effecten. Tenzij dit vanwege de fysisch/chemische aard of biologische kenmerken van de teststof onmogelijk is, wordt de hoogste dosis zodanig gekozen dat er enige ontwikkelingstoxiciteit en/of toxiciteit bij het moederdier wordt veroorzaakt (klinische verschijnselen of een afname van het lichaamsgewicht), maar geen sterfte of ernstig leed. Ten minste één lagere dosis moet minimale waarneembare toxische effecten veroorzaken. De laagste dosis mag geen verschijnselen van ontwikkelingstoxiciteit of toxiciteit bij het moederdier veroorzaken. Er wordt een dalende reeks dosisniveaus gekozen teneinde een dosisafhankelijke respons en de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten (NOAEL) te bepalen. Intervallen van een factor twee of vier zijn vaak optimaal om de dalende dosisniveaus vast te stellen en het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor tien) tussen de doseringen te gebruiken. Hoewel het de bedoeling is een NOAEL bij het moederdier vast te stellen, kunnen ook onderzoeken waarbij een dergelijke dosis niet wordt bepaald aanvaardbaar zijn (1).

Bij de keuze van de dosisniveaus wordt rekening gehouden met eventueel bestaande gegevens over de toxiciteit en aanvullende informatie over het metabolisme en de toxicokinetiek van de teststof of verwante materialen. Deze informatie zal ook helpen aan te tonen dat het doseringsschema adequaat is.

Er wordt een gelijktijdige controlegroep gebruikt. Deze controlegroep krijgt een schijnbehandeling of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, een behandeling met medium. Aan alle groepen wordt hetzelfde volume teststof of medium toegediend. De aanpak van de dieren in de controlegroep(en) is identiek aan die van de dieren in de testgroepen. Aan de mediumcontrolegroepen wordt de hoogste gebruikte mediumdosis toegediend (zoals in de laagste dosisgroep).

▼B

1.6.4. **Limiettest**

Als een test met één dosis van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij orale toediening volgens de voor dit onderzoek beschreven procedure geen waarneembare toxiciteit bij drachtige dieren of hun jongen veroorzaakt en op grond van bestaande gegevens (bv. over verwante verbindingen qua structuur en/of metabolisme) geen effect te verwachten valt, zal een volledig onderzoek met drie dosisniveaus wellicht niet nodig zijn. Het kan nodig zijn bij de limiettest op grond van de verwachte blootstelling van de mens een hogere orale dosis te gebruiken. Voor andere toedieningsvormen, zoals inhalatie of toediening op de huid, zal het maximaal haalbare blootstellingsniveau vaak worden bepaald en beperkt door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof (bij toediening op de huid mag bijvoorbeeld geen ernstige lokale toxiciteit optreden).

1.6.5. **Toediening van de doses**

De teststof of het medium wordt meestal oraal met een sonde toegediend. Als er een andere toedieningsweg wordt gebruikt, moet worden uitgelegd en gemotiveerd waarom deze gekozen is en kunnen er aanpassingen nodig zijn (2)(3)(4). De teststof wordt elke dag op ongeveer hetzelfde tijdstip toegediend.

De dosis voor een bepaald dier wordt normaal gesproken gebaseerd op de meest recente bepaling van het lichaamsgewicht. Bij de aanpassing van de dosis gedurende het laatste derde deel van de dracht moet echter zorgvuldigheid worden betracht. Voor de keuze van de dosis wordt gebruik gemaakt van bestaande gegevens om overmatige toxiciteit bij het moederdier te voorkomen. Als echter bij de behandelde moederdieren overmatige toxiciteit wordt geconstateerd, worden deze op humane wijze gedood. Als verschillende drachtige dieren tekenen van overmatige toxiciteit vertonen, moet worden overwogen de test bij deze dosisgroep tebeëindigen. Als de stof met een sonde wordt toegediend, wordt deze bij voorkeur met behulp van een maagsonde of een geschikte catheter in één dosis aan de dieren gegeven. Het maximale volume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat: in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Wanneer maïsolie als medium wordt gebruikt, mag het volume niet groter zijn dan 0,4 ml/100 g lichaamsgewicht. Variaties in het toegediende volume worden tot een minimum beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er voor alle dosisniveaus een constant volume wordt toegediend.

1.6.6. **Observatie van de moederdieren**

Ten minste eens per dag wordt er een klinische observatie uitgevoerd en vastgelegd, bij voorkeur elke dag op dezelfde tijd(en), waarbij rekening wordt gehouden met de periode na de toediening waarin de verwachte effecten maximaal zijn. De toestand van de dieren wordt geregistreerd, met inbegrip van dieren die gestorven of stervende zijn, relevante gedragsveranderingen en alle zichtbare tekenen van toxiciteit.

1.6.7. **Lichaamsgewicht en voerconsumptie**

De dieren worden op dag 0 van de dracht of uiterlijk op dag 3 van de dracht als door een externe fokker op een bekend tijdstip gedekte dieren worden geleverd, op de dag waarop de eerste dosis wordt toegediend, ten minste om de drie dagen gedurende de toedieningsperiode en op de dag waarop ze zullen worden gedood, gewogen.

▼B

De voerconsumptie wordt om de drie dagen geregistreerd en dit gebeurt op dezelfde dagen als waarop het lichaamsgewicht wordt bepaald.

1.6.8. **Obductie**

De vrouwtjes worden één dag voor de verwachte worp gedood. Vrouwtjes die vóór de dag waarop ze zullen worden gedood tekenen van abortus of voortijdige worp vertonen, worden gedood en aan een grondig macroscopisch onderzoek onderworpen.

Op het tijdstip waarop het moederdier wordt gedood of tijdens het onderzoek sterft, wordt het macroscopisch onderzocht op structurele abnormaliteiten of pathologische veranderingen. Om beïnvloeding tot een minimum te beperken worden de beoordeling van het moederdier tijdens de keizersnede en de latere analyse van de foetussen bij voorkeur uitgevoerd zonder de testgroep te kennen.

1.6.9. **Onderzoek van de inhoud van de uterus**

Onmiddellijk nadat het dier gedood is of zo spoedig mogelijk na sterfte wordt de uterus verwijderd en wordt nagegaan of de dieren drachtig zijn. Wanneer een dier niet drachtig lijkt, wordt de uterus nader onderzocht (bijvoorbeeld door kleuring met ammoniumsulfide voor knaagdieren en Salewski-kleuring of een andere geschikte methode voor konijnen) om dit te bevestigen (5).

De uterus van drachtige dieren wordt met de cervix gewogen. Bij drachtige dieren die tijdens het onderzoek dood zijn aangetroffen wordt het gewicht van de uterus niet bepaald.

Bij drachtige dieren wordt het aantal corpora lutea bepaald.

De inhoud van de uterus wordt onderzocht op het aantal dode embryo's of foetussen en levensvatbare foetussen. Om het relatieve tijdstip te bepalen waarop de vrucht gestorven is, wordt de mate van resorptie beschreven (zie punt 1.2),

1.6.10. **Onderzoek van de foetussen**

Van elke foetus worden het geslacht en het lichaamsgewicht bepaald.

Elke foetus wordt onderzocht op uitwendige afwijkingen (6).

De foetussen worden onderzocht op afwijkingen in het skelet en de zachte weefsels (zoals variaties en misvormingen of anomalieën) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23)(24). Indeling van afwijkingen in de foetus in categorieën verdient de voorkeur, maar is niet noodzakelijk. Wanneer indeling wel plaatsvindt, worden de criteria voor elke categorie duidelijk vermeld. Er wordt met name gelet op de voortplantingsorganen, die op tekenen van een afwijkende ontwikkeling worden onderzocht.

Bij knaagdieren wordt ongeveer de helft van elk nest behandeld en onderzocht met het oog op skeletafwijkingen. De andere helft wordt behandeld en onderzocht met het oog op afwijkingen in zachte weefsels, waarbij erkende of geschikte methoden voor seriesneden of zorgvuldige macroscopische ontleedtechnieken worden gebruikt.

▼B

Bij niet-knaagdieren zoals konijnen worden alle foetussen onderzocht op afwijkingen van zowel de zachte weefsels als het skelet. De lichamen van deze foetussen worden met behulp van zorgvuldige ontleedtechnieken beoordeeld op afwijkingen van de zachte weefsels, waarbij ook procedures kunnen worden gebruikt om de interne hartstructuur nader te beoordelen (25). Van de helft van de op deze wijze onderzochte foetussen wordt het hoofd verwijderd en behandeld met het oog op de beoordeling van de zachte weefsels (zoals de ogen, de hersenen, de neusgangen en de tong) met gangbare methoden voor seriesneden (26) of een even gevoelige methode. De lichamen van deze foetussen en de overige intacte foetussen worden met behulp van dezelfde methoden als voor knaagdieren zijn beschreven, behandeld en onderzocht met het oog op skeletafwijkingen.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens worden voor de moederdieren en hun jongen individueel gerapporteerd met een overzicht in tabelvorm, waarbij voor elke testgroep worden vermeld: het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of met het oog op een humane behandeling is gedood, het tijdstip van sterfte of humane doding, het aantal drachtige vrouwtjes, het aantal dieren met toxiciteitsverschijnselen, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen met vermelding van de aanvang, de duur en de ernst van de toxische effecten, de aard van de waarnemingen bij de embryo's/foetussen en alle relevante gegevens over de nesten.

De getalsmatige resultaten worden met een geschikte statistische methode geëvalueerd, waarbij het nest als de eenheid voor gegevensanalyse wordt gebruikt. Er wordt een algemeen aanvaarde statistische methode gebruikt; de statistische methoden worden bij de opzet van het onderzoek gekozen en gemotiveerd. Ook de gegevens over de dieren die niet overleven tot het tijdstip waarop ze zouden worden gedood, worden gerapporteerd. Deze gegevens kunnen in de groepsgemiddelden worden opgenomen als dit relevant is. De relevantie van de over deze dieren verkregen gegevens, en derhalve de opname in of uitsluiting van groepsgemiddelden, moet van geval tot geval worden beoordeeld en gemotiveerd.

2.2. EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten van het onderzoek naar de prenatale ontwikkelingstoxiciteit worden aan de hand van de waargenomen effecten beoordeeld. In deze evaluatie wordt de volgende informatie opgenomen:

— de testresultaten bij de moederdieren en de embryo's/foetussen, met inbegrip van een evaluatie van het verband of het ontbreken daarvan tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het optreden en de ernst van alle bevindingen;

— de criteria die zijn gehanteerd voor de indeling van externe afwijkingen en afwijkingen in de zachte weefsels en het skelet bij foetussen in categorieën, als deze indeling heeft plaatsgevonden;

▼B

— eventueel controlegegevens uit het verleden om de interpretatie van de resultaten van het onderzoek te bevorderen;

— de getallen die bij de berekening van alle percentages of indices zijn gebruikt;

— een adequate statistische analyse van de resultaten van het onderzoek, indien van toepassing, waarbij voldoende informatie over de analysemethode wordt vermeld, zodat een onafhankelijke evaluator/statisticus de analyse kan beoordelen en reconstrueren.

Wanneer bij een onderzoek wordt aangetoond dat er geen sprake is van toxische effecten, moet nader onderzoek worden overwogen om de resorptie en de biologische beschikbaarheid van de teststof vast te stellen.

2.3. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Een onderzoek naar de prenatale ontwikkelingstoxiciteit levert informatie op over de effecten van herhaalde blootstelling aan een stof tijdens de dracht op de moederdieren en de ontwikkeling van hun jongen in de uterus. De resultaten van het onderzoek moeten in samenhang met de resultaten van het onderzoek naar subchronische en reproductietoxiciteit alsmede toxicokinetisch en ander onderzoek worden geïnterpreteerd. Aangezien de nadruk ligt op zowel de algemene toxiciteit voor de moederdieren als de ontwikkelingstoxiciteit, zal met de resultaten van het onderzoek tot op zekere hoogte onderscheid kunnen worden gemaakt tussen effecten op de ontwikkeling zonder algemene toxiciteit en effecten die zich alleen voordoen bij niveaus die ook voor het moederdier toxisch zijn (27).

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende specifieke informatie opgenomen:

Teststof:

— de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;

— de identiteit met vermelding van het CAS-nummer indien dit bekend/toegekend is;

— de zuiverheid.

Medium (indien van toepassing):

— motivering voor de keuze van het medium, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren:

— gebruikte soort en stam;

— aantal en leeftijd van de dieren;

— herkomst, huisvesting, voeding enz.;

— het gewicht van elk dier aan het begin van de test.

Testomstandigheden:

— beweegredenen voor de keuze van de dosisniveaus;

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof c.q. de samenstelling van het voer, de concentratie en de stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

▼B

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;

— omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;

— de leefomstandigheden;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

Resultaten:

Gegevens over de toxische reacties bij de moederdieren per dosis, waaronder in elk geval maar niet uitsluitend:

— het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat aan het eind nog in leven is, het aantal drachtige dieren en het aantal dieren waarbij abortus of een voortijdige worp optreedt;

— de sterfdag van dieren die aan het eind van de test niet meer in leven zijn;

— de gegevens van dieren die niet meer in leven zijn op het tijdstip waarop ze zouden worden gedood, worden wel gerapporteerd maar niet in de statistische vergelijking tussen de groepen opgenomen;

— de dag waarop elk afwijkend klinisch verschijnsel wordt waargenomen en het verdere verloop daarvan;

— het lichaamsgewicht, de veranderingen in het lichaamsgewicht en het gewicht van de drachtige uterus, waarbij facultatief de veranderingen in het lichaamsgewicht voor het gewicht van de drachtige uterus kunnen worden gecorrigeerd;

— de voerconsumptie en, indien dit gemeten is, het watergebruik;

— de obductiebevindingen, met inbegrip van het gewicht van de uterus;

— de NOAEL-waarden voor de effecten op de moederdieren en op de ontwikkeling dienen te worden gerapporteerd.

Eindpunten voor ontwikkelingstoxiciteit per dosis voor nesten met implantaties, met inbegrip van:

— het aantal corpora lutea;

— het aantal implantaties en het aantal en percentage levende en dode foetussen en resorpties;

— het aantal en percentage verloren vruchten vóór en na implantatie.

Eindpunten voor ontwikkelingstoxiciteit per dosis voor nesten met levende foetussen, met inbegrip van:

— het aantal en percentage levende jongen;

— de verhouding mannetjes/vrouwtjes;

— het lichaamsgewicht van de foetussen, bij voorkeur per geslacht en voor mannetjes en vrouwtjes samen;

— externe misvormingen, misvormingen in de zachte weefsels en het skelet en andere relevante afwijkingen;

— de criteria voor indeling in categorieën, indien van toepassing:

▼B

— het totale aantal en het percentage foetussen en nesten met externe afwijkingen en afwijkingen in de zachte weefsels en het skelet, alsmede de aard en de frequentie van de verschillende anomalieën en andere relevante afwijkingen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

(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 Uterus der 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 Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47: 229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291 -306.

(12) Fritz, H. (1974). Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966). Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *'Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973). Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992). Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Matemal 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. *Slain '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 Vel. 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. CARCINOGENITEITSONDERZOEK

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 451 (2009) van de OESO (TG 451). De oorspronkelijke TG 451 betreffende carcinogeniteitsonderzoek is in 1981 vastgesteld. De actualisering van testmethode B.32 werd noodzakelijk geacht in het licht van recente ontwikkelingen op het gebied van dierenwelzijn en wettelijke voorschriften (2)(3)(4)(5)(6). De actualisering van deze testmethode B.32 is gelijktijdig uitgevoerd met de herziening van hoofdstuk B.30 van deze bijlage, Onderzoek naar chronische toxiciteit, en hoofdstuk B.33 van deze bijlage, Gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit, en had tot doel aanvullende informatie te verkrijgen met behulp van de bij het onderzoek gebruikte dieren en nadere bijzonderheden over de keuze van de dosis te verschaffen. Deze testmethode B.32 is bedoeld voor het testen van een breed scala van chemische stoffen, waaronder bestrijdingsmiddelen en industriële chemische stoffen. Hierbij zij evenwel opgemerkt dat bepaalde details en voorschriften voor geneesmiddelen kunnen verschillen (zie Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals van de Internationale Conferentie voor harmonisatie (ICH)).

2. Het meeste carcinogeniteitsonderzoek wordt uitgevoerd bij knaagdiersoorten en deze testmethode is daarom voornamelijk bedoeld voor onderzoek dat bij deze soorten wordt verricht. Als dergelijk onderzoek ook bij andere diersoorten dan knaagdieren moet worden uitgevoerd, kunnen de principes en procedures van deze testmethode, met de nodige aanpassingen, ook samen met die in hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen) (6), worden toegepast. Nadere aanwijzingen zijn te vinden in OESO-leidraad nr. 116 betreffende het opzetten en uitvoeren van onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (7).

3. De drie belangrijkste toedieningswegen bij carcinogeniteitsonderzoek zijn de orale, de dermale en de inhalatieweg. De keuze van de toedieningsweg is afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de voornaamste blootstellingsroute bij de mens. Nadere informatie over de keuze van de blootstellingsroute wordt verschaft in leidraad nr. 116 (7).

4. Deze testmethode spitst zich toe op blootstelling via de orale weg, de meest gebruikte route bij carcinogeniteitsonderzoek. Hoewel carcinogeniteitsonderzoek met blootstelling via de dermale of de inhalatieweg ook noodzakelijk kan zijn om de risico's voor de menselijke gezondheid te beoordelen en/of vereist kan zijn op grond van bepaalde regelgevingskaders, zijn beide blootstellingsroutes technisch bijzonder complex. Dergelijk onderzoek dient per geval te worden opgezet, hoewel de hier beschreven testmethode voor het beoordelen en evalueren van de carcinogeniteit bij orale toediening kan worden gebruikt als basis voor een protocol voor dermaal en inhalatieonderzoek, rekening houdend met aanbevelingen ten aanzien van de behandelingsperiode, klinische en pathologische parameters enz. Er zijn OESO-richtsnoeren beschikbaar voor de toediening van teststoffen via de dermale weg (7) en de inhalatieweg (7)(8). Bij het opzetten van langetermijnonderzoek naar blootstelling via de inhalatieweg moet met name aandacht worden geschonken aan hoofdstuk B.8 van deze bijlage (9) en hoofdstuk B.29 van deze bijlage (10), samen met de OESO-leidraad voor acuut inhalatieonderzoek (8). In geval van tests die via de dermale weg worden uitgevoerd, dient hoofdstuk B.9 van deze bijlage (11) te worden geraadpleegd.

▼M4

5. Carcinogeniteitsonderzoek levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde blootstelling gedurende een periode die kan oplopen tot de gehele levensduur van de gebruikte diersoort. Het onderzoek zal informatie opleveren over de toxische effecten van de teststof, met inbegrip van potentiële carcinogeniteit, en kan de doelorganen aanwijzen en de mogelijkheid van accumulatie aangeven. Daarnaast kan er een inschatting worden gemaakt van het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld bij toxische effecten en, in het geval van niet-genotoxische carcinogene agentia, bij tumorreacties. Aan de hand van deze inschatting kunnen vervolgens veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens worden vastgesteld. Bovendien wordt benadrukt dat het van groot belang is de dieren klinisch zorgvuldig te observeren, om zo veel mogelijk informatie te verkrijgen.

6. De doelstellingen van het onder deze testmethode vallende carcinogeniteitsonderzoek omvatten:

— het vaststellen van de carcinogene eigenschappen van een teststof die leiden tot een toegenomen incidentie van gezwellen, een toename van het aandeel kwaadaardige gezwellen of een vermindering van de tijd totdat gezwellen optreden, in vergelijking met parallelle controlegroepen;

— het vaststellen van de organen die door carcinogeniteit kunnen worden aangetast;

— het vaststellen van de tijd totdat gezwellen optreden;

— het karakteriseren van de dosis-responsverhouding van de tumor;

— het vaststellen van een niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (No-Observed Adverse Effect Level, NOAEL) of een uitgangspunt voor het bepalen van een benchmarkdosis (BMD);

— het extrapoleren van de carcinogene effecten naar lage doses waaraan mensen worden blootgesteld;

— het verschaffen van gegevens om hypothesen over de werkingswijze (2)(7)(12)(13)(14)(15) te toetsen.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

7. Bij het beoordelen en evalueren van de potentiële carcinogeniteit van een teststof moet het testlaboratorium, alvorens het onderzoek uit te voeren, alle beschikbare informatie over de teststof in aanmerking nemen, zodat de opzet van het onderzoek zodanig kan worden afgestemd dat doelmatiger wordt getest op potentiële carcinogeniteit en het gebruik van dieren wordt geminimaliseerd. Informatie over en aandacht voor de werkingswijze van een stof waarvan het vermoeden bestaat dat deze een carcinogene stof is (2)(7)(12)(13)(14)(15) is van groot belang, aangezien de optimale opzet van het onderzoek kan verschillen afhankelijk van het antwoord op de vraag of de teststof een stof is waarvan is gebleken of vermoed wordt dat deze een genotoxische carcinogene stof is. Raadpleeg leidraad nr. 116 (7) voor nadere aanwijzingen voor het beoordelen van de werkingswijze.

8. Informatie die behulpzaam kan zijn bij het opzetten van het onderzoek omvat de identiteit, de chemische structuur en de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de uitkomsten van eventuele in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests, met inbegrip van genotoxiciteitstests; voorgenomen toepassing(en) en de kans op blootstelling van de mens; beschikbare (Q)SAR-gegevens, gegevens over de mutageniteit/genotoxiciteit en carcinogeniteit alsmede andere toxicologische gegevens van chemische stoffen met een verwante structuur; beschikbare toxicokinetische gegevens (kinetiek bij zowel eenmalige als herhaalde toediening, indien beschikbaar) en aan ander

▼M4

onderzoek met herhaalde blootstelling ontleende gegevens. De carcinogeniteit moet worden beoordeeld nadat initiële informatie over de toxiciteit is verkregen door middel van toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening gedurende 28 dagen en/of 90 dagen. Ook kortdurend onderzoek naar de initiatie/promotie van kanker kan nuttige informatie opleveren. Als onderdeel van de algemene beoordeling van de potentiële schadelijke gezondheidseffecten van een bepaalde teststof (16)(17)(18)(19) moet een gefaseerde benadering van de carcinogeniteitstesten worden overwogen.

9. Voordat met het onderzoek wordt begonnen, moet worden bepaald welke statistische methoden gezien de opzet van de proeven en de doelstellingen het best geschikt zijn voor de analyse van de uitkomsten. Zo moet onder meer worden overwogen of de statistische gegevens tevens een correctie voor overleving, een analyse van de cumulatieve risico's op tumoren in verhouding tot de duur van overleving, een analyse van de tijd totdat tumoren optreden en een analyse in geval van voortijdige beëindiging van één of meer groepen moeten omvatten. Aanwijzingen voor de juiste statistische analysen en belangrijke verwijzingen naar internationaal erkende statistische methoden worden gegeven in leidraad nr. 116 (7) en leidraad nr. 35 over de analyse en evaluatie van onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (20).

10. Bij het uitvoeren van carcinogeniteitsonderzoek moeten altijd de richtsnoeren en overwegingen worden gevolgd die worden beschreven in het OESO-leidraad nr. 19 betreffende het herkennen, beoordelen en gebruiken van klinische symptomen als humane eindpunten voor proefdiergebruik bij veiligheidsbeoordelingen (21), en met name punt 62. In dat punt wordt verklaard dat wanneer een dier bij onderzoek met herhaalde toediening klinische symptomen met een voortschrijdend karakter vertoont die leiden tot een verdere verslechtering van de toestand van het dier, op basis van de beschikbare informatie moet worden overwogen of het dier op humane wijze moet worden gedood. Hierbij moet tevens worden overwogen hoe de waarde van de informatie die kan worden gewonnen door het dier in kwestie te handhaven in het onderzoek zich verhoudt tot de algehele conditie van het dier. Als wordt besloten het dier in het onderzoek te handhaven, moet de frequentie van de waarnemingen zo nodig worden verhoogd. Het kan ook zijn dat het mogelijk is de pijn of het ongerief te verlichten door de toediening van de dosis tijdelijk stop te zetten of de testdosis te verminderen, zonder dat dit het doel van het onderzoek nadelig beïnvloedt.

11. Nadere aanwijzingen en een bespreking van de principes voor de keuze van de dosis bij onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7) en twee publicaties van het International Life Sciences Institute (22)(23). Welke strategie voor dosiskeuze uiteindelijk wordt toegepast, is afhankelijk van de primaire doelstelling of doelstellingen van het onderzoek (punt 6). Bij het kiezen van de juiste dosisniveaus moet een evenwicht worden getroffen tussen enerzijds de gevarenscreening en anderzijds de karakterisering van de lagedosisrespons en de wisselwerking tussen de twee. Dit is met name relevant in situaties waarin gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (hoofdstuk B.33 van deze bijlage) moet worden uitgevoerd (punt 12).

12. Er moet worden nagegaan of gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (hoofdstuk B.33 van deze bijlage) kan worden uitgevoerd in plaats van afzonderlijke studies naar chronische toxiciteit (hoofdstuk B.30 van deze bijlage) en carcinogeniteit (deze testmethode B.32). De gecombineerde test kost minder tijd en geld dan twee afzonderlijke studies, zonder dat dit ten koste gaat van de gegevenskwaliteit van de onderzoeksfasen. Bij uitvoering van gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (hoofdstuk B.33 van deze bijlage) moet echter zorgvuldig rekening worden gehouden met de principes voor dosiskeuze (punt 11 en de punten 22 tot en met 25); bovendien kan de uitvoering van afzonderlijke studies verplicht zijn uit hoofde van bepaalde regelgevingskaders.

▼M4

13. De definities die in de context van deze testmethode worden gebruikt, zijn te vinden aan het eind van dit hoofdstuk en in leidraad nr. 116 (7).

PRINCIPE VAN DE TEST

14. De teststof wordt gedurende het grootste deel van de levensduur van de proefdieren dagelijks in trapsgewijs stijgende doses aan diverse groepen toegediend; gewoonlijk geschiedt dit oraal. Ook de inhalatie- of dermale weg kan geschikt zijn. De proefdieren worden zorgvuldig op tekenen van toxiciteit en zich ontwikkelend neoplastisch letsel onderzocht. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden gedood, wordt obductie verricht. Dieren die aan het eind van het onderzoek nog in leven zijn, worden gedood en ook hierop wordt obductie verricht.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

15. Deze testmethode heeft hoofdzakelijk betrekking op de beoordeling en evaluatie van carcinogeniteit bij knaagdieren (punt 2). Het gebruik van andere diersoorten dan knaagdieren kan worden overwogen als het op grond van de beschikbare gegevens aannemelijk is dat deze relevanter zijn voor het voorspellen van gezondheidseffecten bij de mens. De keuze van de soort moet worden verantwoord. De voorkeur wordt gegeven aan ratten, maar er kunnen ook andere knaagdiersoorten worden gebruikt, bv. muizen. Hoewel het gebruik van muizen bij carcinogeniteitstest van beperkt nut kan zijn (24)(25)(26), zijn carcinogeniteitstests bij muizen op grond van bepaalde vigerende regelgevingsprogramma's nog steeds vereist, tenzij wordt vastgesteld dat een dergelijk onderzoek vanuit wetenschappelijk oogpunt overbodig is. Aan het gebruik van ratten en muizen als experimentele modellen wordt de voorkeur gegeven vanwege hun betrekkelijk korte levensduur, het grootschalige gebruik ervan bij farmacologisch en toxicologisch onderzoek, hun gevoeligheid voor tumorinductie en de beschikbaarheid van voldoende gekarakteriseerde stammen. Vanwege deze kenmerken is een grote hoeveelheid informatie over hun fysiologie en pathologie beschikbaar. Nadere informatie over de keuze van de soort en de stam is te vinden in leidraad nr. 116 (7).

16. Er worden jonge gezonde volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. Het carcinogeniteitsonderzoek wordt bij voorkeur uitgevoerd bij dieren van dezelfde stam en herkomst als die welke zijn gebruikt voor het inleidende toxiciteitsonderzoek van kortere duur. Als echter bekend is dat het moeilijk is om met dieren van deze stam en herkomst te voldoen aan de algemeen aanvaarde overlevingscriteria voor langetermijnonderzoek (zie leidraad nr. 116 (7)), moet worden overwogen voor het langetermijnonderzoek een stam met een hoger overlevingspercentage te gebruiken. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn.

Huisvesting en voeding

17. De dieren kunnen individueel of in kleine groepjes van hetzelfde geslacht worden ondergebracht; individuele hokken moeten alleen worden overwogen als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is (27)(28)(29). De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve luchtvochtigheid ten minste 30 % moet bedragen en, behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte, bij voorkeur niet hoger mag zijn dan 70 %, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. Het voer moet aan alle voedingsbehoeften van de geteste soort voldoen en het gehalte aan onzuiverheden in het voer, met inbegrip van maar niet beperkt tot residuen van bestrijdingsmiddelen, persistente organische verontreinigende stoffen, fyto-oestrogenen, zware metalen en mycotoxinen, die van invloed kunnen zijn op de resultaten van de test, moet zo laag

▼M4

mogelijk zijn. Van tijd tot tijd moet er analytische informatie over het gehalte aan nutriënten en onzuiverheden in het voer worden samengesteld, ten minste aan het begin van het onderzoek en wanneer er veranderingen zijn in de gebruikte partij. Deze informatie moet in het eindverslag worden opgenomen. Ook over het bij het onderzoek gebruikte drinkwater moet analytische informatie worden verstrekt. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende vermenging van de teststof te zorgen en te voldoen aan de voedingsbehoeften van de dieren wanneer die teststof via het voer wordt toegediend.

Voorbereiding van de dieren

18. Er worden gezonde dieren gebruikt die gedurende ten minste zeven dagen aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. Bij knaagdieren moet de toediening van de dosis zo snel mogelijk na het spenen en de acclimatisatie beginnen en bij voorkeur voordat de dieren acht weken oud zijn. Van de proefdieren worden de volgende kenmerken vastgelegd: soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en leeftijd. Aan het begin van het onderzoek moeten de gewichtsverschillen binnen elk geslacht minimaal zijn en niet meer bedragen dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht van alle in het onderzoek gebruikte dieren van dat geslacht. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. Na de willekeurige indeling mogen er binnen de geslachten geen significante verschillen in lichaamsgewicht zijn tussen de groepen. Als er statistisch significante verschillen zijn, moet de willekeurige indeling zo mogelijk opnieuw worden uitgevoerd. Aan elk dier moet een uniek identificatienummer worden toegekend in de vorm van een permanent merkteken dat met behulp van een tatoeage, een onder de huid ingebrachte microchip of via een andere geschikte methode wordt aangebracht.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

19. Beide geslachten moeten worden gebruikt. Er moet een voldoende groot aantal dieren worden gebruikt om een grondige biologische en statistische evaluatie mogelijk te maken. Daarom moet elke dosisgroep en elke gelijktijdige controlegroep ten minste 50 dieren van elk geslacht omvatten. Afhankelijk van het doel van het onderzoek, kan het statistisch onderscheidingsvermogen van de belangrijkste schattingen mogelijk worden vergroot door de dieren ongelijk over de diverse dosisgroepen te verdelen, met meer dan 50 dieren in de lagedosisgroepen, bv. om potentiële carcinogeniteit bij lage doses te schatten. Er moet echter worden onderkend dat een geringe verhoging van de groepsgrootte relatief weinig zal bijdragen tot het statistisch onderscheidingsvermogen van het onderzoek. Nadere informatie over de statistische opzet van het onderzoek en de keuze van de dosisniveaus voor een zo groot mogelijk statistisch onderscheidingsvermogen is te vinden in leidraad nr. 116 (7).

Dieren tussentijds doden en satellietgroepen (verklikkergroepen)

20. Als onderdeel van het onderzoek kunnen sommige dieren tussentijds worden gedood, bv. na twaalf maanden, om informatie te verschaffen over de ontwikkeling van neoplastische veranderingen en mechanistische informatie, indien dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Als dergelijke informatie al beschikbaar is uit eerder toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening van de teststof, is het tussentijds doden van dieren mogelijk niet wetenschappelijk gerechtvaardigd. Als de onderzoeksopzet voorziet in het tussentijds doden van dieren, bedraagt het geplande aantal tussentijds te doden dieren in elke dosisgroep gewoonlijk 10 per geslacht en moet het totale aantal dieren in de onderzoeksopzet worden vermeerderd met het aantal dieren dat voor afronding van het onderzoek zal worden gedood. Tijdens het onderzoek kan zo nodig een aanvullende groep verklikkerdieren (doorgaans 5 dieren per geslacht) worden opgenomen met het oog op de monitoring van de ziektestatus (30). Nadere richtsnoeren zijn opgenomen in leidraad nr. 116 (7).

▼M4

Dosisgroepen en dosering

21. Aanwijzingen voor alle aspecten van de dosiskeuze en het interval tussen de dosisniveaus zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7). Er worden ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controlegroep gebruikt. De dosisniveaus worden doorgaans gebaseerd op de resultaten van korter onderzoek met herhaalde toediening of van bereikbepalingonderzoek, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante stoffen beschikbaar zijn.

22. Tenzij dit vanwege de fysisch-chemische aard of biologische kenmerken van de teststof onmogelijk is, moet de hoogste dosis zodanig worden gekozen dat de voornaamste doelorganen en toxische effecten worden vastgesteld zonder dat dit leed, ernstige toxiciteit, ziekten of sterfte veroorzaakt. Het hoogste dosisniveau moet normaliter, rekening houdend met de in punt 23 beschreven factoren, zodanig worden gekozen dat er tekenen van toxiciteit optreden, die bijvoorbeeld blijken uit een lichte achteruitgang van de gewichtstoename (ca. 10 %). Afhankelijk van het doel van het onderzoek (zie punt 6), kan echter een hoogste dosis worden gekozen die lager is dan de dosis waarbij tekenen van toxiciteit optreden, bv. als een dosis een zorgwekkend schadelijk effect heeft dat niettemin weinig invloed heeft op de levensduur of het lichaamsgewicht.

23. De dosisniveaus en het interval tussen de dosisniveaus kunnen zo worden gekozen dat een dosisrespons en, afhankelijk van de werkingswijze van de teststof, een NOAEL of ander beoogd resultaat van het onderzoek, bv. een BMD (zie punt 25), bij het laagste dosisniveau worden vastgesteld. Factoren die moeten worden meegewogen bij de toediening van lagere doses omvatten de verwachte helling van de dosis-responscurve, de doses waarbij belangrijke veranderingen in het metabolisme of de toxische werking kunnen optreden, de verwachte locatie van een drempelwaarde of de verwachte locatie van een uitgangspunt voor extrapolatie naar lage doses.

24. Het gekozen interval tussen de dosisniveaus hangt van de kenmerken van de teststof af en kan niet in deze testmethode worden voorgeschreven, maar doorgaans leveren twee- tot viervoudige intervallen goede testresultaten op voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van ongeveer 6 à 10) tussen twee doseringen. In het algemeen moet het gebruik van factoren boven de 10 worden vermeden en worden verantwoord als deze toch worden gebruikt.

25. Zoals nader wordt besproken in leidraad nr. 116 (7), moet bij de keuze van de dosis rekening worden gehouden met het volgende:

— bekende of vermoedelijke niet-lineariteiten of buigpunten in de dosisrespons;

— toxicokinetiek en dosisbereiken waarbij metabolische inductie, verzadiging of niet-lineariteit tussen externe en interne doses al dan niet optreden;

— precursorletsels en merkstoffen die het effect of indicatoren die de werking van de voornaamste fundamentele biologische processen aangeven;

— de voornaamste (of vermoedelijke) aspecten van de werkingswijze, zoals doses waarbij de cytotoxiciteit begint toe te nemen, hormoonniveaus verstoord raken, homeostatische mechanismen het onderspit delven enz.;

▼M4

— gebieden van de dosis-responscurve die een bijzonder robuuste schatting behoeven, bv. op het gebied van de verwachte BMD of een vermoedelijke drempelwaarde;

— de verwachte blootstellingsniveaus bij de mens.

26. De controlegroep wordt niet of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, met medium behandeld. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Als er een medium wordt gebruikt, wordt aan de controlegroep de hoogste gebruikte mediumdosis van de dosisgroepen toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en deze een geringere voedingsopname veroorzaakt omdat de voeding daardoor minder appetijtelijk is, kan een aanvullende paargevoede controlegroep dienen als een meer geschikte controle.

Bereiding en toediening van doses van de teststof

27. De teststof wordt normaliter oraal, met de voeding of het drinkwater, of via een maagsonde toegediend. Nadere informatie over de toedieningswegen en -methoden is te vinden in leidraad nr. 116 (7). De toedieningsweg en de toedieningsmethode zijn afhankelijk van het doel van het onderzoek, de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, de biologische beschikbaarheid ervan en de voornaamste blootstellingsroute en -methode bij de mens. De keuze van de toedieningsweg en de toedieningsmethode moet worden gemotiveerd. In het belang van het welzijn van de dieren moet de orale maagsonde normaliter alleen worden gekozen in geval van agentia waarvoor deze toedieningsweg- en methode redelijk overeenkomen met de mogelijke blootstelling van de mens (bv. bij geneesmiddelen). Bij in de voeding of het milieu voorkomende chemische stoffen zoals bestrijdingsmiddelen wordt de teststof doorgaans toegediend via de voeding of het drinkwater. In sommige scenario's, bv. bij beroepsmatige blootstelling, kan toediening via andere wegen geschikter zijn.

28. Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspendeerd. Er moet rekening worden gehouden met de volgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is: effecten op de absorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken ervan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren. Aanbevolen wordt eerst na te gaan of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/emulsie in olie (bv. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxische kenmerken daarvan bekend zijn. Er moet informatie beschikbaar zijn over de stabiliteit van de teststof en de homogeniteit van de doseeroplossingen of het voer (naargelang hetgeen van toepassing is) onder de toedieningsomstandigheden (bv. dieet).

29. Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Bij langetermijnonderzoek naar toxiciteit waarbij de teststof via het voer wordt toegediend, mag de concentratie van de teststof in de voeding de bovengrens van 5 % van de totale hoeveelheid voer normaliter niet overschrijden om onevenwichtigheden in de voeding te vermijden. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (mg/kg voer of ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier (mg/kg lichaamsgewicht), berekend op weekbasis, worden gebruikt. Aangegeven moet worden welk alternatief is gebruikt.

▼M4

30. Bij orale toediening wordt de teststof dagelijks (zeven dagen per week) aan de dieren toegediend, bij knaagdieren normaliter gedurende 24 maanden (zie ook punt 32). Elk ander doseringsregime, bv. vijf dagen per week, moet worden gemotiveerd. Bij toediening via de huid worden de dieren gedurende 24 maanden normaliter ten minste 6 uur per dag, zeven dagen per week met de teststof behandeld, zoals beschreven is in hoofdstuk B.9 van deze bijlage (11). Blootstelling via inhalatie geschiedt 6 uur per dag, zeven dagen per week, maar ook blootstelling gedurende vijf dagen is mogelijk, indien dit wordt verantwoord. De blootstellingsduur bedraagt normaliter 24 maanden. Als andere knaagdiersoorten dan ratten uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan de maximale blootstellingsduur worden aangepast om soortspecifieke symptomen van leed te minimaliseren. Een blootstellingsduur van minder dan 6 uur per dag moet worden gemotiveerd. Zie ook hoofdstuk B.8 van deze bijlage (9).

31. Indien de teststof via een maagsonde aan de dieren wordt toegediend, moet dit iedere dag op hetzelfde tijdstip gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. Normaliter zal eenmaal per dag één dosis worden toegediend; als een stof lokale irritaties veroorzaakt, kan de dagelijkse doseersnelheid mogelijk worden gehandhaafd door de toe te dienen dosis te splitsen (tweemaal per dag). Het maximale vloeistofvolume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume moet zo laag mogelijk worden gehouden als praktisch uitvoerbaar is en mag bij knaagdieren normaliter niet meer dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht bedragen (31). Variaties in het testvolume moeten tot een minimum worden beperkt door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus hetzelfde constante volume kan worden gebruikt. Een uitzondering vormen mogelijk bijtende of irriterende stoffen, die moeten worden verdund om ernstige lokale effecten te vermijden. Tests bij concentraties die waarschijnlijk een bijtende of irriterende werking hebben op het maag-darmkanaal, moeten worden vermeden.

Duur van het onderzoek

32. De duur van het onderzoek bedraagt normaliter 24 maanden bij knaagdieren, hetgeen overeenkomt met het grootste deel van de normale levensduur van de gebruikte dieren. Afhankelijk van de levensduur van de bij het onderzoek gebruikte stam van de diersoort kan een langere of kortere onderzoeksduur worden gehanteerd, maar deze moet wel worden verantwoord. Voor bepaalde muizenstammen, bv. AKR/J, C3H/J of C57BL/6J, kan een duur van 18 maanden geschikter zijn. Hier volgen enkele aanwijzingen met betrekking tot de duur, de beëindiging van het onderzoek en de overleving; nadere aanwijzingen, onder meer over de aanvaardbaarheid van negatieve carcinogeniteit ten opzichte van de overleving in het onderzoek, zijn te vinden in OESO-leidraad nr. 116 betreffende het opzetten en uitvoeren van onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (7):

— beëindiging van het onderzoek moet worden overwogen wanneer het aantal overlevenden in de groepen met lagere doses of de controlegroep onder de 25 % daalt;

— als alleen dieren in de groep met de hoogste dosis voortijdig sterven als gevolg van toxiciteit, hoeft dit niet tot beëindiging van het onderzoek te leiden;

— de overleving moet voor elk geslacht afzonderlijk worden beschouwd;

— het onderzoek mag niet dusdanig worden verlengd dat gegevens die uit het onderzoek zijn verkregen niet meer voldoende zijn voor een statistisch geldige evaluatie.

▼M4

WAARNEMINGEN

33. Alle dieren moeten worden onderzocht op tekenen van ziekte of sterfte, gewoonlijk aan het begin en eind van elke dag, ook tijdens de weekends en op feestdagen. Daarnaast moeten de dieren eenmaal per dag worden onderzocht op specifieke tekenen van toxicologische relevantie, waarbij in het geval van toediening via een maagsonde rekening moet worden gehouden met de piekperiode van de verwachte effecten na toediening. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan zich ontwikkelende tumoren; van elke met het blote oog zichtbare of voelbare tumor moeten het tijdstip waarop deze voor het eerst is opgetreden, de plaats, de afmetingen, het uiterlijk en het verloop worden opgetekend.

Lichaamsgewicht. voedsel-/waterverbruik en voedselefficiëntie

34. Bij het begin van de behandeling moeten alle dieren de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gewogen en daarna ten minste één keer per maand. Ook het voedselverbruik en de voedselefficiëntie moeten de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand. Als de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet het waterverbruik de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand. Meting van het waterverbruik moet ook worden overwogen bij onderzoek waarbij de drinkactiviteit verandert.

Hematologische, klinisch-biochemische en andere metingen

35. Om te zorgen dat het onderzoek zo veel mogelijk informatie oplevert, met name voor het beoordelen van de werkingswijze, kunnen bloedmonsters worden genomen voor hematologie en klinisch-biochemische bepalingen indien de onderzoeksleider dit noodzakelijk acht. Ook urineonderzoek kan passend zijn. Nadere aanwijzingen over de waarde van dergelijke monsters in het kader van carcinogeniteitsonderzoek zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7). Zo nodig kunnen bij de dieren die tussentijds worden gedood (punt 20), alsook bij beëindiging van het onderzoek op ten minste 10 dieren per geslacht per groep, bloedmonsters met het oog op hematologische en klinisch-chemische analyse worden genomen en urineonderzoek worden verricht. Genoteerd wordt uit welk lichaamsdeel de bloedmonsters worden genomen, bijvoorbeeld door middel van een hartpunctie of uit de retro-orbitale sinus, onder verdoving; deze worden in voorkomend geval onder passende omstandigheden bewaard. Er kunnen ook bloedpreparaten worden voorbereid voor onderzoek, met name als het beenmerg lijkt te zijn aangetast, hoewel er wordt getwijfeld aan de waarde die een dergelijk onderzoek heeft voor het beoordelen van het carcinogeen/oncogeen potentieel (32).

PATHOLOGIE

Macroscopische obductie

36. Bij alle dieren in het onderzoek, behalve verklikkerdieren (zie punt 20) en andere dieren in satellietgroepen, moet een volledige macroscopische obductie worden verricht, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het lichaamsoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud ervan. De onderzoeksleider moet van geval tot geval beoordelen of obductie van verklikkerdieren en andere dieren in de satellietgroepen noodzakelijk is. Het gewicht van de organen maakt normaal gesproken geen deel uit van een carcinogeniteitsonderzoek, aangezien geriatrische veranderingen en, in latere stadia, zich ontwikkelende tumoren de bruikbaarheid van gegevens over de orgaangewichten verstoren. Deze gegevens kunnen echter van groot belang zijn voor het bepalen van de bewijskracht en in het bijzonder voor het beoordelen van de werkingswijze. Gegevens over het orgaangewicht van dieren die deel uitmaken van een satellietonderzoek dienen uiterlijk één jaar nadat het onderzoek is aangevat te worden verzameld.

▼**M4**

37. De volgende weefsels moeten in een fixeermiddel worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek (33) geschikt is (de weefsels tussen rechte haken zijn facultatief):

elk macroscopisch waarneembaar letsel	hart	alvleesklier	maag (voormaag, kliermaag)
bijnier	ileum	bijschildklier	[tanden]
aorta	jejunum	perifere zenuw	testis
hersenen (inclusief coupes van cerebrum, cerebellum en medulla/pons)	nier	hypofyse	thymus
blindedarm	traanklier (extraorbitaal)	prostaat	schildklier
cervix	lever	rectum	[tong]
coagulans afscheidende klier	long	speekselklier	luchtpijp
colon	lymfeklieren (zowel oppervlakkig als dieper gelegen)	zaadblaasje	urineblaas
duodenum	borstklier (verplicht bij vrouwtjes en facultatief bij mannetjes, indien zichtbaar ontleedbaar)	skeletspier	uterus (inclusief cervix)
epididymis	[bovenste luchtwegen, inclusief neus, neusschelpen en paranasale sinussen]	huid	[ureter]
oog (inclusief netvlies)	slokdarm	ruggenmerg (drie niveaus: cervicaal, mediothoracaal en lumbaal)	[urinebuis]
[dijbeen met gewricht]	[reukkolf]	milt	vagina
galblaas (bij andere diersoorten dan ratten)	ovarium	[borstbeen]	coupe van het beenmerg en/of vers beenmergaspiraat
klier van Harder			

Organen die paarsgewijs voorkomen, bv. nieren en bijnieren, moeten beide worden bewaard. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard. Bij onderzoek waarbij de dermale toedieningsweg wordt gebruikt, moeten de organen worden onderzocht die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld en moeten specifieke monsters van de huid op de toedieningslocatie worden genomen en bewaard. Bij inhalatieonderzoek moet de lijst van luchtwegweefsels die moeten worden bewaard en onderzocht, worden gebaseerd op de aanbevelingen in de hoofdstukken B.8 en B.29 van deze bijlage. In geval van andere organen/weefsels (en in aanvulling op de specifiek bewaarde weefsels van de luchtwegen) moeten de organen worden onderzocht die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld.

▼M4

Histopathologie

38. Er zijn richtsnoeren beschikbaar voor beste praktijken voor de uitvoering van toxicologisch pathologisch onderzoek (33). Ten minste de volgende weefsel moeten worden onderzocht:

— alle weefsels van de dieren in de hogedosisgroep en de controlegroep;

— alle weefsels van dieren die tijdens het onderzoek stierven of werden gedood;

— alle weefsels die macroscopische abnormaliteiten vertonen, met inbegrip van tumoren;

— bij waarneming van met de behandeling samenhangende histopathologische veranderingen bij dieren in de hogedosisgroep, dezelfde weefsels van alle dieren in alle andere dosisgroepen;

— alle organen die paarsgewijs voorkomen, bv. nieren en bijnieren, moeten beide worden onderzocht.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

39. Voor elk dier worden apart gegevens verstrekt over alle geëvalueerde parameters. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of om redenen van dierenwelzijn moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen, met inbegrip van de aanvang, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren met letsel, de aard van het letsel en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. De gemiddelden en standaarddeviaties (voor continue testgegevens) van de dieren waarbij toxische effecten of letsels voorkomen, worden in tabelvorm samengevat, in aanvulling op de inschaling van de letsels.

40. Bij de interpretatie van de onderzoeksresultaten kunnen controlegegevens uit het verleden nuttig zijn, bv. wanneer er aanwijzingen zijn dat de gegevens van de parallelle controlegroepen aanzienlijk afwijken van de recente gegevens van de controledieren in dezelfde testfaciliteit/kolonie. Controlegegevens uit het verleden die ter evaluatie worden aangeboden, moeten afkomstig zijn uit hetzelfde laboratorium, verband houden met dieren van dezelfde leeftijd en stam, en zijn gegenereerd gedurende de vijf jaar die zijn voorafgegaan aan het onderzoek in kwestie.

41. Voor zover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het opzetten van het onderzoek worden gekozen (zie punt 9). Bij de selectie moet zo nodig worden gecorrigeerd voor overleving.

Testverslag

42. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en fysisch-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens;

▼M4

— herkomst van de stof;

— partijnummer;

— certificaat van chemische analyse.

Medium (indien van toepassing):

— motivering voor de keuze van het medium (wanneer dat geen water is);

Proefdieren:

— gebruikte diersoort/stam en motivering van de keuze;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren bij aanvang van de test;

— herkomst, huisvesting, voeding enz.;

— gewicht van elk dier aan het begin van de test.

Testomstandigheden:

— motivering voor de gekozen toedieningsweg en de keuze van de dosis;

— toegepaste statistische methoden voor analyse van de gegevens, indien van toepassing;

— bijzonderheden over de formulering van de teststof, respectievelijk de samenstelling van het voer;

— analytische gegevens over de bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

— de toedieningsweg en bijzonderheden over de toediening van de teststof;

— bij inhalatieonderzoek, alleen via de neus of via het hele lichaam;

— werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (mg/kg of ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voor zover van toepassing;

— gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater.

Resultaten (er moeten samengevatte gegevens in tabelvorm en gegevens voor elk dier apart worden verstrekt)

Algemeen:

— overlevingsgegevens;

— lichaamsgewicht en veranderingen in het lichaamsgewicht;

— voedselverbruik, voedselefficiëntie, indien berekend, en waterverbruik, indien van toepassing;

— toxicokinetische gegevens (indien beschikbaar);

— oftalmoscopie (indien beschikbaar);

— hematologie (indien beschikbaar);

— klinische chemie (indien beschikbaar).

▼M4

Klinische bevindingen:

— tekenen van toxiciteit;

— incidentie (en indien beoordeeld, ernst) van eventuele abnormaliteiten;

— aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (van voorbijgaande aard dan wel blijvend).

Obductiegegevens:

— lichaamsgewicht aan het eind van het onderzoek;

— orgaangewichten en verhoudingen ervan, indien van toepassing;

— obductiebevindingen; incidentie en ernst van abnormaliteiten.

Histopathologie:

— niet-neoplastische histopathologische bevindingen;

— neoplastische histopathologische bevindingen;

— correlatie van macroscopische en microscopische bevindingen;

— gedetailleerde beschrijving van alle met de behandeling samenhangende histopathologische bevindingen, met inbegrip van een inschaling van de ernst;

— een verslag van eventuele intercollegiale toetsing van objectglaasjes.

Statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing

Bespreking van de resultaten, waaronder:

— bespreking van eventuele modelleringsbenaderingen;

— dosis-responsverhoudingen;

— controlegegevens uit het verleden;

— beoordeling van eventuele informatie over de werkingswijze;

— bepaling van BMD, NOAEL of LOAEL;

— relevantie voor de mens.

Conclusies

LITERATUUR:

(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) Hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Subchronische orale toxiciteitstest: toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen).

(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 nr. 116, beschikbaar op de openbare website voor onderzoeksrichtlijnen van de OESO op 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) Hoofdstuk B.8 van deze bijlage, Subacute inhalatietoxiciteit: onderzoek van 28 dagen.

(10) Hoofdstuk B.29 van deze bijlage, Subchronische inhalatietoxiciteit: onderzoek van 90 dagen.

(11) Hoofdstuk B.9 van deze bijlage, Toxiciteit (dermaal) bij herhaalde toediening (28 dagen).

(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. pp 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) Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, 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**

Aanhangsel 1

DEFINITIE

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M4

B.33. GECOMBINEERD ONDERZOEK NAAR CHRONISCHE TOXICITEIT EN CARCINOGENITEIT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 453 (2009) van de OESO (TG 453). De oorspronkelijke TG 453 werd in 1981 vastgesteld. De actualisering van testmethode B.33 werd noodzakelijk geacht in het licht van recente ontwikkelingen op het gebied van dierenwelzijn en wettelijke voorschriften (1)(2)(3)(4)(5). De actualisering van deze testmethode B.33 is gelijktijdig uitgevoerd met de herziening van hoofdstuk B.32 van deze bijlage, Carcinogeniteitsonderzoek, en hoofdstuk B.30 van deze bijlage, Onderzoek naar chronische toxiciteit, en had tot doel aanvullende informatie te verkrijgen met behulp van de bij het onderzoek gebruikte dieren en nadere bijzonderheden over de keuze van de dosis te verschaffen. Deze testmethode is bedoeld voor gebruik bij het testen van een breed scala van stoffen, waaronder bestrijdingsmiddelen en industriële chemische stoffen. Hierbij zij evenwel opgemerkt dat bepaalde details en voorschriften voor geneesmiddelen kunnen verschillen (zie Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals van de Internationale Conferentie voor harmonisatie (ICH)).

2. Het meeste onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit wordt uitgevoerd bij knaagdiersoorten en deze testmethode is daarom voornamelijk bedoeld voor onderzoek dat bij deze soorten wordt verricht. Als dergelijk onderzoek ook bij andere diersoorten dan knaagdieren moet worden uitgevoerd, kunnen de beschreven principes en procedures, met de nodige aanpassingen, ook samen met die in hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen) (6), worden toegepast, zoals bedoeld in OESO-leidraad nr. 116 over het opzetten en uitvoeren van onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (7).

3. De drie belangrijkste toedieningswegen bij onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit zijn de orale, de dermale en de inhalatieweg. De keuze van de toedieningsweg is afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof en de voornaamste blootstellingsroute bij de mens. Nadere informatie over de keuze van de blootstellingsroute wordt verschaft in leidraad nr. 116 (7).

4. Deze testmethode spitst zich toe op blootstelling via de orale weg, de meest gebruikte route bij onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit. Hoewel langetermijnonderzoek met blootstelling via de dermale of de inhalatieweg ook noodzakelijk kan zijn om de risico's voor de menselijke gezondheid te beoordelen, en/of vereist kan zijn op grond van bepaalde regelgevingskaders, zijn beide blootstellingsroutes technisch bijzonder complex. Dergelijk onderzoek dient per geval te worden opgezet, hoewel de hier beschreven testmethode voor het beoordelen en evalueren van chronische toxiciteit en carcinogeniteit bij orale toediening kan worden gebruikt als basis voor een protocol voor dermaal en inhalatieonderzoek, rekening houdend met aanbevelingen ten aanzien van de behandelingsperiode, klinische en pathologische parameters enz. Er zijn OESO-richtsnoeren beschikbaar voor de toediening van teststoffen via de inhalatieweg (7)(8) en de dermale weg (7). Bij het opzetten van langetermijnonderzoek naar blootstelling via de inhalatieweg moet met name aandacht worden geschonken aan hoofdstuk B.8 van deze bijlage (9) en hoofdstuk B.29 van deze bijlage (10), samen met de OESO-leidraad voor acuut inhalatieonderzoek (8). In geval van tests die via de dermale weg worden uitgevoerd, dient hoofdstuk B.9 van deze bijlage (11) te worden geraadpleegd.

▼M4

5. Gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit levert informatie op over de mogelijke gevaren voor de gezondheid die kunnen voortvloeien uit herhaalde blootstelling gedurende een periode die kan oplopen tot de gehele levensduur van de gebruikte diersoort. Het onderzoek zal informatie opleveren over de toxische effecten van de teststof, met inbegrip van potentiële carcinogeniteit, de doelorganen aanwijzen en de mogelijkheid van accumulatie aangeven. Daarnaast kan er een inschatting worden gemaakt van het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld bij toxische effecten en, in het geval van niet-genotoxische carcinogene agentia, bij tumorreacties. Aan de hand van deze inschatting kunnen vervolgens veiligheidscriteria voor de blootstelling van de mens worden vastgesteld. Bovendien wordt benadrukt dat het van groot belang is de dieren klinisch zorgvuldig te observeren, om zo veel mogelijk informatie te verkrijgen.

6. De doelstellingen van het onder deze testmethode vallende onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit omvatten:

— het vaststellen van de carcinogene eigenschappen van een teststof die leiden tot een toengenomen incidentie van gezwellen, een toename van het aandeel kwaadaardige gezwellen of een vermindering van de tijd totdat gezwellen optreden, in vergelijking met parallelle controlegroepen;

— het vaststellen van de tijd todat gezwellen optreden;

— het vaststellen van de chronische toxiciteit van de teststof;

— het vaststellen van de organen die kunnen worden aangetast door chronische toxiciteit en carcinogeniteit;

— het karakteriseren van de dosis-responsverhouding;

— het vaststellen van een niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (No-Observed Adverse Effect Level, NOAEL) of een uitgangspunt voor het bepalen van een benchmarkdosis (BMD);

— het extrapoleren van de carcinogene effecten naar lage doses waaraan mensen worden blootgesteld;

— het voorspellen van chronische toxische effecten bij niveaus waaraan mensen worden blootgesteld;

— het verschaffen van gegevens om hypothesen over de werkingswijze (2)(7)(12)(13)(14)(15) te toetsen.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

7. Bij het beoordelen en evalueren van de potentiële carcinogeniteit en chronische toxiciteit van een teststof moet het testlaboratorium, alvorens het onderzoek uit te voeren, alle beschikbare informatie over de teststof in aanmerking nemen, zodat de opzet van het onderzoek zodanig kan worden afgestemd dat doelmatiger wordt getest op de toxicologische eigenschappen en het gebruik van dieren wordt geminimaliseerd. Informatie over en aandacht voor de werkingswijze van een stof waarvan het vermoeden bestaat dat deze een carcinogene stof is (2)(7)(12)(13)(14)(15), is van groot belang, aangezien de optimale opzet van het onderzoek kan verschillen afhankelijk van het antwoord op de vraag of de teststof een stof is waarvan is gebleken of vermoed wordt dat deze een genotoxische carcinogene stof is. Raadpleeg leidraad nr. 116 (7) voor nadere aanwijzingen voor het beoordelen van de werkingswijze.

8. Bij het opzetten van het onderzoek kan onder meer gebruik worden gemaakt van informatie over de identiteit, chemische structuur en fysischchemische eigenschappen van de teststof; de resultaten van eventuele in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests, met inbegrip van genotoxiciteitstests; de voorgenomen toepassing(en) en de potentiële blootstelling van de mens; de beschikbare (Q)SAR-gegevens, gegevens over de mutageniteit/genotoxiciteit en carcinogeniteit, en andere toxicologische gegevens over chemische stoffen met een verwante structuur; de beschikbare toxicokinetische gegevens (kinetiek bij zowel eenmalige toediening als herhaalde toediening, indien beschikbaar), en aan ander onderzoek met herhaalde blootstelling

▼M4

ontleende gegevens. De chronische toxiciteit/carcinogeniteit mag pas worden bepaald nadat eerst toxiciteitsgegevens zijn verkregen van toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening gedurende 28 dagen en/of 90 dagen. Ook kortdurend onderzoek naar de initiatie/promotie van kanker kan nuttige informatie opleveren. Als onderdeel van de algemene beoordeling van de potentiële schadelijke gezondheidseffecten van een bepaalde teststof (16)(17)(18)(19) moet een gefaseerde benadering van de carcinogeniteitstests worden overwogen.

9. Voordat met het onderzoek wordt begonnen, moet worden bepaald welke statistische methoden gezien de opzet van de proeven en de doelstellingen het best geschikt zijn voor de analyse van de uitkomsten. Zo moet onder meer worden overwogen of de statistische gegevens tevens een correctie voor overleving, een analyse van de cumulatieve risico's op tumoren in verhouding tot de duur van overleving, een analyse van de tijd totdat tumoren optreden en een analyse in geval van voortijdige beëindiging van één of meer groepen moeten omvatten. Aanwijzingen voor de juiste statistische analysen en belangrijke verwijzingen naar internationaal erkende statistische methoden worden gegeven in leidraad nr. 116 (7) en leidraad nr. 35 over de analyse en evaluatie van onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit (20).

10. Bij het uitvoeren van carcinogeniteitsonderzoek moeten altijd de richtsnoeren en overwegingen worden gevolgd die worden beschreven in de OESO-leidraad voor het herkennen, beoordelen en gebruiken van klinische symptomen als humane eindpunten voor proefdiergebruik bij veiligheidsbeoordelingen (21), en met name punt 62 ervan. In dat punt wordt verklaard dat wanneer een dier bij onderzoek met herhaalde toediening klinische symptomen met een voortschrijdend karakter vertoont die leiden tot een verdere verslechtering van de toestand van het dier, op basis van de beschikbare informatie moet worden overwogen of het dier op humane wijze moet worden gedood. Hierbij moet tevens worden overwogen hoe de waarde van de informatie die kan worden gewonnen door het dier in kwestie te handhaven in het onderzoek zich verhoudt tot de algehele conditie van het dier. Als wordt besloten het dier in het onderzoek te handhaven, moet de frequentie van de waarnemingen zo nodig worden verhoogd. Het kan ook zijn dat het mogelijk is de pijn of het leed te verlichten door de toediening van de dosis tijdelijk stop te zetten of de testdosis te verminderen, zonder dat dit het doel van het onderzoek nadelig beïnvloedt.

11. Nadere aanwijzingen en een bespreking van de principes voor de keuze van de dosis bij onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7) en twee publicaties van het International Life Sciences Institute (22)(23). Welke strategie voor dosiskeuze uiteindelijk wordt toegepast, is afhankelijk van de primaire doelstelling of doelstellingen van het onderzoek (punt 6). Bij het kiezen van de juiste dosisniveaus moet een evenwicht worden getroffen tussen enerzijds de risicoscreening en anderzijds de karakterisering van de lage-dosisrespons en de wisselwerking tussen de twee. Dit is met name relevant voor dit gecombineerde onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit.

12. Er moet worden nagegaan of dit gecombineerde onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit moet worden uitgevoerd in plaats van afzonderlijk onderzoek naar chronische toxiciteit (hoofdstuk B.30 van deze bijlage), respectievelijk naar carcinogeniteit (hoofdstuk B.32 van deze bijlage). Het gecombineerde onderzoek biedt als voordeel dat het minder tijd en kosten vergt en dat er minder gebruik wordt gemaakt van proefdieren dan bij twee afzonderlijke studies, zonder dat dit ten koste gaat van de gegevenskwaliteit van de onderzoeksfasen. Bij het uitvoeren van een gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit moet echter zorgvuldig rekening worden gehouden met de principes voor dosiskeuze (punt 11 en de punten 22 tot en met 26); bovendien kan de uitvoering van afzonderlijke studies verplicht zijn uit hoofde van bepaalde regelgevingskaders. Nadere aanwijzingen voor het opzetten van een zo efficiënt mogelijk gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit, zowel wat betreft het aantal gebruikte proefdieren als het stroomlijnen van de diverse experimentele procedures, zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7).

▼M4

13. De definities die in de context van deze testmethode worden gebruikt, zijn te vinden aan het einde van dit hoofdstuk en in leidraad nr. 116 (7).

PRINCIPE VAN HET ONDERZOEK

14. Het onderzoek is opgebouwd uit twee fasen die tegelijkertijd lopen: de ene fase heeft betrekking op de chronische toxiciteit en de andere op de carcinogeniteit (zie de punten 34 en 35 voor de duur van de fasen). De teststof wordt normaal gezien toegediend via de orale weg, hoewel ook de inhalatie- of de dermale weg geschikt kan zijn. Tijdens de chronische-toxiciteitsfase wordt de teststof dagelijks in trapsgewijs stijgende doses aan diverse groepen proefdieren toegediend. Daarbij wordt één dosis per groep gebruikt, normaal gezien twaalf maanden achter elkaar, hoewel afhankelijk van de wettelijke voorschriften een kortere of langere duur kan worden gekozen (zie punt 34). De gekozen duur moet voldoende lang zijn zodat de eventuele effecten van cumulatieve toxiciteit tot uiting komen, zonder de storende effecten van geriatrische veranderingen. Het onderzoek kan ook zo worden opgezet dat sommige dieren tussentijds worden gedood, bv. na drie en zes maanden, en dat met het oog hierop nieuwe groepen proefdieren kunnen worden toegevoegd (zie punt 20). In de carcinogeniteitsfase wordt de teststof dagelijks aan diverse groepen proefdieren toegediend, gedurende een groot deel van hun levensduur. Tijdens beide fasen worden de proefdieren zorgvuldig op tekenen van toxiciteit en zich ontwikkelend neoplastisch letsel onderzocht. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven of worden gedood, wordt obductie verricht. Dieren die aan het eind van het onderzoek nog in leven zijn, worden gedood en ook hierop wordt obductie verricht.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

15. Deze testmethode heeft hoofdzakelijk betrekking op de beoordeling en evaluatie van chronische toxiciteit en carcinogeniteit bij knaagdieren (punt 2). Het gebruik van andere diersoorten dan knaagdieren kan worden overwogen als het op grond van de beschikbare gegevens aannemelijk is dat deze relevanter zijn voor het voorspellen van gezondheidseffecten bij de mens. De keuze van de soort moet worden verantwoord. De voorkeur wordt gegeven aan ratten, maar er kunnen ook andere knaagdiersoorten worden gebruikt, bv. muizen. Hoewel het gebruik van muizen bij carcinogeniteitstest van beperkt nut kan zijn (24)(25)(26), is testen op carcinogeniteit op grond van bepaalde vigerende regelgevingsprogramma's nog steeds vereist, tenzij wordt vastgesteld dat een dergelijk onderzoek vanuit wetenschappelijk oogpunt overbodig is. Aan het gebruik van ratten en muizen als experimentele modellen wordt de voorkeur gegeven vanwege hun betrekkelijk korte levensduur, het grootschalige gebruik ervan bij farmacologisch en toxicologisch onderzoek, hun gevoeligheid voor tumorinductie en de beschikbaarheid van voldoende gekarakteriseerde stammen. Vanwege deze kenmerken is een grote hoeveelheid informatie over hun fysiologie en pathologie beschikbaar. Bij het opzetten en uitvoeren van onderzoek naar chronische toxiciteit of carcinogeniteit bij andere diersoorten dan knaagdieren moeten, zo nodig, de in deze testmethode beschreven principes als uitgangspunt worden genomen, in combinatie met de principes in hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen) (6). Nadere informatie over de keuze van de soort en de stam is te vinden in leidraad nr. 116 (7).

16. Er worden jonge gezonde volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. Het gecombineerde onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit moet worden uitgevoerd bij dieren van dezelfde stam en herkomst als die welke zijn gebruikt voor het inleidend toxiciteitsonderzoek van kortere duur. Als echter bekend is dat het moeilijk is om met dieren van deze stam en herkomst te voldoen aan de algemeen aanvaarde overlevingscriteria voor langetermijnonderzoek (zie leidraad nr. 116 (7)), moet worden overwogen een stam met een aanvaardbaar overlevingspercentage voor het langetermijnonderzoek te gebruiken. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn.

▼M4

Huisvesting en voeding

17. De dieren kunnen elk apart of in kleine groepjes met hetzelfde geslacht worden ondergebracht; aparte hokken moeten alleen worden overwogen als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is (27)(28)(29). De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve luchtvochtigheid ten minste 30 % moet bedragen en, behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte, bij voorkeur niet hoger mag zijn dan 70 %, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. Het voer moet aan alle behoeften van de geteste soort voldoen en het gehalte aan onzuiverheden in het voer, met inbegrip van maar niet beperkt tot residuen van bestrijdingsmiddelen, persistente organische verontreinigende stoffen, fyto-oestrogenen, zware metalen en mycotoxinen, die van invloed kunnen zijn op de resultaten van het onderzoek, moet zo laag mogelijk zijn. Van tijd tot tijd moet er analytische informatie over het gehalte aan nutriënten en onzuiverheden in het voer worden samengesteld, ten minste aan het begin van het onderzoek en wanneer er veranderingen zijn in de gebruikte partij. Deze informatie moet in het eindverslag worden opgenomen. Ook over het bij het onderzoek gebruikte drinkwater moet analytische informatie worden verstrekt. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende vermenging van de teststof te zorgen en te voldoen aan de voedingsbehoeften van de dieren wanneer die teststof via het voer wordt toegediend.

Voorbereiding van de dieren

18. Er worden gezonde dieren gebruikt die gedurende ten minste zeven dagen aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. Bij knaagdieren moet de toediening van de dosis zo snel mogelijk na het spenen en de acclimatisatie beginnen en bij voorkeur voordat de dieren acht weken oud zijn. De kenmerken van de proefdieren qua soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en leeftijd worden vastgelegd. Aan het begin van het onderzoek moeten de gewichtsverschillen tussen de geslachten minimaal zijn en niet meer bedragen dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht van elk geslacht. De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. Na de willekeurige indeling mogen er binnen de geslachten geen significante verschillen in lichaamsgewicht zijn tussen de groepen. Als er statistisch significante verschillen zijn, moet de willekeurige indeling zo mogelijk opnieuw worden uitgevoerd. Aan elk dier moet een uniek identificatienummer worden toegekend in de vorm van een permanent merkteken dat met behulp van een tatoeage, een onder de huid ingebrachte microchip of via een andere geschikte methode wordt aangebracht.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

19. Beide geslachten moeten worden gebruikt. Er moet een voldoende groot aantal dieren worden gebruikt zodat een grondige biologische en statistische evaluatie mogelijk is. Bij knaagdieren moeten alle dosisgroepen (zoals beschreven in punt 22) en parallelle controlegroepen die in de carcinogeniteitsfase worden gebruikt daarom ten minste 50 dieren van elk geslacht omvatten. Afhankelijk van het doel van het onderzoek kan het statistisch onderscheidingsvermogen van de belangrijkste schattingen mogelijk worden vergroot door de dieren ongelijk over de diverse dosisgroepen te verdelen, met meer dan 50 dieren in de lage-dosisgroepen, bv. om potentiële carcinogeniteit bij lage doses te schatten. Er moet echter worden onderkend dat een gematigde verhoging van de groepsgrootte relatief weinig zal bijdragen tot het statistisch onderscheidingsvermogen van het onderzoek. Bij knaagdieren moeten alle dosisgroepen (zoals beschreven in punt 22) en parallelle controlegroepen die in de chronische-toxiciteitsfase worden gebruikt, ten

▼M4

minste 10 dieren per geslacht omvatten. Hierbij zij opgemerkt dat dit aantal lager is dan bij het onderzoek naar chronische toxiciteit (hoofdstuk B.30 van deze bijlage). Bij de interpretatie van de gegevens over het kleinere aantal dieren per groep in de chronische-toxiciteitsfase van dit gecombineerde onderzoek kan echter ook gebruik worden gemaakt van de gegevens over de grotere groep dieren in de carcinogeniteitsfase van het onderzoek. Bij onderzoek waarbij muizen zijn betrokken, is het mogelijk dat in de chronische-toxiciteitsfase per dosisgroep meer dieren nodig zijn om alle vereiste hematologische bepalingen uit te voeren. Nadere informatie over de statistische opzet van het onderzoek en de keuze van de dosisniveaus voor een zo groot mogelijk statistisch onderscheidingsvermogen is te vinden in leidraad nr. 116 (7).

Dieren tussentijds doden, satellietgroepen en verklikkerdieren

20. Als onderdeel van het onderzoek kunnen sommige dieren tussentijds worden gedood, bv. na zes maanden voor de chronische-toxiciteitsfase, om informatie te verschaffen over de ontwikkeling van niet-neoplastische veranderingen en mechanistische informatie, indien dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Als dergelijke informatie al beschikbaar is uit eerder toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening van de teststof, is het tussentijds doden van dieren mogelijk niet wetenschappelijk gerechtvaardigd. Het tussentijds doden van de dieren die worden gebruikt in de chronische-toxiciteitsfase van het onderzoek, die normaal twaalf maanden duurt (zie punt 34), levert gegevens voor de carcinogeniciteitsfase van het onderzoek, waardoor het totale aantal gebruikte dieren kan worden verminderd. Ook satellietgroepen kunnen in de chronische-toxiciteitsfase van het onderzoek worden opgenomen om de reversibiliteit van eventuele toxicologische effecten als gevolg van de onderzochte teststof te controleren. Hiervoor kan het hoogste dosisniveau van het onderzoek met controlegroep worden gebruikt. Tijdens het onderzoek kan zo nodig een aanvullende groep verklikkerdieren (doorgaans 5 dieren per geslacht) worden opgenomen met het oog op de monitoring van de ziektestatus (30). Nadere aanwijzingen voor het opzetten van het onderzoek in verband met het tussentijds doden van dieren, satellietgroepen en verklikkerdieren, alsmede het minimaliseren van het aantal gebruikte dieren is te vinden in leidraad nr. 116 (7).

21. Als de onderzoeksopzet het gebruik van satellietgroepen en/of het tussentijds doden van dieren omvat, bevat elke opgenomen dosisgroep gewoonlijk 10 dieren per geslacht en moet het totaal aantal dieren in de onderzoeksopzet wordt vermeerderd met het aantal dieren dat tussentijds zal worden gedood. Dieren die tussentijds worden gedood en dieren die deel uitmaken van satellietgroepen moeten normaal gezien aan dezelfde waarnemingen worden onderworpen, met inbegrip van waarnemingen met betrekking tot het lichaamsgewicht, het voedsel- en waterverbruik, hematologische en klinisch-biochemische metingen en pathologisch onderzoek, als de dieren in de chronische-toxiciteitsfase van het hoofdonderzoek, hoewel de metingen (in de groepen met dieren die tussentijds worden gedood) ook kunnen worden beperkt tot specifieke, belangrijke parameters als neurotoxiciteit of immunotoxiciteit.

Dosisgroepen en dosering

22. Aanwijzingen voor alle aspecten van de dosiskeuze en het interval tussen de dosisniveaus zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7). Er moeten ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controle worden gebruikt, voor zowel de chronische-toxiciteitsfase als de carcinogeniteitsfase. De dosisniveaus worden doorgaans gebaseerd op de resultaten van korter onderzoek met herhaalde toediening of van bereikbepalingonderzoek, en er moet rekening worden gehouden met bestaande toxicologische en toxicokinetische gegevens die voor de teststof of aanverwante stoffen beschikbaar zijn.

▼M4

23. Voor de chronische-toxiciteitsfase van het onderzoek is een volledig onderzoek met drie dosisniveaus mogelijk niet noodzakelijk, als kan worden verwacht dat een test met een bepaald dosisniveau, dat gelijkwaardig is aan ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, geen schadelijke effecten zal hebben. Hierbij moet men zich baseren op informatie die afkomstig is van inleidend onderzoek en de overweging dat toxiciteit niet is te verwachten op grond van gegevens betreffende stoffen met een verwante structuur. Een limiet van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag kan van toepassing zijn, tenzij het blootstellingsniveau bij de mens duidt op de noodzaak een hoger dosisniveau te gebruiken.

24. Tenzij dit vanwege de fysisch-chemische aard of biologische kenmerken van de teststof onmogelijk is, moet de hoogste dosis zodanig worden gekozen dat de voornaamste doelorganen en toxische effecten worden vastgesteld zonder dat dit leed, ernstige toxiciteit, ziekteverschijnselen of sterfte veroorzaakt. Het hoogste dosisniveau moet zodanig worden gekozen dat er tekenen van toxiciteit optreden, die bijvoorbeeld blijken uit een lichte achteruitgang van de gewichtstoename (ca. 10 %). Afhankelijk van het doel van het onderzoek (zie punt 6), kan een hoogste dosis worden gekozen die lager is dan de dosis waarbij tekenen van toxiciteit optreden, bv. als een dosis een zorgwekkend schadelijk effect heeft dat niettemin weinig invloed heeft op de levensduur of het lichaamsgewicht.

25. De dosisniveaus en het interval tussen de dosisniveaus kunnen zo worden gekozen dat een dosisrespons en, afhankelijk van de werkingswijze van de teststof, een NOAEL of ander beoogd resultaat van het onderzoek, bv. een BMD (zie punt 27), worden vastgesteld. Factoren die moeten worden meegewogen bij de toediening van lagere doses omvatten de verwachte helling van de dosis-responscurve, de doses waarbij belangrijke veranderingen in het metabolisme of de toxische werking kunnen optreden, de verwachte locatie van een drempelwaarde of de verwachte locatie van een uitgangspunt voor extrapolatie naar lage doses. Bij het uitvoeren van een gecombineerd onderzoek naar chronische toxiciteit en carcinogeniteit bestaat het hoofddoel eruit informatie te verkrijgen met het oog op het beoordelen van het carcinogeniteitsrisico, en zal informatie over de chronische toxiciteit normaal gezien een secundair doel zijn. Hierbij dient rekening te worden gehouden bij de keuze van de doses en het interval tussen de dosisniveaus voor het onderzoek.

26. Het gekozen interval tussen de dosisniveaus is afhankelijk van de onderzoeksdoelen en de kenmerken van de teststof en kan in deze testmethode niet gedetailleerd worden voorgeschreven, maar doorgaans leveren twee- tot viervoudige intervallen goede testrestultaten op bij gebruik voor de instelling van de afnemende dosisniveaus, en de toevoeging van een vierde testgroep is vaak te verkiezen boven het gebruik van zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor van ongeveer 6 à 10) tussen twee doseringen. In het algemeen moet het gebruik van factoren boven de 10 worden vermeden en worden verantwoord als deze toch worden gebruikt.

27. Zoals nader wordt beschreven in leidraad nr. 116 (7), moet bij de keuze van de dosis rekening worden gehouden met het volgende:

— bekende of vermoedelijke niet-lineariteiten of buigpunten in de dosisrespons;

— toxicokinetiek en dosisbereiken waarbij metabolische inductie, verzadiging of niet-lineariteit tussen externe en interne doses al dan niet optreden;

— precursorletsels en merkstoffen die het effect of indicatoren die de werking van de voornaamste fundamentele biologische processen aangeven;

▼M4

— de voornaamste (of vermoedelijke) aspecten van de werkingswijze, zoals doses waarbij de cytotoxiciteit begint toe te nemen, hormoonniveaus verstoord raken, homeostatische mechanismen het onderspit delven enz.;

— gebieden van de dosis-responscurve die een bijzonder robuuste schatting behoeven, bv. op het gebied van de verwachte BMD of een vermoedelijke drempelwaarde;

— de verwachte blootstellingniveaus bij de mens, met name met betrekking tot de keuze van middelhoge en lage doses.

28. De controlegroep wordt niet of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, met medium behandeld. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze worden behandeld als die in de testgroep. Als er een medium wordt gebruikt, wordt aan de controlegroep de hoogste gebruikte mediumdosis van de dosisgroepen toegediend. Indien een teststof wordt toegediend via de voeding en deze een geringere voedingsopname veroorzaakt omdat de voeding daardoor minder appetijtelijk is, kan een paargevoede controlegroep dienen als een meer geschikte controle.

Bereiding en toediening van doses van de teststof

29. De teststof wordt normaal gezien oraal, met de voeding of het drinkwater, of via een maagsonde toegediend. Nadere informatie over de toedieningswegen en -methoden is te vinden in leidraad nr. 116 (7). De toedieningsweg en de toedieningsmethode zijn afhankelijk van het doel van het onderzoek, de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, de biologische beschikbaarheid ervan en de voornaamste blootstellingsroute en -methode bij de mens. De keuze van de toedieningsweg en de toedieningsmethode moet worden gemotiveerd. In het belang van het welzijn van de dieren moet de orale maagsonde normaal gesproken alleen worden gekozen in geval van agentia waarvoor de gekozen toedieningsweg en -methode redelijk overeenkomen met de mogelijke blootstelling van de mens (bv. bij geneesmiddelen). Bij in de voeding of het milieu voorkomende chemische stoffen zoals bestrijdingsmiddelen wordt de teststof doorgaans toegediend via de voeding of het drinkwater. In sommige scenario's, bv. bij beroepsmatige blootstelling, kan toediening via andere wegen beter geschikt zijn.

30. Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspendeerd. Er moet rekening worden gehouden met de navolgende eigenschappen van het medium en andere additieven, naargelang hetgeen van toepassing is: effecten op de absorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken daarvan kunnen veranderen; en effecten op het voedsel- of waterverbruik of de voedingsstatus van de dieren. Aanbevolen wordt eerst te bezien of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/emulsie in olie (bv. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel oplossing in een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxische kenmerken daarvan bekend zijn. Er moet informatie beschikbaar zijn over de stabiliteit van de teststof en de homogeniteit van de doseeroplossingen of het voer (naargelang hetgeen van toepassing is) onder de toedieningsomstandigheden (bv. dieet).

31. Wanneer stoffen met de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Bij langetermijnonderzoek naar toxiciteit waarbij de teststof via het voer wordt toegediend, mag de concentratie van de teststof in de voeding de bovengrens van 5 % van de totale hoeveelheid voer normaal gesproken niet overschrijden om onevenwichtigheden in de voeding te vermijden. Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (mg/kg voer of ppm) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier (mg/kg lichaamsgewicht), berekend op weekbasis, worden gebruikt. Aangegeven moet worden welk alternatief is gebruikt.

▼M4

32. Bij orale toediening wordt de teststof dagelijks (zeven dagen per week) aan de dieren toegediend gedurende 12 maanden (chronische-toxiciteitsfase) of 24 maanden (carcinogeniteitsfase). Zie in dat verband ook de punten 33 en 34. Gebruik van een ander toedieningsschema, bv. vijf dagen per week, moet worden verantwoord. Bij toediening via de huid worden de dieren normaal gesproken ten minste 6 uur per dag, zeven dagen per week met de teststof behandeld, zoals wordt beschreven in hoofdstuk B.9 van deze bijlage (11), gedurende 12 maanden (chronische-toxiciteitsfase) of 24 maanden (carcinogeniteitsfase). Blootstelling via inhalatie geschiedt 6 uur per dag, zeven dagen per week, maar ook blootstelling gedurende vijf dagen is mogelijk, indien dit wordt verantwoord. De blootstellingsduur bedraagt normaal gezien 12 maanden (chronische-toxiciteitsfase) of 24 maanden (carcinogeniteitsfase). Als andere knaagdiersoorten dan ratten uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan de maximale blootstellingsduur worden aangepast om soortspecifieke symptomen van leed te minimaliseren. Gebruik van een blootstellingsduur van minder dan 6 uur per dag moet worden gemotiveerd. Zie ook hoofdstuk B.8 van deze bijlage (9).

33. Indien de teststof via een maagsonde aan de dieren wordt toegediend, moet dit iedere dag op hetzelfde tijdstip gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. Normaliter zal eenmaal per dag één dosis worden toegediend; als een stof lokale irritaties veroorzaakt, kan de dagelijkse doseersnelheid mogelijk worden gehandhaafd door de toe te dienen dosis te splitsen (tweemaal per dag). Het maximale volume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. Het volume moet zo laag mogelijk worden gehouden als praktisch uitvoerbaar is en mag bij knaagdieren normaal gezien niet meer dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht bedragen (31). Variaties in het testvolume moeten geminimaliseerd worden door het aanpassen van de concentratie zodat op alle dosisniveaus hetzelfde constante volume kan worden gebruikt. Een uitzondering vormen mogelijk bijtende of irriterende stoffen, die moeten worden verdund om ernstige lokale effecten te vermijden. Tests bij concentraties die waarschijnlijk een bijtende of irriterende werking hebben op het maag-darmkanaal, moeten worden vermeden.

Duur van het onderzoek

34. De toedieningsperiode en de duur van de chronische-toxiciteitsfase van dit onderzoek bedraagt normaal gezien 12 maanden, hoewel gegeven de onderzoeksopzet ook een kortere (bv. 6 of 9 maanden) of langere (bv. 18 of 24 maanden) onderzoeksduur mogelijk is, afhankelijk van de eisen van de regelgeving of met het oog op specifieke mechanistische doeleinden. Afwijkingen van een blootstellingsduur van twaalf maanden moeten worden verantwoord, met name als voor een kortere duur wordt gekozen. Alle dosisgroepen die in deze fase worden gebruikt, moeten op de aangegeven tijd worden beëindigd met het oog op de evaluatie van chronische toxiciteit en niet-neoplastische pathologie. Satellietgroepen die zijn opgenomen ter controle van de reversibiliteit van eventuele toxicologische veranderingen als gevolg van de onderzochte teststof moet dosering worden onthouden gedurende niet minder dan vier weken en niet meer dan een derde van de totale onderzoeksduur nadat de blootstelling is gestaakt.

35. De duur van de carcinogeniteitsfase van dit onderzoek bedraagt normaal gezien 24 maanden bij knaagdieren, hetgeen overeenkomt met het grootste deel van de normale levensduur van de gebruikte dieren. Afhankelijk van de levensduur van de bij het onderzoek gebruikte stam van de diersoort kan een langere of kortere onderzoeksduur worden gehanteerd, maar deze moet wel worden verantwoord. Voor bepaalde muizenstammen, bv. AKR/J, C3H/J of C57BL/6J, kan een duur van 18 maanden beter geschikt zijn. Hier volgen enkele aanwijzingen met betrekking tot de duur, de beëindiging van het onderzoek en de overleving; nadere aanwijzingen, onder meer over het verband tussen de aanvaardbaarheid van negatief carcinogeniteitsonderzoek en de overleving tijdens het onderzoek, zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7):

▼M4

— beëindiging van het onderzoek moet worden overwogen wanneer het aantal overlevenden in de groepen met lagere doses of de controlegroep onder de 25 % daalt;

— als alleen dieren in de groep met de hoogste dosis voortijdig sterven als gevolg van toxiciteit, hoeft dit niet tot beëindiging van het onderzoek te leiden;

— als blijkt dat de geslachten qua overleving verschillen, moeten de geslachten afzonderlijk worden beschouwd;

— het onderzoek mag niet dusdanig worden verlengd dat gegevens die uit het onderzoek zijn verkregen niet meer voldoende zijn voor een statistisch geldige evaluatie.

WAARNEMINGEN (CHRONISCHE-TOXICITEITSFASE)

36. Alle dieren moeten worden onderzocht op ziekelijkheid of sterfte, gewoonlijk aan het begin en einde van elke dag, ook tijdens de weekends en de feestdagen. De proefdieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd, bij voorkeur op hetzelfde tijdstip, waarbij rekening moet worden gehouden met de piekperiode van verwachte effecten na toediening van de dosis via een maagsonde.

37. Alle dieren moeten ten minste eenmaal voor de eerste blootstelling aan een uitgebreid klinisch onderzoek worden onderworpen (om intra-individuele vergelijking mogelijk te maken), aan het einde van de eerste week van het onderzoek en vervolgens elke maand. Het waarnemingsprotocol moet zodanig worden opgezet dat verschillen tussen individuele waarnemers worden geminimaliseerd en onafhankelijk zijn van de testgroep. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd, bij voorkeur telkens in een standaardgebied en op hetzelfde tijdstip. De gegevens moeten zorgvuldig worden opgetekend, bij voorkeur met behulp van scoringssystemen die door het testlaboratorium expliciet zijn gedefinieerd. Er moet worden getracht verschillen in de observatiecondities tot een minimum te beperken. Tekenen waarop moet worden gelet zijn onder meer (maar niet alleen): veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding, en onwillekeurige reacties zoals traanvorming, rechtopstaan van het haar, verandering van de pupilgrootte of een ongewoon ademhalingspatroon. Ook verandering in gang, houding en reactiviteit op vastpakken, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotiep gedrag (bv. overmatige lichaamsverzorging, herhaaldelijk ronddraaien) of bizar gedrag (bv. zelfverminking, achteruitlopen) moeten worden opgetekend (32).

38. Vóór de eerste toediening van de teststof wordt bij alle dieren een oftalmologisch onderzoek uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een oftalmoscoop of een ander geschikt apparaat. Bij beëindiging van het onderzoek wordt dit oftalmologisch onderzoek bij alle dieren verricht, maar ten minste bij die in de hogedosisgroep en in de controlegroep. Als met de behandeling samenhangende veranderingen in de ogen worden geconstateerd, moeten alle dieren worden onderzocht. Als de structurele analyse of andere informatie wijst op oculaire toxiciteit, moet de frequentie van het oogonderzoek worden verhoogd.

39. Voordat met het onderzoek wordt begonnen en met tussenpozen van drie maanden tot ten hoogste twaalf maanden na aanvang van het onderzoek, alsmede bij beëindiging van het onderzoek (als dit langer duurt dan twaalf maanden) kunnen, in geval van chemische stoffen waarvoor uit eerdere toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening gedurende 28 dagen en/of 90 dagen is gebleken dat deze kunnen leiden tot neurotoxische effecten, facultatief onderzoeken van de sensorische reacties op verschillende soorten stimuli (32) (bv. van auditieve, visuele en proprioceptieve aard) (33)(34)(35), alsmede een bepaling van de grijpkracht (36) en de motorische activiteit (37) worden verricht. Meer informatie over de procedures die kunnen worden gevolgd, is te vinden in de desbetreffende literatuur. Er kunnen evenwel ook andere dan de genoemde procedures worden toegepast.

▼M4

40. In geval van chemische stoffen waarvoor uit eerder toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening gedurende 28 dagen en/of 90 dagen is gebleken dat deze kunnen leiden tot immunotoxische effecten, kan facultatief nader onderzoek van dit eindpunt worden verricht bij beëindiging van het onderzoek.

Lichaamsgewicht. voedsel-/waterverbruik en voedselefficiëntie

41. Aan het begin van het onderzoek moeten alle dieren de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gewogen en daarna ten minste één keer per maand. Ook het voedselverbruik en de voedselefficiëntie moeten de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand. Het waterverbruik moet de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand als de teststof met het drinkwater wordt toegediend. Het meten van het waterverbruik moet ook worden overwogen bij onderzoek waarbij de drinkactiviteit verandert.

Hematologie en klinisch-biochemische bepalingen

42. Bij onderzoek waarbij knaagdieren zijn betrokken, wordt na drie, zes en twaalf maanden, alsook bij beëindiging van het onderzoek (als dit langer duurt dan twaalf maanden) hematologisch onderzoek verricht op alle proefdieren (tien mannetjes en tien vrouwtjes per groep). Bij muizen moeten mogelijk dieren in satellietgroepen worden gebruikt om alle vereiste hematologische bepalingen te verrichten (zie punt 19). Bij onderzoek met andere soorten dan knaagdieren worden monsters genomen bij een kleiner aantal dieren (bv. 4 dieren per geslacht en per groep bij onderzoek bij honden), op tussentijdse bemonsteringstijdstippen en bij beëindiging van het onderzoek, zoals beschreven voor knaagdieren. Er hoeven bij knaagdieren of andere soorten dan knaagdieren na drie maanden geen metingen te worden verricht als er geen effect is opgetreden op de hematologische parameters in een eerder onderzoek van 90 dagen met vergelijkbare dosisniveaus. Er moeten bloedmonsters worden genomen en daarbij dient te worden genoteerd uit welk lichaamsdeel en hoe de monsters zijn genomen, bijvoorbeeld door middel van een hartpunctie of uit de retro-orbitale sinus, onder verdoving.

43. De volgende parameters worden onderzocht (38): totale en gedifferentieerde telling van de leukocyten, telling van de erytrocyten, telling van de bloedplaatjes, hemoglobinegehalte, hematocriet, gemiddeld volume van de erytrocyten (Mean Corpuscular Volume, MCV), hemoglobinegehalte per erytrocyt (Mean Corpuscular Haemoglobin, MCH), hemoglobinegehalte per volume-eenheid erytrocyten (Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration, MCHC), prothrombinetijd en geactiveerde partiële thromboplastinetijd. Afhankelijk van de toxiciteit van de teststof kunnen ook andere hematologische parameters worden gemeten, zoals de Heinz-lichaampjes of andere morfologische afwijkingen van de erytrocyten of methemoglobine. In het algemeen moet een flexibele aanpak worden gehanteerd, afhankelijk van het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde teststof. Als de teststof een effect heeft op het hematopoëtisch systeem, moeten mogelijk ook reticulocytentellingen en beenmergcytologie worden getest, hoewel deze niet routinematig hoeven te worden onderzocht.

44. Klinisch-biochemische bepalingen die bedoeld zijn om wezenlijke toxische effecten in weefsels en met name effecten op de nieren en lever te onderzoeken, moeten worden verricht op bloedmonsters die van elk dier worden genomen (tien mannetjes en tien vrouwtjes per groep), met dezelfde intervallen als wordt aangegeven voor hematologisch onderzoek. Bij muizen moeten mogelijk dieren in satellietgroepen worden gebruikt om alle vereiste klinisch-biochemische bepalingen te verrichten. Bij onderzoek met andere soorten dan knaagdieren worden monsters genomen bij een kleiner aantal dieren (bv. 4 dieren per geslacht en per groep bij onderzoek bij honden), op tussentijdse bemonsteringstijdstippen en bij beëindiging van het onderzoek, zoals beschreven voor knaagdieren. Er hoeven na drie maanden geen metingen te worden verricht, noch bij knaagdieren noch bij andere diersoorten, als er in een eerder onderzoek van 90 dagen bij vergelijkbare dosisniveaus

▼M4

geen effect op klinisch-biochemische parameters is geconstateerd. Het verdient aanbeveling om de dieren (met uitzondering van muizen) vóór de bloedafname een nacht te laten vasten ([1]). De volgende parameters worden onderzocht (38): glucose, ureum (ureumstikstof), creatinine, totaal eiwit, albumine, calcium, natrium, kalium, totaal cholesterol, ten minste twee tests voor een hepatocellulaire evaluatie (alanineaminotransferase, aspartaataminotransferase, glutamaatdehydrogenase, totaal galzuren) (39), en ten minste twee tests voor hepatobiliaire evaluatie (alkalische fosfatase, gamma-glutamyltransferase, 5'-nucleotidase, totaal bilirubine, totaal galzuren) (39). Naargelang hetgeen van toepassing is, kunnen andere klinisch-chemische parameters als triglyceriden bij nuchtere toestand, specifieke hormonen en cholinesterase worden gemeten, afhankelijk van de toxiciteit van de teststof. In het algemeen is een flexibele aanpak nodig, afhankelijk van het waargenomen en/of verwachte effect van een bepaalde stof.

45. Bij alle proefdieren (tien mannetjes en 10 vrouwtjes per groep) moet de urine worden geanalyseerd, waarbij op dezelfde regelmatige tijdstippen urinemonsters moeten worden genomen als bij de hematologische en klinisch-chemische monsters. Metingen na drie maanden hoeven niet te worden verricht als bij het urineonderzoek in een eerder onderzoek van 90 dagen bij vergelijkbare dosisniveaus geen effect is geconstateerd. De volgende lijst van parameters is afkomstig uit een deskundige aanbeveling inzake klinisch-pathologisch onderzoek (38): uitzien, volume, osmolaliteit of soortelijk gewicht, pH, totaal eiwit, en glucose. Andere bepalingen omvatten keton, urobilinogeen, bilirubine en occult bloed. Indien nodig kunnen hieraan nog andere parameters worden toegevoegd om het onderzoek van het(de) waargenomen effect(en) verder uit te breiden.

46. Er wordt in het algemeen van uitgegaan dat in geval van onderzoek bij honden basisgegevens voor hematologische en klinisch-biochemische variabelen dienen te worden bepaald vóór aanvang van de behandeling, maar dat dit voor onderzoek bij knaagdieren niet nodig is (38). Als de basisgegevens uit het verleden (zie punt 58) ontoereikend zijn, moet worden overwogen om dergelijke gegevens alsnog te genereren.

PATHOLOGIE

Macroscopische obductie

47. Bij alle dieren in het onderzoek moet normaal gesproken een volledige macroscopische obductie worden uitgevoerd, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. Het is echter mogelijk dat (bij de groepen met dieren die tussentijds moeten worden gedood of in de satellietgroepen) de metingen moeten worden beperkt tot specifieke, belangrijke parameters als neurotoxiciteit of immunotoxiciteit (zie punt 21). Bij deze dieren hoeft geen obductie te worden uitgevoerd en kunnen ook de in de volgende punten beschreven vervolgprocedures achterwege blijven. De onderzoeksleider bepaalt van geval tot geval of obductie op de verklikkerdieren noodzakelijk is.

([1]) Voor een aantal metingen van serum en plasma, met name voor glucose, verdient het aanbeveling om de dieren een nacht te laten vasten. De voornaamste reden is dat de toegenomen variabiliteit die onvermijdelijk het gevolg is van niet-vasten, subtiele effecten maskeert en de interpretatie bemoeilijkt. Daarbij moet echter worden opgemerkt dat een nacht vasten van invloed kan zijn op het algemene metabolisme van de dieren en dat dit in het bijzonder bij voedingsonderzoek de dagelijkse blootstelling aan de teststof kan verstoren. Alle beoordeelde dieren moeten in dezelfde fysiologische toestand verkeren en daarom moeten gedetailleerde of neurologische beoordelingen bij voorkeur worden gepland op een andere dag dan die waarop klinische biochemische monsters worden genomen.

▼**M4**

48. Voor alle dieren, behalve die welke op grond van het tweede deel van punt 47 worden uitgesloten, moeten de orgaangewichten worden bepaald. De bijnieren, de hersenen, de epididymides, het hart, de nieren, de lever, de ovaria, de milt, de testes, de schildklier (gewogen na fixatie, inclusief bijschildklieren) en de uterus van alle dieren (afgezien van stervende en/of tussentijds gedode dieren) moeten worden ontdaan van aanhechtend weefsel, naargelang hetgeen van toepassing is, en moeten zo spoedig mogelijk na de sectie nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen.

49. De volgende weefsels moeten in een fixeermiddel worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek (40) het meest geschikt is (de weefsels tussen rechte haken zijn facultatief):

elk macroscopisch waarneembaar letsel	hart	alvleesklier	maag (voormaag, kliermaag)
bijnier	ileum	bijschildklier	[tanden]
aorta	jejunum	perifere zenuw	testis
hersenen (inclusief coupes van cerebrum, cerebellum en medulla/pons)	nier	hypofyse	thymus
blindedarm	traanklier (extraorbitaal)	prostaat	schildklier
cervix	lever	rectum	[tong]
coagulans afscheidende klier	long	speekselklier	luchtpijp
colon	lymfeklieren (zowel oppervlakkig als dieper gelegen)	zaadblaasje	urineblaas
duodenum	borstklier (verplicht bij vrouwtjes en facultatief bij mannetjes, indien zichtbaar ontleedbaar)	skeletspier	uterus (inclusief cervix)
epididymis	[bovenste luchtwegen, inclusief neus, neusschelpen en paranasale sinussen]	huid	[ureter]
oog (inclusief netvlies)	slokdarm	ruggenmerg (drie niveaus: cervicaal, mediothoracaal en lumbaal)	[urinebuis]
[dijbeen met gewricht]	[reukkolf]	milt	vagina
galblaas (bij andere diersoorten dan ratten)	ovarium	[borstbeen]	coupe van het beenmerg en/of vers beenmergaspiraat
klier van Harder			

▼M4

Organen die paarsgewijs voorkomen, bv. nieren en bijnieren, moeten beide worden bewaard. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze kunnen worden aangetast, moeten worden bewaard. Bij onderzoek waarbij de dermale toedieningsweg wordt gebruikt, moeten de organen worden onderzocht die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld en moeten specifieke monsters van de huid op de toedieningslocatie worden genomen en bewaard. Bij inhalatieonderzoek moet de lijst van luchtwegweefsels die moeten worden bewaard en onderzocht, worden gebaseerd op de aanbevelingen in hoofdstuk B.8 van deze bijlage (9) en hoofdstuk B.29 van deze bijlage (10). In geval van andere organen/weefsels (en in aanvulling op de specifiek bewaarde weefsels van de luchtwegen) moeten de organen worden onderzocht die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld.

Histopathologie

50. Er zijn aanwijzingen beschikbaar voor beste praktijken voor de uitvoering van toxicologisch pathologisch onderzoek (40). Ten minste het volgende histopathologische onderzoek dient te worden verricht:

— alle weefsels van de dieren in de hogedosisgroep en de controlegroep;

— alle weefsels van dieren die tijdens het onderzoek stierven of werden gedood;

— alle weefsels die macroscopische abnormaliteiten vertonen;

— doelweefsels of weefsels die met de behandeling samenhangende veranderingen vertonen in de hogedosisgroep en van alle dieren in alle andere dosisgroepen;

— organen die paarsgewijs voorkomen, bv. nieren en bijnieren, moeten beide worden onderzocht.

WAARNEMINGEN (CARCINOGENITEITSFASE)

51. Alle dieren moeten worden onderzocht op tekenen van ziekelijkheid of sterfte, gewoonlijk aan het begin en einde van elke dag, ook tijdens de weekends en op feestdagen. Daarnaast moeten de dieren eenmaal per dag worden onderzocht op specifieke tekenen van toxicologische relevantie. Bij maagsondeonderzoek moeten de dieren worden onderzocht in de periode die onmiddellijk volgt op de toediening van de dosis. Bijzondere aandacht moet worden besteed aan zich ontwikkelende tumoren; van elke met het blote oog zichtbare of voelbare tumor moeten het tijdstip waarop deze voor het eerst is opgetreden, de plaats, de afmetingen, het uiterlijk en het verloop worden opgetekend.

52. Aan het begin van het onderzoek moeten alle dieren de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gewogen en daarna ten minste één keer per maand. Ook het voedselverbruik en de voedselefficiëntie moeten de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand. Het waterverbruik moet de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gemeten en daarna ten minste één keer per maand als de teststof met het drinkwater wordt toegediend. Het meten van het waterverbruik moet ook worden overwogen bij onderzoek waarbij de drinkactiviteit verandert.

▼M4

Hematologische, klinisch-biochemische en andere metingen

53. Om de hoeveelheid uit het onderzoek verkregen informatie te maximaliseren, met name voor het beoordelen van de werkingswijze, kunnen bloedmonsters worden genomen voor hematologie en klinisch-biochemische bepalingen, indien de onderzoeksleider dit noodzakelijk acht. Ook urineonderzoek kan aangewezen zijn. De gegevens over de dieren die zijn gebruikt in de chronische-toxiciteitsfase van het onderzoek, die doorgaans twaalf maanden duurt (zie punt 34), zullen informatie over deze parameters verschaffen. Nadere aanwijzingen over de waarde van dergelijke monsters in het kader van carcinogeniteitsonderzoek zijn te vinden in leidraad nr. 116 (7). Als bloedmonsters worden genomen, moeten deze aan het einde van de testperiode worden genomen, net vóór of tijdens het doden van de dieren. Daarbij dient te worden genoteerd uit welk lichaamsdeel en hoe de monsters zijn genomen, bijvoorbeeld door middel van een hartpunctie of uit de retroorbitale sinus, onder verdoving. Er kunnen ook bloedpreparaten worden voorbereid voor onderzoek, met name als het beenmerg lijkt te zijn aangetast, hoewel er wordt getwijfeld aan de waarde die een dergelijk onderzoek in de carcinogeniteitsfase heeft voor het beoordelen van het carcinogeen/oncogeen potentieel (38).

PATHOLOGIE

Macroscopische obductie

54. Bij alle dieren in het onderzoek, behalve verklikkerdieren en andere dieren in satellietgroepen (zie punt 20), moet een volledige macroscopische obductie worden verricht, waaronder een zorgvuldig onderzoek van het huidoppervlak, alle lichaamsopeningen alsmede de schedelholte, de borstholte en de buikholte, en de inhoud daarvan. De onderzoeksleider moet van geval tot geval beoordelen of obductie van verklikkerdieren en andere dieren in de satellietgroepen noodzakelijk is. Het gewicht van de organen maakt normaal gesproken geen deel uit van carcinogeniteitsonderzoek, aangezien geriatrische veranderingen en, in latere stadia, zich ontwikkelende tumoren de bruikbaarheid van gegevens over de orgaangewichten verstoren. Deze gegevens kunnen echter van groot belang zijn voor het bepalen van de bewijskracht van deze gegevens en voor het beoordelen van de werkingswijze. Gegevens over het orgaangewicht van dieren die deel uitmaken van een satellietonderzoek dienen uiterlijk één jaar nadat het onderzoek is aangevat te worden verzameld.

55. De volgende weefsels moeten in een fixeermiddel worden bewaard dat zowel voor het type weefsel als voor het beoogde latere histopathologische onderzoek (40) geschikt is (de weefsels tussen rechte haken zijn facultatief):

elk macroscopisch waarneembaar letsel	hart	alvleesklier	maag (voormaag, kliermaag)
bijnier	ileum	bijschildklier	[tanden]
aorta	jejunum	perifere zenuw	testis
hersenen (inclusief coupes van cerebrum, cerebellum en medulla/pons)	nier	hypofyse	thymus
blindedarm	traanklier (extraorbitaal)	prostaat	schildklier
cervix	lever	rectum	[tong]
coagulans afscheidende klier	long	speekselklier	luchtpijp
colon	lymfeklieren (zowel oppervlakkig als dieper gelegen)	zaadblaasje	urineblaas

▼**M4**

duodenum	borstklier (verplicht bij vrouwtjes en facultatief bij mannetjes, indien zichtbaar ontleedbaar)	skeletspier	uterus (inclusief cervix)
epididymis	[bovenste luchtwegen, inclusief neus, neusschelpen en paranasale sinussen]	huid	[ureter]
oog (inclusief netvlies)	slokdarm	ruggenmerg (drie niveaus: cervicaal, mediothoracaal en lumbaal)	[urinebuis]
[dijbeen met gewricht]	[reukkolf]	milt	vagina
galblaas (bij andere diersoorten dan ratten)	ovarium	[borstbeen]	coupe van het beenmerg en/of vers beenmergaspiraat
klier van Harder			

Organen die paarsgewijs voorkomen, bv. nieren en bijnieren, moeten beide worden bewaard. Uit de klinische en andere bevindingen kan de noodzaak blijken verder weefsel te onderzoeken. Ook organen waarvan op basis van de bekende eigenschappen van de teststof verondersteld wordt dat ze beschadigd kunnen worden, moeten worden bewaard. Bij onderzoek waarbij de dermale toedieningsweg wordt gebruikt, moeten de organen worden onderzocht die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld en moeten specifieke monsters van de huid op de toedieningslocatie worden genomen en bewaard. Bij inhalatieonderzoek moet de lijst van luchtwegweefsels die moeten worden bewaard en onderzocht, worden gebaseerd op de aanbevelingen in hoofdstuk B.8 van deze bijlage (8) en hoofdstuk B.29 van deze bijlage (9). In geval van andere organen/weefsels (en in aanvulling op de specifiek bewaarde weefsels van de luchtwegen) moeten de organen worden onderzocht die voor de orale toedieningsweg zijn vastgesteld.

Histopathologie

56. Er zijn aanwijzingen beschikbaar voor beste praktijken voor de uitvoering van toxicologisch pathologisch onderzoek (40). Ten minste de volgende weefsel moeten worden onderzocht:

— alle weefsels van de dieren in de hogedosisgroep en de controlegroep;

— alle weefsels van dieren die tijdens het onderzoek stierven of werden gedood;

— alle weefsels die macroscopische abnormaliteiten vertonen, met inbegrip van tumoren;

— bij waarneming van met de behandeling samenhangende histopathologische veranderingen bij dieren in de hogedosisgroep, dezelfde weefsels van alle dieren in alle andere dosisgroepen;

— alle organen die paarsgewijs voorkomen, bv. nieren en bijnieren, moeten beide worden onderzocht.

▼M4

GEGEVENS EN RAPPORTAGE (CARCINOGENITEIT EN CHRONISCHE TOXICITEIT)

Gegevens

57. Voor elk dier worden apart gegevens verstrekt over alle geëvalueerde parameters. Bovendien moeten alle gegevens worden samengevat in tabellen die voor iedere testgroep laten zien: het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of om redenen van dierenwelzijn moest worden gedood en het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren is ingetreden, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de waargenomen toxische effecten, met inbegrip van de aanvang, de duur en de ernst van eventuele toxische effecten, het aantal dieren met letsel, de aard van het letsel en het percentage dieren waarbij ieder type letsel voorkomt. Samengevatte gegevens in tabelvorm moeten de gemiddelde en standaarddeviatie (voor continue testgegevens) verschaffen van dieren waarbij toxische effecten of letsels voorkomen, in aanvulling op de inschaling van de letsels.

58. Bij de interpretatie van de onderzoeksresultaten kunnen controlegegevens uit het verleden nuttig zijn, bv. wanneer er aanwijzingen zijn dat de gegevens van de parallelle controlegroepen aanzienlijk afwijken van de recente gegevens van de controledieren in dezelfde testfaciliteit/kolonie. Controlegegevens uit het verleden die ter evaluatie worden aangeboden, moeten afkomstig zijn uit hetzelfde laboratorium, verband houden met dieren van dezelfde leeftijd en stam, en zijn gegenereerd gedurende de vijf jaar die zijn voorafgegaan aan het onderzoek in kwestie.

59. Voor zover van toepassing moeten alle waargenomen resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden en de te analyseren gegevens moeten tijdens het opzetten van het onderzoek worden gekozen (zie punt 9). Bij de selectie moet zo nodig worden gecorrigeerd voor overleving.

60. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en fysisch-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens;

— herkomst van de stof;

— partijnummer;

— certificaat van chemische analyse.

Medium (indien van toepassing):

— motivering voor de keuze van het medium (wanneer dat geen water is).

Proefdieren:

— gebruikte diersoort/stam en motivering van de keuze;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren bij aanvang van de test;

— herkomst, huisvesting, voeding enz.;

— gewicht van elk dier aan het begin van de test.

▼M4

Testomstandigheden:

— motivering voor de gekozen toedieningsweg en de keuze van de dosis;

— toegepaste statistische methoden voor analyse van de gegevens, indien van toepassing;

— bijzonderheden over de formulering van de teststof, respectievelijk de samenstelling van het voer;

— analytische gegevens over de bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

— de toedieningsweg en bijzonderheden over de toediening van de teststof;

— bij inhalatieonderzoek, alleen via de neus of via het hele lichaam;

— werkelijke doses (mg/kg lichaamsgewicht/dag) en conversiefactor van de teststofconcentratie (mg/kg of ppm) in het voedsel/drinkwater naar de werkelijke dosis, voor zover van toepassing;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

Resultaten (er moeten samengevatte gegevens in tabelvorm en gegevens voor elk dier apart worden verstrekt)

Algemeen:

— overlevingsgegevens;

— lichaamsgewicht/veranderingen hierin;

— voedselverbruik, voedselefficiëntie, indien berekend, en waterverbruik, indien van toepassing;

— toxicokinetische gegevens, indien beschikbaar;

— oftalmoscopie (indien beschikbaar);

— hematologie (indien beschikbaar);

— klinische chemie (indien beschikbaar).

Klinische bevindingen:

— tekenen van toxiciteit;

— incidentie (en indien gescoord, ernst) van eventuele abnormaliteiten;

— aard, ernst en duur van de klinische waarnemingen (van voorbijgaande aard dan wel blijvend).

Obductiegegevens:

— lichaamsgewicht aan het einde van het onderzoek;

— orgaangewichten en hun verhoudingen, indien van toepassing;

— obductieverslagen, incidentie en ernst van abnormaliteiten.

Histopathologie:

— niet-neoplastische histopathologische bevindingen;

— neoplastische histopathologische bevindingen;

▼M4

— correlatie van macroscopische en microscopische bevindingen;

— gedetailleerde beschrijving van alle met de behandeling samenhangende histopathologische bevindingen, met inbegrip van een inschaling van de ernst;

— een verslag van eventuele intercollegiale toetsing van objectglaasjes.

Statistische behandeling van de resultaten, naargelang hetgeen van toepassing is

Bespreking van de resultaten, waaronder:

— bespreking van eventuele modelleringsbenaderingen;

— dosis-responsverhoudingen;

— controlegegevens uit het verleden;

— beoordeling van eventuele informatie over de werkingswijze;

— bepaling van BMD, NOAEL of LOAEL;

— relevantie voor de mens.

Conclusies

LITERATUUR:

(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 S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food and Chemical Toxicology 40: 145-191.

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

(6) Hoofdstuk B.27 van deze bijlage, Subchronische orale toxiciteitstest: toxiciteitsonderzoek (oraal) op dieren anders dan knaagdieren bij herhaalde toediening (90 dagen).

(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 nr. 116, beschikbaar op de openbare website voor onderzoeksrichtlijnen van de OESO op 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) Hoofdstuk B.8 van deze bijlage, Subacute inhalatietoxiciteit: onderzoek van 28 dagen.

(10) Hoofdstuk B.29 van deze bijlage, Subchronische inhalatietoxiciteit: onderzoek van 90 dagen.

(11) Hoofdstuk B.9 van deze bijlage, Toxiciteit (dermaal) bij herhaalde toediening (28 dagen).

▼M4

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., 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 S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *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 H.A., Pastoor T.P., 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 J.E., Boobis A.R., 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 R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *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 L.R., 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 J.A. (Ed.), ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C., McAuslane J.A.N. en Lumley C.E. (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 C.E. (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. pp 279-284.

(26) Carmichael N.G., 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) Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, 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 D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel 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: 267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(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 (concept)document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (doc. ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Aanhangsel 1

DEFINITIE

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze testmethode wordt getest..

▼B

B.34. **REPRODUKTIETOXICITEITSONDERZOEK OVER ÉÉN GENERATIE**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.2. DEFINITIES

Zie Algemene inleiding — Deel B.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE ONDERZOEKMETHODE

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen mannelijke en vrouwelijke dieren toegediend. Aan de mannetjes dient de teststof gedurende de groei en gedurende ten minste één volledige spermatogene cyclus (ongeveer 56 dagen bij de muis en 70 dagen bij de rat) toegediend te worden, teneinde eventuele, door de reststof veroorzaakte nadelige effecten op de spermatogenese aan het licht te brengen.

Aan de vrouwelijke ouderdieren (P-generatie) moet de reststof ten minste gedurende twee volledige oestruscycli worden toegediend, teneinde eventuele door de teststof veroorzaakte nadelige effecten op de oestrus aan het licht te brengen. Vervolgens laat men de dieren paren. Gedurende de paartijd wordt de teststof aan beide geslachten toegediend; daarna alleen aan de wijfjes gedurende de dracht en de zoogtijd. Bij toediening van de teststof via inhalatie zal de methode op een aantal punten moeten worden aangepast.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKMETHODE

1.6.1. *Voorbereidingen*

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge dieren op willekeurige wijze in de te behandelen en controlegroepen ingedeeld. Voor het onderzoek worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Aanbevolen wordt de teststof in het voedsel of drinkwater toe te dienen. Ook andere toedieningswegen komen in aanmerking. De teststof moet bij alle dieren voor de gehele duur van het experiment op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering re vergemakkelijken, moet ervan bekend zijn dat zij geen toxische effecten veroorzaken. Toediening geschiedt gedurende zeven dagen per week.

▼B

1.6.2. Proefdieren

Selectie van de soort

Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten of muizen. Stammen met een lage vruchtbaarheid dienen niet te worden gebruikt. Er dient gebruik te worden gemaakt van gezonde dieren die nog niet eerder aan experimenten zijn onderworpen. Van de proefdieren dienen soort, stam, geslacht, gewicht en/of leeftijd bekend te zijn.

Voor een juiste beoordeling van de vruchtbaarheid dienen zowel de mannetjes als de wijfjes te worden onderzocht. Alle behandelde en controledieren dienen gespeend te zijn voordat met de dosering wordt begonnen.

Aantal en geslacht

Elke behandelde en controlegroep dient zoveel dieren te bevatten dat er steeds ongeveer 20 drachtige wijfjes zijn die op ongeveer hetzelfde tijdstip verwacht worden te werpen.

Dit om te komen tot voldoende drachten en nakomelingen om een zinvolle evaluatie te kunnen maken van de mogelijke effecten van de stof op de vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van de moeder bij de dieren van de oudergeneratie en het zogen, de groei en de ontwikkeling van de F_1-generatie vanaf de conceptie tot aan de spening.

1.6.3. Proefomstandigheden

Voer en water dienen ad libitum te worden verstrekt. Vlak voor de partus moeten de drachtige wijfjes apart in speciale hokken worden ondergebracht; eventueel kan nestmateriaal worden verstrekt.

1.6.3.1. Dosisniveaus

Er dienen ten minste drie dosisgroepen en een controlegroep te worden gebruikt. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden. Indien een teststof leidt tot een verminderde voeropname of -absorptie, dan kan het noodzakelijk zijn een parallelle controlegroep te gebruiken. In het ideale gevat moet het hoogste dosisniveau bij de ouderdieren leiden tot toxische verschijnselen, maar niet tot sterfte, tenzij zulks op grond van de fysisch-chemische eigenschappen of de biologische effecten van de teststof onmogelijk is. In het ideale geval moeten de tussenliggende doses leiden rot minimale toxische effecten die aan de teststof zijn toe te schrijven, en mag de lage dosis niet tot enige waarneembare nadelige effecten bij de ouders of de nakomelingen leiden. Wanneer de teststof via een maagsonde of in capsules wordt toegediend, moet de aan elk dier toegediende dosis gebaseerd zijn op het lichaamsgewicht van het dier en wekelijks aan het gewijzigde lichaamsgewicht worden aangepast. Bij drachtige wijfjes kan de dosis desgewenst gebaseerd worden op het lichaamsgewicht op dag nul of dag zes van de dracht.

1.6.3.2. Hoogste te testen dosis

Indien stoffen met een lage toxiciteit bij een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg het voortplantingsvermogen op generlei wijze blijkt te zijn verstoord, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. Indien uit een voorafgaand onderzoek bij het hoge dosisniveau waarbij duidelijke tekenen van toxiciteit bij het moederdier voorkomen geen nadelige effecten op de vruchtbaarheid blijken, zijn studies bij andere dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk.

▼B

1.6.3.3. Uitvoering van het onderzoek

Tijdschema

Met de dagelijkse toediening van de teststof aan de mannelijke ouderdieren dient te worden begonnen wanneer deze vijf à negen weken oud zijn, nadat zij zijn gespeend en gedurende ten minste vijf dagen aan de proefomstandigheden zijn gewend. Bij ratten wordt de teststof gedurende tien weken vóór de paartijd toegediend (bij muizen gedurende acht weken). De mannetjes kunnen hetzij aan het einde van de paartijd worden gedood en onderzocht, hetzij op hun voer met de teststof in leven worden gehouden voor de eventuele voortbrenging van een tweede nest en dan enige tijd voor het eind van het onderzoek worden gedood en onderzocht. Bij vrouwelijke ouderdieren dient met de dosering na ten minste vijf dagen van gewenning aan de proefomstandigheden te worden begonnen en deze dient ten minste twee weken te hebben geduurd vóór de paring plaatsvindt. De dagelijkse toediening van de teststof aan de vrouwelijke ouderdieren dient te worden voortgezet gedurende de hele paringstijd van drie weken, de dracht en tot aan het spenen van de nakomelingen van de eerste generatie. Er dient aandacht te worden geschonken aan wijzigingen in het doseringsschema op grond van andere beschikbare informatie over de teststof, zoals inductie van het teststofmetabolisme of bioaccumulatie.

Paring

Bij studies naar de reproductietoxiciteit kan men hetzij één mannetje met één wijfje (1:1) of één mannetje met twee wijfjes (1:2) laten paren.

In het eerste geval (1:1) wordt één wijfje bij hetzelfde mannetje geplaatst totdat het drachtig is of er drie weken zijn verstreken. Elke ochtend worden de wijfjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of vaginale plugs. Dag nul van de dracht is de dag waarop een vaginale plug of sperma wordt aangetroffen, waarbij rekening wordt gehouden rnet de spermatogenese.

Bij de paartjes waarbij de paring mislukt, dient te worden nagegaan wat de oorzaak van deze kennelijke onvruchtbaarheid is.

Dit kan onder meer geschieden door de dieren nogmaals te laten paren, maar dan met vader- of moederdieren van bewezen vruchtbaarheid, door microscopisch onderzoek van de voortplantingsorganen en onderzoek van de oestruscyclus of de spermatogenese.

Nestgrootte

De dieren waaraan gedurende het vruchtbaarheidsonderzoek de teststof wordt toegediend, worden in de gelegenheid gesteld normaal te werpen en hun jongen tot de speentijd groot te brengen. De nestgrootte wordt hierbij niet gestandaardiseerd.

Als standaardisatie wel gebeurt, dan wordt voorgesteld als volgt tewerk te gaan. Tussen de eerste en de vierde dag na de geboorte kan de grootte van elk nest worden aangepast door het teveel aan jongen, via selectie, uil het nest te nemen om uiteindelijk vier mannetjes en vier wijfjes per nest over te houden.

Indien het aantal mannetjes of wijfjes niet voldoende is om er per nest vier van elk geslacht over te houden, kan worden volstaan met een gedeeltelijke aanpassing (bijvoorbeeld vijf mannetjes en drie wijfjes). Een en ander is niet van toepassing op nesten met minder dan acht jongen.

▼B

1.6.4. Waarnemingen

Gedurende de hele onderzoekperiode wordt elk dier ten minste eenmaal per dag geobserveerd. Met de teststof samenhangende veranderingen in het gedrag, tekenen van een moeilijke of langdurige geboorte en alle tekenen van toxiciteit, inclusief sterfte, dienen te worden vastgelegd. Gedurende de tijd die aan de paring voorafgaat en de paartijd dient het verbruik van voer wekelijks te worden gemeten. Tijdens de dracht kan het verbruik van voer eventueel dagelijks worden gemeten. Na het werpen en tijdens de zoogtijd dient het verbruik van voer (en van water indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend) te worden gemeten op dezelfde dag als de nesten worden gewogen. De mannelijke en vrouwelijke ouderdieren moeten worden gewogen op de eerste dag dat zij de teststof krijgen toegediend en daarna eenmaal per week. Deze waarnemingen moeten voor elk volwassen dier afzonderlijk worden vastgelegd.

De drachttijd dient te worden berekend vanaf dag nul van de dracht. Elke worp dient zo spoedig mogelijk na de geboorte te worden onderzocht, teneinde het aantal en geslacht van de jongen vast te stellen, alsmede het aantal dood- en levendgeboren jongen en de aanwezigheid van met het blote oog zichtbare afwijkingen.

Dode jongen en jongen die op de vierde dag worden gedood, dienen te worden bewaard en op eventuele afwijkingen te worden onderzocht. De levende jongen moeten worden geteld en de nesten moeten worden gewogen op de ochtend na de geboorte, op de vierde en de zevende dag en vervolgens wekelijks tot het eind van het onderzoek, wanneer de dieren afzonderlijk dienen te worden gewogen.

De bij de moederdieren en nakomelingen waargenomen lichamelijke of gedragsafwijkingen dienen te worden opgetekend.

1.6.5. *Pathologie*

1.6.5.1. Necropsie

Wanneer er ouderdieren tijdens het onderzoek worden gedood of sterven, dienen zij macroscopisch te worden onderzocht op eventuele structurele afwijkingen of pathologische veranderingen, waarbij speciaal aandacht moet worden geschonken aan de voortplantingsorganen. Dode of stervende jongen moeten op afwijkingen worden onderzocht.

1.6.5.2. Histopathologie

Van alle ouderdieren moeten de eierstokken, uterus, cervix, vagina, testes, epididymides, zaadblaasjes, prostaat, coagulans afscheidende klier, de hypofyse en aangetaste organen voor microscopisch onderzoek worden bewaard. In het geval dat deze organen nog niet bij andere onderzoeken, waarbij herhaalde doseringen zijn toegediend, zijn onderzocht, dienen zij microscopisch te worden onderzocht bij alle dieren uit de hoogste dosisgroep en de controlegroep en de dieren die tijdens het onderzoek sterven.

De organen die bij deze dieren afwijkingen vertonen, dienen vervolgens bij alle andere ouderdieren te worden onderzocht. In deze gevallen dienen alle weefsels die met het blote oog zichtbare pathologische veranderingen vertonen, microscopisch te worden onderzocht. Zoals hierboven reeds werd gesuggereerd, kunnen de voortplantingsorganen van dieren waarvan wordt vermoed dat zij onvruchtbaar zijn, aan een microscopisch onderzoek worden onderworpen.

▼B

2. **GEGEVENS**

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat; het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het aantal vruchtbare mannetjes, het aantal drachtige wijfjes, de aard van de veranderingen en het percentage dieren dat elk type verandering vertoont.

Indien mogelijk, moeten alle numerieke resultaten met behulp van een voor dit doel geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere algemeen erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeien, indien mogelijk, ook de volgende gegevens worden opgenomen:

— gebruikte diersoort/stam;

— gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis, met inbegrip van vruchtbaarheid, dracht en levensvatbaarheid;

— tijdstip gedurende het onderzoek waarop de dood intreedt of aangeven of dieren tot de tijd waarop zij volgens plan zouden worden gedood of tot het einde van de proef in leven bleven;

— tabel met het gewicht van elke worp, het gemiddelde gewicht van de jongen en het gewicht van elk jong afzonderlijk aan het eind van het onderzoek;

— toxische of andere effecten op de reproductie, het nageslacht, postnatale groei, enzovoort;

— dag waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en verloop hiervan;

— gegevens over het lichaamsgewicht van de ouderdieren;

— bevindingen van de necropsie;

— gedetailleerde beschrijving van eventuele microscopische bevindingen;

— statistische verwerking van de resultaten, waar dat van toepassing is;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie Algemene inleiding — Deel B.

4. **LITERATUUR**

Zie Algemene inleiding — Deel B.

▼B

B.35. REPRODUCTIETOXICITEITSONDERZOEK OVER TWEE GENERATIES

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 416 (2001) van de OESO.

1.1. INLEIDING

Deze testmethode voor de reproductietoxiciteit over twee generaties is bedoeld om algemene informatie te verschaffen over de effecten van een teststof op de toestand en het functioneren van het mannelijke en vrouwelijke reproductiesysteem, met inbegrip van de functie van de geslachtsorganen, de oestruscyclus, het paargedrag, de bevruchting, de zwangerschap, de geboorte, de lactatie en het spenen, en de groei en ontwikkeling van de nakomelingen. De studie kan ook informatie verschaffen over de effecten van de teststof op de neonatale morbiditeit en mortaliteit en voorlopige gegevens over de prenatale en postnatale ontwikkelingstoxiciteit en kan als leidraad voor verdere tests fungeren. Deze testmethode is niet alleen bedoeld om de groei en ontwikkeling van de F_1-generatie te bestuderen, maar ook om de toestand en het functioneren van het mannelijke en vrouwelijke reproductiesysteem daarvan en de groei en ontwikkeling van de F_2-generatie te beoordelen. Om meer informatie te verkrijgen over de ontwikkelingstoxiciteit en functionele gebreken kunnen aanvullende tests in dit protocol worden opgenomen, waarbij eventueel de methoden voor ontwikkelingstoxiciteit en/of ontwikkelingsneurotoxiciteit kunnen worden geraadpleegd, of kunnen deze eindpunten bij aparte onderzoeken met de daartoe geschikte testmethoden worden bestudeerd.

1.2. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in geleidelijk oplopende doseringen aan verschillende groepen mannetjes en vrouwtjes toegediend. De mannetjes van de P-generatie krijgen de teststof gedurende de groei en ten minste één volledige spermatogenese-cyclus toegediend (ongeveer 56 dagen bij de muis en 70 dagen bij de rat) om eventuele schadelijke effecten op de spermatogenese aan het licht te brengen. De effecten op het sperma worden aan de hand van een aantal spermaparameters (zoals de morfologie en beweeglijkheid van het sperma) en door weefselpreparatie en gedetailleerde histopathologie bepaald. Als er gegevens over de spermatogenese beschikbaar zijn uit een eerder uitgevoerd onderzoek met herhaalde toediening dat lang genoeg geduurd heeft, bv. een onderzoek van 90 dagen, behoeven de mannetjes van de P-generatie niet in de evaluatie te worden opgenomen. Wel wordt echter aanbevolen monsters of opgenomen digitale beelden van sperma van de P-generatie te bewaren om een latere evaluatie mogelijk te maken. De vrouwtjes van de P-generatie krijgen de teststof gedurende de groei en enkele volledige oestruscycli toegediend om eventuele schadelijke effecten van de teststof op de normale oestruscyclus te detecteren. De teststof wordt gedurende de dekperiode, gedurende de daaruit voortvloeiende dracht en tot en met het spenen van hun F_1-jongen aan de ouderdieren (P-generatie) toegediend. Bij het spenen van de F_1-generatie wordt de toediening van de stof voortgezet bij de F_1-jongen, en wel gedurende hun groei tot volwassenheid, de dekking en de productie van een F_2-generatie tot de F_2-generatie wordt gespeend.

Alle dieren worden klinisch geobserveerd en pathologisch onderzocht op toxiciteitsverschijnselen, waarbij vooral wordt gelet op effecten op de toestand en het functioneren van het mannelijke en vrouwelijke reproductiesysteem en de groei en ontwikkeling van de jongen.

▼B

1.3. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.3.1. **Keuze van de diersoort**

Voor de test worden bij voorkeur ratten gebruikt. Als er een andere soort wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven en zullen er de nodige wijzigingen moeten worden aangebracht. Stammen met een lage vruchtbaarheid of waarvan bekend is dat er vaak ontwikkelingsstoornissen optreden, mogen niet worden gebruikt. Aan het begin van het onderzoek moeten de gewichtsverschillen tussen de dieren minimaal zijn en niet groter dan 20 % van het gemiddelde gewicht van elke sekse.

1.3.2. **Huisvesting en voeding**

De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C (± 3 °C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. De verlichting dient met kunstlicht te gebeuren met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende vermenging van de teststof te zorgen wanneer die langs deze weg wordt toegediend.

De dieren kunnen elk apart of in kleine groepjes met hetzelfde geslacht worden ondergebracht. De dekking gebeurt in daarvoor geschikte kooien. Wanneer de dekking blijkt te hebben plaatsgevonden, worden de vrouwtjes apart gezet in werp- of drachthokken. Dieren die gedekt zijn kunnen ook in groepjes worden gehuisvest en één of twee dagen voor het werpen apart worden gezet. Dieren die gedekt zijn krijgen geschikt en gespecificeerd nestmateriaal wanneer ze gaan werpen.

1.3.3. **Voorbereiding van de dieren**

Er worden gezonde jonge dieren gebruikt die gedurende ten minste 5 dagen aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. De kenmerken van de proefdieren qua soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en/of leeftijd worden vastgelegd. Alle broer/zus-verhoudingen tussen de dieren moeten bekend zijn, zodat dekking van zus door broer wordt vermeden. De dieren worden aselect ingedeeld in controlegroepen en behandelde groepen (waarbij geleding aan de hand van het lichaamsgewicht wordt aanbevolen). De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Elk dier krijgt een uniek identificatienummer. Bij de P-generatie gebeurt dit voordat de toediening begint. Bij de F_1-generatie gebeurt dit bij het spenen voor de dieren die voor dekking worden geselecteerd. Voor alle geselecteerde F_1-dieren wordt bijgehouden uit welk nest ze afkomstig zijn. Daarnaast wordt aanbevolen de jongen zo spoedig mogelijk na de geboorte een eigen identificatie te geven, wanneer wordt overwogen de jongen apart te wegen of functieproeven uit te voeren.

Wanneer met de toediening aan de ouderdieren (P-generatie) wordt gestart, dienen deze ongeveer 5-9 weken oud te zijn. De dieren van alle testgroepen dienen zo veel mogelijk hetzelfde gewicht en dezelfde leeftijd te hebben.

▼B

1.4. UITVOERING

1.4.1. **Aantal en geslacht van de dieren**

Elke test- en controlegroep dient een zodanig aantal dieren te bevatten dat er bij voorkeur ten minste 20 drachtige vrouwtjes op of vlak voor de werpdatum zijn. Bij stoffen die ongewenste aan de behandeling gerelateerde effecten veroorzaken (bv. steriliteit of te grote toxiciteit bij hoge doses), is dit soms onmogelijk. Het is de bedoeling dat er genoeg drachtige vrouwtjes zijn om een zinnige beoordeling mogelijk te maken van het vermogen van de stof om invloed te hebben op de vruchtbaarheid, de dracht en het gedrag van de moeder, het zogen, de groei en ontwikkeling van de F_1-generatie vanaf de bevruchting tot aan de geslachtsrijpheid en de ontwikkeling van hun jongen (de F_2-generatie) tot ze gespeend worden. Als het gewenste aantal drachtige dieren (d.w.z. 20) niet kan worden gehaald, betekent dit niet automatisch dat het onderzoek onbruikbaar is; dit moet van geval tot geval worden beoordeeld.

1.4.2. **Bereiding van de doses**

De teststof wordt bij voorkeur oraal (in het voer, in het drinkwater of met een sonde) toegediend, tenzij een andere toedieningsweg (b.v. dermaal of door inhalatie) geschikter wordt geacht.

Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspendeerd. Aanbevolen wordt eerst te bezien of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken, als dit niet kan een oplossing/emulsie in olie (bv. maïsolie) te overwegen en daarna eventueel een ander medium. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxische kenmerken daarvan bekend zijn. De stabiliteit van de teststof in het medium moet worden bepaald.

1.4.3. **Dosering**

Er worden ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controlegroep gebruikt. Tenzij dit vanwege de fysisch/chemische aard of biologische kenmerken van de teststof onmogelijk is, moet de hoogste dosis zodanig worden gekozen dat er enige toxiciteit wordt veroorzaakt, maar geen sterfte of ernstig leed. Bij onverwachte sterfte zijn onderzoeken met een sterfte van minder dan ongeveer 10 % bij de ouderdieren (de P-generatie) normaal gesproken nog aanvaardbaar. Er wordt een dalende reeks dosisniveaus gekozen teneinde een dosisafhankelijk effect en de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten (NOAEL) te bepalen. Intervallen van een factor twee of vier zijn vaak optimaal om de dalende dosisniveaus vast te stellen en het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor tien) tussen de doseringen te gebruiken. Bij toediening in het voer mag het dosisinterval niet meer dan een factor drie zijn. Bij de keuze van de dosisniveaus wordt rekening gehouden met bekende toxiciteitsgegevens, met name resultaten van onderzoek met herhaalde toediening. Ook met beschikbare gegevens over het metabolisme en de kinetiek van de teststof of verwante verbindingen dient rekening te worden gehouden. Bovendien zal met deze informatie ook makkelijker kunnen worden aangetoond dat het doseringsschema adequaat is.

▼B

De controlegroep wordt niet of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, met medium behandeld. Afgezien van de toediening van de teststof is de behandeling van de dieren in de controlegroep identiek aan die van de dieren in de testgroepen. Als er een medium wordt gebruikt, wordt aan de controlegroep de hoogste gebruikte mediumdosis toegediend. Als een teststof in het voer wordt toegediend en leidt tot een lagere voeropname of voerbenutting, kan het gebruik van een paarsgewijs gevoerde controlegroep nodig worden geacht. In plaats van een gelijktijdige paarsgewijs gevoerde controlegroep kunnen ook gegevens worden gebruikt uit gecontroleerd onderzoek dat is opgezet om de effecten van een lagere voerconsumptie op reproductieparameters te bepalen.

Er moet aandacht worden geschonken aan de volgende kenmerken van het medium en andere additieven: effecten op de resorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof, effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken daarvan kunnen wijzigen en effecten op het voer- of watergebruik of de voedingstoestand van de dieren.

1.4.4. **Limiettest**

Als een onderzoek met orale toediening van één dosis van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag of, bij toediening in het voer of het drinkwater, een equivalent percentage in het voer of drinkwater volgens de voor dit onderzoek beschreven procedure geen waarneembare toxiciteit bij de ouderdieren of hun jongen veroorzaakt en op grond van gegevens over verwante verbindingen qua structuur en/of metabolisme geen toxiciteit te verwachten valt, zal een volledig onderzoek met verschillende dosisniveaus wellicht niet nodig zijn. De limiettest is bruikbaar, behalve wanneer vanwege de verwachte blootstelling van de mens een hogere orale dosis nodig wordt geacht. Voor andere toedieningsvormen, zoals inhalatie of toediening op de huid, zal het maximaal haalbare blootstellingsniveau vaak worden bepaald en beperkt door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof zoals de oplosbaarheid.

1.4.5. **Toediening van de doses**

De teststof wordt 7 dagen per week aan de dieren toegediend. Bij voorkeur wordt voor de orale toedieningsweg (in het voer, in het drinkwater of met een sonde) gekozen. Als er een andere toedieningsweg wordt gebruikt, moet er een motivering worden gegeven en kunnen er aanpassingen nodig zijn. De stof wordt aan alle dieren gedurende de vereiste proefperiode met dezelfde methode toegediend. Als de stof met een sonde wordt toegediend, moet dit met een maagsonde gebeuren. Het volume vloeistof dat in één keer wordt toegediend, mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht (voor maïsolie is het maximum 0,4 ml/100 g lichaamsgewicht), behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat; in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Behalve wanneer het om irriterende of bijtende stoffen gaat, waarbij meestal bij hogere concentraties heviger effecten optreden, worden variaties in het toegediende volume tot een minimum beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er voor alle dosisniveaus een constant volume wordt toegediend. Bij sondetoediening krijgen de jongen de teststof meestal alleen indirect via de melk, totdat ze worden gespeend en directe toediening begint. Bij toediening in het voer of het drinkwater krijgen de jongen de teststof ook direct binnen wanneer ze in de laatste week van de lactatieperiode zelf beginnen te eten.

▼B

Wanneer stoffen via het voer of het drinkwater worden toegediend, is het belangrijk ervoor te zorgen dat de hoeveelheid teststof de normale voedings- of waterbalans niet stoort. Wanneer de teststof in het voer wordt toegediend, kan een constante voerconcentratie (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier worden gebruikt. De gekozen methode dient te worden vermeld. Wanneer de stof met een sonde wordt toegediend, gebeurt dit elke dag op ongeveer hetzelfde tijdstip en wordt de dosis ten minste een keer per week aangepast om een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht te houden. Wanneer de met een sonde toegediende dosis op basis van het gewicht wordt aangepast, moet rekening worden gehouden met informatie over de placentaverdeling.

1.4.6. **Testschema's**

De dagelijkse toediening aan de ouderdieren (de mannetjes en vrouwtjes van de P-generatie) begint wanneer ze 5 tot 9 weken oud zijn. De dagelijkse toediening aan de mannetjes en vrouwtjes van de F_1-generatie begint wanneer ze worden gespeend; er moet aan worden gedacht dat de directe blootstelling van de F_1-jongen bij toediening van de teststof via het voer of het drinkwater al tijdens de lactatieperiode kan beginnen. Voor beide geslachten (P en F_1) vindt de toediening ten minste 10 weken vóór de dekperiode plaats. Voor beide geslachten wordt de toediening gedurende de dekperiode van twee weken voortgezet. De mannetjes worden op humane wijze gedood en onderzocht wanneer ze niet meer nodig zijn voor de bepaling van de effecten op de reproductie. Bij de moederdieren (P-generatie) wordt de toediening gedurende de dracht en tot het spenen van de F_1-jongen voortgezet. Op basis van de beschikbare informatie over de teststof, bijvoorbeeld over de toxiciteit, de metabolisme-inductie of de bioaccumulatie, moet worden overwogen of er wijzigingen in het toedieningsschema nodig zijn. De dosis voor een bepaald dier wordt normaal gesproken gebaseerd op de meest recente bepaling van het lichaamsgewicht. Bij de aanpassing van de dosis gedurende het laatste derde deel van de dracht moet echter zorgvuldigheid worden betracht.

De mannetjes en vrouwtjes van de P- en de F_1-generatie worden behandeld tot ze worden gedood. Alle volwassen mannetjes en vrouwtjes van de P- en de F_1-generatie worden op humane wijze gedood wanneer ze niet meer nodig zijn voor de bepaling van de effecten op de reproductie. De F_1-jongen die niet voor dekking worden geselecteerd en alle F_2-jongen worden na het spenen op humane wijze gedood.

1.4.7. **De dekprocedure**

1.4.7.1. *Dekking bij de ouderdieren (P-generatie)*

Voor elke dekking wordt één vrouwtje bij één mannetje van dezelfde dosisgroep gezet (1:1-dekking) totdat ze copuleren of er twee weken zijn verstreken. Elke dag worden de vrouwtjes onderzocht op de aanwezigheid van sperma of een vaginale prop. Als dag 0 van de dracht geldt de dag waarop een vaginale prop of sperma wordt gevonden. Wanneer de dekking geen succes heeft, kan worden overwogen de vrouwtjes opnieuw te laten dekken door mannetjes van dezelfde groep waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond. In de gegevens wordt duidelijk vermeld welke dieren gepaard hebben. Dekking door een mannetje met dezelfde ouders wordt vermeden.

▼B

1.4.7.2. *Dekking bij de F_1-generatie*

Voor de dekking van de F_1-jongen worden uit elk nest bij het spenen ten minste één mannetje en één vrouwtje gekozen om te paren met andere jongen van hetzelfde dosisniveau maar een ander nest, hetgeen de F_2-generatie oplevert. Wanneer er tussen de jongen uit één nest geen significante verschillen in lichaamsgewicht of uiterlijk worden waargenomen, worden de jongen aselect gekozen. Wanneer deze verschillen wel worden waargenomen, worden de beste vertegenwoordigers van elk nest gekozen. In de praktijk gebeurt dit het gemakkelijkst op basis van het lichaamsgewicht, maar het kan beter zijn om het op basis van het uiterlijk te doen. De dekking bij de F_1-generatie gebeurt niet voordat ze volledig tot geslachtsrijpheid zijn gekomen.

Paren zonder jongen worden beoordeeld om te bepalen wat de oorzaak van de onvruchtbaarheid lijkt te zijn. Daartoe kan de gelegenheid worden gegeven voor paringen met andere mannetjes of vrouwtjes waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond, kunnen de voortplantingsorganen microscopisch worden onderzocht en kan de oestruscyclus of de spermatogenese nader worden onderzocht.

1.4.7.3. *Tweede dekking*

In bepaalde gevallen, bijvoorbeeld bij aan de behandeling gerelateerde veranderingen in de nestgrootte of bij de waarneming van een twijfelachtig effect bij de eerste dekking, wordt aanbevolen de volwassen P- en F_1-dieren opnieuw te laten paren om een tweede nest te krijgen. Daarbij wordt aanbevolen vrouwtjes of mannetjes die geen nest hebben gekregen te laten paren met dieren van het andere geslacht waarvan de vruchtbaarheid is aangetoond. Als in een van beide generaties een tweede nest nodig wordt geacht, laat men de dieren ongeveer een week na het spenen van het laatste nest opnieuw paren.

1.4.7.4. *Nestgrootte*

De dieren krijgen de gelegenheid hun jongen normaal te werpen en groot te brengen tot ze worden gespeend. Standaardisatie van de nestgrootte is facultatief. Wanneer standaardisatie gebeurt, moet de gebruikte methode gedetailleerd worden beschreven.

1.5 WAARNEMINGEN

1.5.1. **Klinische observaties**

Elke dag wordt een algemene klinische observatie uitgevoerd en bij sondetoediening wordt voor het tijdstip rekening gehouden met de periode na de toediening waarin maximale effecten worden verwacht. Gedragsveranderingen, tekenen dat het werpen moeilijk verloopt of langer duurt en alle toxiciteitsverschijnselen worden geregistreerd. Ten minste één maal per week wordt daarnaast een gedetailleerder onderzoek van elk dier uitgevoerd; dit kan gemakkelijk gebeuren wanneer het dier wordt gewogen. Tweemaal per dag en in het weekend eventueel éénmaal per dag wordt bij alle dieren naar ziekte of sterfte gekeken.

▼B

1.5.2. **Lichaamsgewicht en voer/waterconsumptie van de ouderdieren**

De ouderdieren (P- en F1-generatie) worden op de eerste dag van toediening en vervolgens ten minste één maal per week gewogen. De moederdieren (P- en F1-generatie) worden ten minste op de dagen 0, 7, 14 en 20 of 21 van de dracht gewogen en tijdens de lactatieperiode op de dagen waarop de nesten worden gewogen en op de dag waarop de dieren worden gedood. Deze observaties worden voor elk volwassen dier apart gerapporteerd. In de periode vóór de dekking en tijdens de dracht wordt de voerconsumptie ten minste wekelijks gemeten. Het watergebruik wordt ten minste wekelijks gemeten als de teststof in het water wordt toegediend.

1.5.3. **De oestrus-cyclus**

Bij de vrouwtjes van de P- en de F1-generatie worden de lengte en de normaliteit van de oestrus-cyclus geëvalueerd door vaginale uitstrijkjes vóór de dekking en facultatief tijdens de dekking totdat kan worden aangetoond dat de dekking heeft plaatsgevonden. Bij het verwijderen van cellen van de vagina/cervix moet ervoor worden gezorgd dat verstoring van de mucosa en daardoor schijnzwangerschap worden voorkomen (1).

1.5.4. **Sperma-parameters**

Van alle mannetjes van de P- en de F1-generatie wordt, wanneer ze worden gedood, het gewicht van de testis en de epididymis geregistreerd en wordt één exemplaar van elk orgaan bewaard voor histopathologisch onderzoek (zie de punten 1.5.7. en 1.5.8.1). Van een subgroep van ten minste tien mannetjes van elke groep P- en Fl-mannetjes worden de andere testis en epididymis gebruikt voor de telling van respectievelijk de homogenisatie-resistente spermatiden en de spermareserve in de staart van de epididymis. Bij deze zelfde subgroep wordt sperma uit de staart van de epididymis of het vas deferens verzameld om de beweeglijkheid en de morfologie van het sperma te beoordelen. Als er aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen of uit andere onderzoeken is gebleken dat effecten op de spermatogenese mogelijk zijn, wordt de beoordeling van het sperma bij alle mannetjes van elke dosisgroep uitgevoerd; in andere gevallen kan de telling worden beperkt tot de P- en F1-mannetjes uit de controlegroep en de groep met de hoogste dosis.

Het totale aantal homogenisatie-resistente spermatiden uit de testis en het sperma in de staart van de epididymis worden geteld (2)(3). De spermareserve in de staart kan worden afgeleid uit de concentratie en het volume van het sperma in de suspensie die voor de kwalitatieve beoordeling wordt gebruikt en het aantal spermatozoën dat later door het resterende staartweefsel fijn te malen en/of te homogeniseren wordt gevonden. De telling gebeurt direct na het doden van de dieren bij de gekozen subgroep van de mannetjes van alle dosisgroepen, tenzij er video- of digitale beelden worden gemaakt of tenzij de exemplaren worden ingevroren en later worden geanalyseerd. In deze gevallen kunnen de controlegroep en de groep met de hoogste dosis als eerste worden geanalyseerd. Als er geen aan de behandeling gerelateerde effecten (bv. effecten op het aantal spermatozoën, op de beweeglijkheid of op de morfologie) worden waargenomen, behoeven de andere dosisgroepen niet te worden geanalyseerd. Wanneer bij de groep met de hoogste dosis wel aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen, moeten de groepen met een lagere dosis ook worden beoordeeld.

▼B

De beweeglijkheid van sperma uit de epididymis (of het ductus deferens) wordt onmiddellijk na het doden beoordeeld of op video opgenomen. Het sperma wordt verwijderd, waarbij de beschadiging tot het minimum wordt beperkt, en met aanvaardbare methoden verdund voor de beweeglijkheidsanalyse (4). Het percentage spermatozoën in oplopende beweeglijkheidscategorieën wordt subjectief of objectief bepaald. Wanneer computergesteunde bewegingsanalyse wordt gebruikt (5)(6)(7)(8)(9)(10), worden de oplopende beweeglijkheidscategorieën bepaald door drempelwaarden voor de gemiddelde snelheid en rechtheid van het pad of een lineaire index die door de gebruiker worden bepaald. Als bij obductie de monsters op video worden opgenomen (11) of de beelden op een andere wijze worden vastgelegd, kan later een analyse van alleen de P- en F1-mannetjes van de controlegroep en de groep met de hoogste dosis worden uitgevoerd, tenzij er aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen; in dat geval moeten de groepen met een lagere dosis ook worden beoordeeld. Wanneer er geen video- of digitale beelden worden opgenomen, worden alle monsters in alle behandelingsgroepen bij de obductie geanalyseerd.

Er wordt een morfologische evaluatie van een spermamonster uit de epididymis (of het vas deferens) uitgevoerd. De spermatozoën (ten minste 200 per monster) worden als gefixeerde natte preparaten onderzocht (12) en als normaal of abnormaal ingedeeld. Morfologische abnormaliteiten van sperma zijn bijvoorbeeld versmelting, geïsoleerde koppen of misvormde koppen en/of staarten. De evaluatie wordt bij de geselecteerde subgroep mannetjes van alle dosisgroepen direct na het doden van de dieren of, wanneer er video- of digitale beelden worden opgenomen, op een later tijdstip uitgevoerd. Ook uitstrijkjes kunnen, wanneer ze gefixeerd zijn, later worden afgelezen. In deze gevallen kunnen de controlegroep en de groep met de hoogste dosis als eerste worden geanalyseerd. Als er geen aan de behandeling gerelateerde effecten (bv. effecten op de morfologie van het sperma) worden waargenomen, behoeven de andere dosisgroepen niet te worden geanalyseerd. Wanneer bij de groep met de hoogste dosis wel aan de behandeling gerelateerde effecten worden waargenomen, moeten de groepen met een lagere dosis ook worden beoordeeld.

Als een van de bovengenoemde parameters voor de sperma-evaluatie al eerder als onderdeel van een onderzoek naar systemische toxiciteit van ten minste 90 dagen is onderzocht, behoeft deze bij het onderzoek over twee generaties niet noodzakelijkerwijs opnieuw te worden onderzocht. Wel wordt echter aanbevolen monsters of digitale beelden van het sperma van de P-generatie te bewaren om eventueel een latere evaluatie mogelijk te maken.

1.5.5. **Jongen**

Elk nest wordt zo spoedig mogelijk na het werpen (lactatiedag 0) onderzocht om het aantal en het geslacht van de jongen, de doodgeboren jongen en de levend geboren jongen en de aanwezigheid van macroscopische afwijkingen vast te stellen. Jongen die op dag 0 dood worden aangetroffen worden, als ze niet verweekt zijn, bij voorkeur onderzocht op mogelijke gebreken en de doodsoorzaak en geconserveerd. Levende jongen worden bij de geboorte (lactatiedag 0) of op dag 1 en vervolgens periodiek op weegdagen, zoals bijvoorbeeld de dagen 4, 7, 14 en 21 van de lactatie, geteld en apart gewogen. Bij de moederdieren of de jongen waargenomen lichamelijke of gedragsafwijkingen worden geregistreerd.

▼B

De lichamelijke ontwikkeling van de jongen wordt voornamelijk door de toename van het lichaamsgewicht geregistreerd. Andere lichamelijke parameters (zoals de oor- en oogopening, het doorkomen van tanden en de haargroei) kunnen aanvullende informatie opleveren, maar deze gegevens dienen bij voorkeur te worden beoordeeld in de context van gegevens over de geslachtelijke rijping (zoals leeftijd en lichaamsgewicht bij de opening van de vagina of de scheiding tussen eikel en voorhuid) (13). Functioneel onderzoek (bv. motorische activiteit, sensorische functie of reflex-ontogenie) bij de jongen van de F1-generatie voor en/of na het spenen, met name in verband met geslachtelijke rijping, wordt aanbevolen als dergelijk onderzoek niet in afzonderlijke studies is opgenomen. Bij gespeende jongen van de F1-generatie die voor dekking worden geselecteerd, wordt de leeftijd bij de opening van de vagina of de scheiding van de voorhuid bepaald. De anaal-genitale afstand wordt bij jongen van de F2-generatie op dag 0 na het werpen gemeten als dit in verband met wijzigingen in de verhouding mannetjes/vrouwtjes of het tijdstip van geslachtelijke rijping bij de F1-generatie wenselijk wordt geacht.

Functioneel onderzoek kan achterwege worden gelaten bij groepen met andere duidelijke tekenen van schadelijke effecten (zoals een significante daling van de gewichtstoename). Als functioneel onderzoek wordt uitgevoerd, moet dit niet gebeuren bij de jongen die voor dekking worden geselecteerd.

1.5.6. **Macroscopische obductie**

Alle ouderdieren (P- en F1-generatie), alle jongen met uiterlijke afwijkingen of klinische verschijnselen en één aselect gekozen jong/geslacht/nest van zowel de F1- als de F2-generatie worden, wanneer ze worden gedood of tijdens het onderzoek sterven, macroscopisch onderzocht op structurele afwijkingen of pathologische veranderingen. Daarbij wordt speciale aandacht besteed aan de organen van het reproductiesysteem. Jongen die op humane wijze zijn gedood omdat ze stervend waren en dode jongen (wanneer ze niet verweekt zijn) worden onderzocht op mogelijke gebreken en/of de doodsoorzaak en geconserveerd.

Bij alle vrouwtjes die voor het eerst een nest werpen wordt de uterus op een zodanige wijze onderzocht op de aanwezigheid van en het aantal implantatieplaatsen dat geen afbreuk wordt gedaan aan het histopathologische onderzoek.

1.5.7. **Gewicht van de organen**

Van alle ouderdieren van de P- en F1-generatie worden, wanneer ze worden gedood, het lichaamsgewicht en het gewicht van de volgende organen bepaald (organen die paarsgewijs voorkomen worden apart gewogen):

— de uterus en de eierstokken;

— de testes en de epididymes (totaal en staart);

— de prostaat;

— de zaadblaasjes met de coagulatieklieren en hun vloeistof en de prostaat (als één geheel);

— de hersenen, de lever, de nieren, de milt, de hypofyse, de schildklier, de bijnieren en bekende doelorganen.

Bij de jongen van de F1- en de F2-generatie die voor obductie zijn geselecteerd, wordt het uiteindelijke lichaamsgewicht bepaald en van één aselect gekozen jong/geslacht/nest (zie punt 1.5.6) worden de volgende organen gewogen: hersenen, milt en thymus.

▼B

De resultaten van de macroscopische obductie en het wegen van de organen worden indien mogelijk beoordeeld in de context van waarnemingen bij andere onderzoeken met herhaalde toediening.

1.5.8. **Histopathologie**

1.5.8.1. *Ouderdieren*

De volgende organen en weefsels van de ouderdieren (P- en F1-generatie) of representatieve monsters daarvan worden in een geschikt medium gefixeerd en bewaard voor histopathologisch onderzoek:

— de vagina, de uterus met de cervix en de eierstokken (geconserveerd in een geschikt fixatief);

— één testis (geconserveerd in Bouin's of een vergelijkbaar fixatief), één epididymis, de zaadblaasjes, de prostaat en de coagulatieklier;

— eerder gespecificeerde doelorganen uit alle dieren van de P- en de F1-generatie die voor dekking zijn geselecteerd.

Bij alle bovengenoemde geconserveerde organen en weefsels wordt voor alle P- en F1-dieren van de controlegroep en de groep met de hoogste dosis die voor dekking zijn geselecteerd, een volledig histopathologisch onderzoek uitgevoerd. Een onderzoek van de eierstokken van de P-dieren is facultatief. Organen waarin aan de behandeling gerelateerde wijzigingen worden aangetoond, worden ook in de groepen met een lagere dosis onderzocht om bij te dragen tot de bepaling van de NOAEL. Daarnaast worden de voortplantingsorganen van de dieren uit de groepen met een lagere dosis waarbij een verminderde vruchtbaarheid wordt vermoed, bijvoorbeeld degene die in gebreke zijn gebleven bij de dekking, de bevruchting of het werpen van gezonde jongen of waarvoor de periodiciteit van de oestrus of het aantal, de beweeglijkheid of de morfologie van de spermatozoën is aangetast, histopathologisch onderzocht. Alle macroscopische letsels zoals atrofie of tumoren worden onderzocht.

Er wordt uitgebreid histopathologisch onderzoek van de testis uitgevoerd (bv. met Bouin's fixatief, inbedding met paraffine en dwarscoupes met een dikte van 4-5 μm) om aan de behandeling gerelateerde effecten te signaleren, zoals achtergebleven spermatiden, ontbrekende kiemcellagen of -soorten, meerkernige reuzencellen of spermatogene cellen die in het lumen terechtkomen (14). Het onderzoek van de intacte epididymis omvat de kop, het lichaam en de staart en dit kan gebeuren door een lengtecoupe te onderzoeken. De epididymis wordt onderzocht op infiltratie van leukocyten, wijzigingen in het voorkomen van celtypen, afwijkende celtypen en fagocytose van spermatozoën. Voor het onderzoek van de mannelijke voortplantingsorganen kan kleuring met PAS en hematoxyline worden gebruikt.

De eierstok na de lactatieperiode moet primaire en groeiende follikels en de grote corpora lutea van de lactatie bevatten. Bij histopathologisch onderzoek moet een kwalitatieve depletie van de primaire follikelpopulatie worden waargenomen. Voor de F1-vrouwtjes wordt een kwantitatieve evaluatie van de primaire follikels uitgevoerd; het aantal dieren, de keuze van de coupe van de eierstok en de monstergrootte van de coupe moeten in statistisch opzicht adequaat zijn voor de gebruikte evaluatieprocedure. Bij het onderzoek wordt het aantal primaire follikels geteld en dit kan worden gecombineerd met het aantal kleine groeiende follikels om de behandelde en de controle-eierstokken te vergelijken (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2. *Gespeende dieren*

Macroscopisch abnormale weefsels en doelorganen van alle jongen met uitwendige afwijkingen of klinische verschijnselen en van het ene aselect gekozen jong/geslacht/nest uit zowel de F1- als de F2-generatie die niet voor dekking zijn geselecteerd, worden in een geschikt medium gefixeerd en bewaard voor histopathologisch onderzoek. Van de geconserveerde weefsels wordt een volledige histopathologische karakterisering uitgevoerd, waarbij de nadruk vooral ligt op de organen van het reproductiesysteem.

2. **GEGEVENS**

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens worden individueel gerapporteerd met een overzicht in tabelvorm, waarbij voor elke testgroep en elke generatie worden vermeld: het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of met het oog op een humane behandeling is gedood, het tijdstip van sterfte of humane doding, het aantal vruchtbare dieren, het aantal drachtige vrouwtjes, het aantal dieren met toxiciteitsverschijnselen, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen met vermelding van de aanvang, de duur en de ernst van de toxische effecten, de aard van de waarnemingen bij de ouderdieren en de jongen, de aard van de histopathologische veranderingen en alle relevante gegevens over de nesten.

De getalsmatige resultaten worden met een geschikte algemeen aanvaarde statistische methode geëvalueerd; de statistische methoden worden bij de opzet van het onderzoek gekozen en gemotiveerd. Statistische dosis/respons-modellen kunnen nuttig zijn voor de analyse van de gegevens. In het verslag wordt voldoende informatie over de analysemethode en het gebruikte computerprogramma vermeld, zodat een onafhankelijke evaluator/statisticus de analyse kan beoordelen en reconstrueren.

2.2. EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten van dit reproductietoxiciteitsonderzoek over twee generaties worden aan de hand van de waargenomen effecten, zoals de resultaten van de obductie en microscopisch onderzoek, beoordeeld. De beoordeling omvat het verband, of het ontbreken daarvan, tussen de dosis van de teststof en de aanwezigheid of afwezigheid, de frequentie en de ernst van abnormaliteiten zoals macroscopisch letsel, gespecificeerde doelorganen, verminderde vruchtbaarheid, klinische abnormaliteiten, aantasting van de reproductie- en nestresultaten, veranderingen in het lichaamsgewicht, effecten op de mortaliteit en andere toxische effecten. Bij de beoordeling van de testresultaten wordt rekening gehouden met de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof en, wanneer deze beschikbaar zijn, gegevens over de toxicokinetiek.

Een adequaat uitgevoerd reproductietoxiciteitsonderzoek levert een bevredigende raming van een dosis zonder effect op en een inzicht in schadelijke effecten op de reproductie, de geboorte, de lactatie en de postnatale ontwikkeling met inbegrip van de groei en de geslachtelijke ontwikkeling.

▼B

2.3. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Een reproductietoxiciteitsonderzoek over twee generaties levert informatie op over de effecten van herhaalde blootstelling aan een stof gedurende alle fasen van de reproductiecyclus. Het onderzoek levert met name informatie op over de reproductieparameters en over de ontwikkeling, de groei, de rijping en het overleven van de jongen. De resultaten van het onderzoek moeten in samenhang met de resultaten van het onderzoek naar subchronische en prenatale ontwikkelingstoxiciteit alsmede toxicokinetisch en ander beschikbaar onderzoek worden geïnterpreteerd. De resultaten van dit onderzoek kunnen worden gebruikt bij de evaluatie van de noodzaak om een chemische stof nader te onderzoeken. De resultaten van het onderzoek kunnen in beperkte mate naar de mens worden geëxtrapoleerd. Ze kunnen het best worden gebruikt voor informatie over de doses zonder effect en de toelaatbare blootstelling van de mens (20)(21)(22)(23).

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Teststof:

— de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens;

— de zuiverheid.

Medium (indien van toepassing):

— motivering voor de keuze van het medium, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren:

— gebruikte soort en stam;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, huisvesting, voeding, nestmateriaal enz.;

— het gewicht van elk dier aan het begin van de test.

Testomstandigheden:

— beweegredenen voor de keuze van de dosisniveaus;

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof c.q. de samenstelling van het voer en de concentratie;

— de stabiliteit en homogeniteit van het preparaat;

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;

— omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

▼B

Resultaten:

— de voerconsumptie en indien beschikbaar de waterconsumptie, het voerrendement (de toename van het lichaamsgewicht per gram geconsumeerd voer) en de consumptie van testmateriaal voor de P- en F1-dieren, behalve gedurende de periode dat ze samen in één hok zitten en gedurende ten minste het laatste derde deel van de lactatie;

— resorptiegegevens (indien beschikbaar);

— gegevens over het lichaamsgewicht voor de P- en F1-dieren die voor dekking zijn geselecteerd;

— gegevens over het gewicht van het nest en de jongen;

— het lichaamsgewicht bij het doden van de dieren en gegevens over het absolute en relatieve gewicht van organen voor de ouderdieren;

— de aard, de ernst en de duur van (al dan niet reversibele) klinische waarnemingen;

— de sterftijd van dieren die tijdens het onderzoek gestorven zijn;

— gegevens over de toxische reacties per geslacht en dosis, met inbegrip van indexen voor de dekking, de vruchtbaarheid, de dracht, de geboorte, de levensvatbaarheid en de lactatie; in het verslag worden ook de getallen vermeld die bij de berekening van deze indexen zijn gebruikt;

— toxische of andere effecten op de reproductie, de jongen, de postnatale groei enz.;

— de obductiebevindingen;

— een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;

— het aantal P- en F1-vrouwtjes met een normale cyclus en de lengte van de cyclus;

— het totale aantal spermatozoën in de staart van de epididymis, het percentage spermatozoën in oplopende beweeglijkheidscategorieën, het percentage morfologisch normale spermatozoën en het percentage spermatozoën met elke gespecificeerde abnormaliteit;

— de tijd tot dekking, met inbegrip van het aantal dagen tot de dekking;

— de duur van de dracht;

— het aantal implantaties, het aantal corpora lutea en de nestgrootte;

— het aantal levend geboren jongen en verliezen na implantatie;

— het aantal jongen met macroscopisch zichtbare abnormaliteiten; indien dit is bepaald, wordt het aantal ondermaatse jongen gerapporteerd;

— gegevens over ijkpunten in de lichamelijke ontwikkeling van de jongen en andere gegevens over de postnatale ontwikkeling: voor de geëvalueerde ijkpunten dient een motivering te worden gegeven;

— gegevens over functionele observaties bij jongen en volwassen dieren, indien van toepassing;

— een statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

▼B

Bespreking van de resultaten.

Conclusies, met inbegrip van de NOAEL-waarden voor de effecten op de moederdieren en de jongen.

4. **REFERENTIES**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals*: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al. (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al. (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction 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. and Perreault, S.D. (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thom Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and 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* 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al. (1989). Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and CA. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOXICOKINETIEK**

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 417 (2010) van de OESO (TG 417). De toxicokinetiek van een teststof wordt onderzocht om afdoende informatie te verkrijgen over de absorptie, de distributie, de biotransformatie (d.w.z. metabolisme) en de uitscheiding. Met behulp van deze informatie kan de concentratie of dosering aan de waargenomen toxiciteit worden gerelateerd en het toxiciteitsmechanisme worden doorgrond. Door aan te tonen dat de proefdieren stelselmatig aan de teststof worden blootgesteld en de circulerende bestanddelen te onthullen (oorspronkelijke stof/metabolieten) kan de toxicokinetiek bijdragen tot een beter begrip van toxicologisch onderzoek. De voornaamste voor dit onderzoek te bepalen toxicokinetische parameters verschaffen tevens informatie over de mogelijkheid van accumulatie van de teststof in weefsels en/of organen en de mogelijkheid van inductie van biotransformatie als gevolg van de blootstelling aan de teststof.

2. Toxicokinetische gegevens kunnen helpen te beoordelen in hoeverre de gegevens over de toxiciteit bij dieren geschikt en relevant zijn om te worden geëxtrapoleerd voor gebruik bij de afweging van de gevaren/risico's voor de mens. Daarnaast bewijst toxicokinetisch onderzoek goede diensten bij het bepalen van de dosisniveaus voor toxiciteitsonderzoek (lineaire tegenover niet-lineaire kinetiek), de effecten van de toedieningsweg, de biologische beschikbaarheid en de onderzoeksopzet. Bepaalde soorten toxicokinetische gegevens kunnen worden gebruikt bij het opstellen van fysiologische toxicokinetische modellen (PBTK).

3. Daarnaast kunnen gegevens over metabolieten/toxicokinetiek worden gebruikt voor het voorspellen van mogelijke toxische effecten en werkingswijzen, en het verband met dosisniveaus en blootstellingsroute. Verder kunnen gegevens over het metabolisme nuttige informatie verschaffen met het oog op de beoordeling van het toxicologisch belang van blootstellingen aan exogeen gevormde metabolieten van de teststof.

4. Adequate toxicokinetische gegevens kunnen worden gebruikt om de aanvaardbaarheid en toepasselijkheid van kwantitatieve structuur-activiteitsrelaties en „read-across"- of groeperingsbenaderingen voor de beoordeling van de veiligheid van chemische stoffen te versterken. Kinetische gegevens kunnen ook worden gebruikt om de toxicologische relevantie van ander onderzoek (bv. in vivo/in vitro) te beoordelen.

5. Tenzij een andere toedieningsweg wordt vermeld (zie met name de punten 74-78), is deze testmethode toepasbaar op de orale toediening van de teststof.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

6. Afhankelijk van het regelgevingssysteem gelden er verschillende voorschriften en eisen met betrekking tot het meten van eindpunten en parameters die verband houden met de toxicokinetiek voor verschillende categorieën chemische stoffen (bv. bestrijdingsmiddelen, biociden, industriële chemische stoffen). Anders dan bij de meeste andere testmethoden worden in deze testmethode toxicokinetische tests beschreven, waarbij van meerdere metingen en eindpunten gebruik wordt gemaakt. Het is mogelijk dat er in de toekomst nieuwe testmethoden en/of leidraden worden ontwikkeld om de afzonderlijke eindpunten nader te beschrijven. Welke tests of beoordelingen in het kader van deze testmethode worden uitgevoerd, is afhankelijk van de voorschriften en/of eisen van het desbetreffende regelgevingssysteem.

▼M4

7. Er kunnen tal van studies worden uitgevoerd om het toxicokinetische gedrag van een bepaalde teststof voor regelgevingsdoeleinden te evalueren. Het is echter mogelijk dat, afhankelijk van de specifieke regelgevingsbehoeften of -situaties, niet al deze mogelijke studies noodzakelijk zijn om een teststof te evalueren. Bij het opzetten van toxicokinetisch onderzoek moet op flexibele wijze rekening worden gehouden met de kenmerken van de onderzochte teststof. In sommige gevallen is het mogelijk dat slechts een bepaalde reeks vragen hoeft te worden onderzocht in verband met de gevaren en risico's van de teststof. In andere gevallen kunnen toxicokinetische gegevens worden verzameld als onderdeel van de evaluatie in het kader van ander toxicologisch onderzoek. In weer andere gevallen kunnen aanvullend en/of uitgebreider toxicologisch onderzoek noodzakelijk zijn, afhankelijk van de regelgevingsbehoeften en/of eventuele nieuwe vragen die rijzen tijdens de evaluatie van de chemische stof.

8. Het testlaboratorium moet alle beschikbare informatie over de teststof, relevante metabolieten en analogen in overweging nemen voordat het onderzoek wordt uitgevoerd. Dit komt de kwaliteit van het onderzoek ten goede en zorgt ervoor dat het onnodig gebruik van dieren wordt vermeden. Deze informatie omvat ook gegevens van andere relevante testmethoden (onderzoek in vivo of in vitro en/of evaluaties in silico). Fysisch-chemische eigenschappen, zoals de partitiecoëfficiënt octanol/water (uitgedrukt als log P_{OW}), pKa, de oplosbaarheid in water, de dampdruk en het molecuulgewicht van een chemische stof, kunnen goede diensten bewijzen bij het plannen van het onderzoek en het interpreteren van de resultaten. Deze eigenschappen kunnen worden bepaald aan de hand van de methoden die in de relevante testmethoden worden beschreven.

BEPERKINGEN

9. Deze testmethode is niet bedoeld voor bijzondere gevallen, zoals drachtige of zogende dieren en hun nakomelingen, of ter evaluatie van mogelijke residuen in voedselproducerende dieren die aan de teststof worden blootgesteld. De gegevens die met een onderzoek volgens B.36 zijn verkregen, kunnen echter achtergrondinformatie verschaffen die van pas komt bij het opzetten van specifiek onderzoek op dit terrein. Deze testmethode is niet bedoeld voor het testen van nanomaterialen. Uit een verslag van de voorlopige evaluatie van de toepasbaarheid van de OESO-richtlijnen voor onderzoek op nanomaterialen blijkt dat TG 417 (gelijkwaardig aan deze testmethode B.36) mogelijk niet op nanomaterialen van toepassing is (1).

DEFINITIES

10. De in deze testmethode gebruikte definities worden gegeven in het aanhangsel.

OVERWEGINGEN INZAKE DIERENWELZIJN

11. Aanwijzingen voor de humane behandeling van dieren zijn opgenomen in OESO-leidraad nr. 19 (2). Het verdient aanbeveling OESO-richtsnoer nr. 19 te raadplegen bij alle studies in vivo en in vitro dat in deze testmethode wordt beschreven.

BESCHRIJVING VAN DE METHODEN

Verkennend onderzoek

12. Het gebruik van verkennend onderzoek voor het kiezen van de onderzoeksparameters voor toxicokinetisch onderzoek (bv. metabolisme, massabalans, analytische procedures, bepalen van de dosering, uitademing van CO_2 enz.) wordt aanbevolen en aangemoedigd. Het is mogelijk dat het voor de karakterisering van sommige van deze parameters niet noodzakelijk is radioactief gemerkte stoffen te gebruiken.

▼M4

Keuze van de dieren

Soort

13. De diersoort (en de stam) die voor toxicokinetische tests wordt gebruikt, moet bij voorkeur gelijk zijn aan de diersoort die is gebruikt bij ander toxicologisch onderzoek van de onderzochte teststof. Normaal gesproken moeten ratten worden gebruikt, aangezien deze op grote schaal worden ingezet bij toxicologisch onderzoek. Het gebruik van andere of aanvullende soorten kan gerechtvaardigd zijn als fundamenteel toxicologisch onderzoek significante toxiciteit bij deze soorten aantoont of als wordt aangetoond dat de toxiciteit/toxicokinetiek voor de mens relevanter is. Als een andere soort wordt gekozen, dient hiervoor een motivering te worden gegeven.

14. Tenzij anders vermeld, worden bij deze testmethode ratten gebruikt als proefdiersoort. Het is mogelijk dat de testmethode op bepaalde punten moet worden aangepast als er andere proefdiersoorten worden gebruikt.

Leeftijd en stam

15. Er moeten gezonde, jong-volwassen dieren (normaal gesproken zes-twaalf weken oud ten tijde van de toediening van de doses) worden gebruikt (zie ook de punten 13 en 14). Als er dieren uit een andere leeftijdscategorie worden gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven. Alle dieren moeten bij aanvang van het onderzoek ongeveer even oud zijn. Het gewicht van de afzonderlijke dieren mag niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht van de testgroep afwijken. In het ideale geval moet de gebruikte stam gelijk zijn aan die welke is gebruikt voor het samenstellen van de toxicologische databank voor de teststof.

Aantal en geslacht van de dieren

16. Per geteste dosis moeten minimaal vier dieren van hetzelfde geslacht worden gebruikt. Het gebruikte geslacht dient te worden gemotiveerd. Als er voldoende aanwijzingen zijn om aan te nemen dat er significante verschillen in toxiciteit zijn die samenhangen met het geslacht, moet het gebruik van beide geslachten (vier mannetjes en vier vrouwtjes) worden overwogen.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

17. In het algemeen moeten de dieren tijdens de onderzoeksperiode in aparte kooien worden gehuisvest. In bijzondere omstandigheden kan huisvesting in groepen gerechtvaardigd zijn. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. De temperatuur van de proefdierruimte moet 22 °C (± 3 °C) en de relatieve vochtigheid 30-70 % bedragen. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

Teststof

18. Een met ^{14}C radioactief gemerkte teststof moet worden gebruikt bij het bepalen van de massabalans en het identificeren van metabolieten, tenzij kan worden aangetoond dat:

— de massabalans en de metabolieten afdoende kunnen worden geëvalueerd met de niet-radioactief gemerkte teststof;

— de analytische specificiteit en gevoeligheid van de methode waarbij gebruikgemaakt wordt van de niet-radioactief gemerkte teststof gelijk zijn aan of groter zijn dan die welke kunnen worden verkregen met de radioactief gemerkte teststof.

▼M4

In dat geval hoeft er geen radioactief gemerkte teststof te worden gebruikt. Daarnaast kunnen andere radioactieve en stabiele isotopen worden gebruikt, met name als het element verantwoordelijk is voor of onderdeel is van het toxische bestanddeel van de teststof. Indien mogelijk moet het radioactief gemerkte materiaal zich in een metabolisch stabiel gedeelte van het hoofdmolecuul (het neemt niet deel aan het metabolisme, wordt niet via de stofwisseling uitgescheiden als CO_2 en wordt geen onderdeel van het koolstofreservoir van het organisme) bevinden. Markering van meerdere locaties of gebieden van het molecuul kan noodzakelijk zijn om de rol van de teststof in de stofwisseling te volgen.

19. De zuiverheid en de identiteit van de al dan niet radioactief gemerkte teststoffen moeten met geschikte methoden worden geanalyseerd. De radiologische zuiverheid van de radioactieve teststof moet van het hoogst bereikbare niveau zijn voor de specifieke teststof (in het ideale geval hoger dan 95 %) en er moeten redelijke inspanningen worden gedaan om onzuiverheden groter dan of gelijk aan 2 % op te sporen. De zuiverheid, de identiteit en het aandeel van eventuele geconstateerde onzuiverheden moeten worden vermeld. Het is mogelijk dat specifieke regelgevingsprogramma's aanvullende aanwijzingen verstrekken met betrekking tot de definitie en specificaties van uit mengsels bestaande teststoffen en methoden om de zuiverheid ervan te bepalen.

Keuze van de dosis

Verkennend onderzoek

20. Voor het verkennend onderzoek volstaat gewoonlijk één orale dosis. Deze dosis moet niet-toxisch zijn, maar hoog genoeg opdat de metabolieten in excreta (en plasma, indien van toepassing) kunnen worden geïdentificeerd en voldoen aan de aangegeven doelstelling van het verkennend onderzoek, zoals wordt vermeld in punt 12 van deze testmethode.

Hoofdonderzoek

21. Voor het hoofdonderzoek wordt de voorkeur gegeven aan minimaal twee doses aangezien de informatie van ten minste twee dosisgroepen kan helpen bij het bepalen van de dosering voor ander toxiciteitsonderzoek en bij de dosis-responsbepaling van bestaand toxiciteitsonderzoek.

22. Als twee doses worden toegediend, moeten beide doses hoog genoeg zijn opdat de metabolieten in excreta (en plasma, indien van toepassing) kunnen worden geïdentificeerd. Bij de keuze van de dosis moet rekening worden gehouden met informatie op basis van beschikbare toxiciteitsgegevens. Als dergelijke informatie niet beschikbaar is (bv. op basis van onderzoek naar acute orale toxiciteit waarbij klinische toxiciteitsverschijnselen zijn opgetekend, of op basis van toxiciteitsonderzoek met herhaalde toediening), kan voor de hoogste dosis een waarde worden overwogen die lager is dan de geschatte LD_{50}-waarde (oraal en dermaal) of LC_{50}-waarde (inhalatie), of die lager is dan de laagste waarde van het geschatte acute toxiciteitsbereik. De laagste dosis moet een fractie van de hoogste dosis zijn.

23. Als een bepaald dosisniveau wordt onderzocht, dient de dosis idealiter hoog genoeg te zijn zodat de metabolieten in excreta (en plasma, indien van toepassing) kunnen worden geïdentificeerd, zonder dat dit tot klaarblijkelijke toxiciteit leidt. Als er geen tweede dosisniveau is opgenomen, moet dat worden gemotiveerd.

24. Het is mogelijk dat twee doses niet voldoende zijn voor het bepalen van het effect van de dosis op kinetische processen. Ten minste een van de doses moet voldoende hoog zijn om deze processen te verzadigen. Als de oppervlakte onder de plasmaconcentratie-tijdcurve (area under the curve, AUC) tussen de twee in het hoofdonderzoek gebruikte dosisniveaus niet lineair is, vormt dit een duidelijke aanwijzing dat ergens tussen de twee dosisniveaus verzadiging optreedt van één of meer kinetische processen.

▼M4

25. Voor teststoffen met lage toxiciteit moet een maximale dosis van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht (oraal en dermaal) worden toegediend (zie hoofdstuk B.2 van deze bijlage voor aanwijzingen betreffende toediening door middel van inhalatie; deze dosis is doorgaans niet hoger dan 2 mg/l). Afhankelijk van de chemische stof en de regelgevingsbehoeften kan het noodzakelijk zijn een hogere dosis te gebruiken. De keuze van de dosis moet altijd worden gemotiveerd.

26. Toxicokinetische gegevens over de eenmalige toediening en gegevens over de weefseldistributie afkomstig van onderzoek met eenmalige toediening kunnen volstaan voor het bepalen van de mogelijkheid van accumulatie en/of persistentie. In bepaalde gevallen kan herhaalde toediening van de dosis echter noodzakelijk zijn i) om een vollediger beeld te krijgen van de mogelijkheid van accumulatie en/of persistentie of veranderingen in de toxicokinetiek (zoals bijvoorbeeld inductie en inhibitie van enzymen), of ii) om te voldoen aan de voorschriften van het desbetreffende regelgevingssysteem. Bij onderzoek met herhaalde toediening zal herhaalde toediening van een lage dosis meestal volstaan, maar in bepaalde omstandigheden kan eveneens herhaalde toediening van een hoge dosis noodzakelijk zijn (zie ook punt 57).

Toediening van de teststof

27. De teststof moet zijn opgelost of homogeen zijn gesuspendeerd in hetzelfde medium dat is gebruikt voor het andere toxiciteitsonderzoek met maagsonde dat met de teststof is verricht, als informatie daarover beschikbaar is. De keuze van het medium moet worden gemotiveerd. Bij de opzet van het onderzoek moet aandacht worden besteed aan de keuze van het medium en het doseringsvolume. Gewoonlijk wordt de teststof toegediend via een maagsonde; toediening via gelatinecapsules of vermengd met het voer kan in bepaalde gevallen de voorkeur verdienen (in beide gevallen moet een motivering worden gegeven). De aan elk dier werkelijk toegediende dosis dient te worden geverifieerd.

28. Het maximale vloeistofvolume dat tegelijkertijd via een orale maagsonde moet worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van de proefdieren, het soort toedieningsmedium en de vraag of de proefdieren nuchter zijn voordat de teststof wordt toegediend. Het verstrekken of beperken van het voedsel voor toediening van de dosis moet worden gemotiveerd. Normaal gesproken moet het volume van zowel waterige als niet-waterige media zo laag mogelijk worden gehouden. De dosisvolumes bij knaagdieren mogen 10 ml/kg lichaamsgewicht normaal gezien niet overschrijden. Voor meer lipofiele teststoffen worden mediavolumes vanaf 4 ml/kg lichaamsgewicht gebruikt. Voor herhaalde dosering, waarbij dagelijks vasten is gecontra-indiceerd, moeten lagere dosisvolumes (bijvoorbeeld 2-4 ml/kg lichaamsgewicht) worden overwogen. Indien mogelijk kan het gebruik van een dosisvolume worden overwogen dat consistent is met het volume dat is toegediend bij ander onderzoek met orale maagsonde dat voor een teststof is verricht.

29. Aan de hand van intraveneuze toediening van de teststof en meting van de teststof in het bloed en/of de excreta kan de biologische beschikbaarheid of de relatieve orale absorptie worden vastgesteld. Bij intraveneus onderzoek wordt een eenmalige dosis (gewoonlijk gelijkwaardig aan maar niet hoger dan de laagste orale dosis; zie de informatie over de keuze van de dosis) van de teststof toegediend met een geschikt medium. Dit materiaal moet in een passende hoeveelheid (bijvoorbeeld 1 ml/kg lichaamsgewicht) via de gekozen locatie worden toegediend aan ten minste vier dieren van het juiste geslacht (mits gerechtvaardigd mogen beide geslachten worden gebruikt; zie punt 16). Bij intraveneuze toediening van de teststof moet een volledig opgelost of gesuspendeerd dosispreparaat worden gebruikt. Het medium voor intraveneuze toediening mag de integriteit of de doorstroming van het bloed niet verstoren. Als de teststof via een infuus wordt toegediend, moet de infusiesnelheid worden vermeld en tussen de dieren worden gestandaardiseerd, mits een infuuspomp wordt gebruikt. Er moet een verdovingsmiddel worden gebruikt als de halsader wordt gecanuleerd (voor

▼M4

toediening van de teststof en/of aftapping van bloed) of als de dijbeenslagader wordt gebruikt voor de toediening. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan het soort verdoving dat wordt toegepast, aangezien dit de toxicokinetiek kan beïnvloeden. De dieren moeten in de gelegenheid worden gesteld zich voldoende te herstellen voordat de teststof en het medium worden toegediend.

30. Ook andere toedieningswegen, zoals de dermale of de inhalatieweg (zie de punten 74-78), kunnen worden toegepast bij bepaalde teststoffen, afhankelijk van hun fysisch-chemische eigenschappen en het verwachte gebruik of de verwachte blootstelling bij de mens.

Metingen

Massabalans

31. De massabalans wordt bepaald door het percentage toegediende (radioactieve) dosis dat via de urine, de feces en de uitgeademde lucht is uitgescheiden op te tellen bij het percentage dat in de weefsels, het resterende karkas en de wasvloeistof van de kooi aanwezig is (zie punt 46). In het algemeen wordt een totale recovery van de toegediende teststof (radioactiviteit) van ca. > 90 % als afdoende beschouwd.

Absorptie

32. Een eerste schatting van de absorptie kan worden verkregen door het percentage van de dosis in het maag-darmkanaal en/of de feces uit te sluiten bij het bepalen van de massabalans. Zie punt 33 voor informatie over het berekenen van het absorptiepercentage. Zie de punten 44-49 voor informatie over het onderzoeken van de excreta. Als de exacte mate van absorptie na orale toediening van de dosis niet kan worden vastgesteld op basis van massabalansonderzoek (bv. wanneer meer dan 20 % van de toegediende dosis aanwezig is in de feces), kan nader onderzoek noodzakelijk zijn. Dit onderzoek moet hetzij 1) de orale toediening van de teststof en de meting van de teststof in de gal, hetzij 2) de orale en intraveneuze toediening van de teststof en de meting van de nettohoeveelheid teststof die aanwezig is in de urine plus de uitgeademde lucht plus het karkas voor elk van beide toedieningswegen, omvatten. Welke van beide onderzoeksopzetten ook wordt gekozen, de meting van de radioactiviteit wordt verricht als surrogaatmethode voor de stofspecifieke analyse van de teststof plus metabolieten.

33. Als de galexcretie wordt onderzocht, wordt gewoonlijk de orale toedieningsweg gebruikt. Bij dit onderzoek worden de galwegen van ten minste vier dieren van het juiste geslacht (of beide geslachten, indien gerechtvaardigd) gecanuleerd en wordt een eenmalige dosis van de teststof toegediend. Na toediening van de teststof wordt de galexcretie gecontroleerd op radioactiviteit/teststof zolang dit noodzakelijk is om een schatting te kunnen maken van het percentage toegediende dosis dat via deze weg wordt uitgescheiden. Op basis hiervan kan rechtstreeks de mate van orale absorptie worden berekend:

$$\text{absorptiepercentage} = \begin{array}{l}(\text{hoeveelheid in gal} + \text{urine} + \text{uitgeademde lucht} + \\ \text{karkas exclusief de inhoud van het maag} - \text{darmkanaal})/ \\ \text{toegediende hoeveelheid} \times 100\end{array}$$

34. Bij sommige categorieën chemische stoffen kan rechtstreekse uitscheiding van de geabsorbeerde dosis plaatsvinden via de intestinale membranen. In dergelijke gevallen wordt meting van het percentage dosis in de feces na orale toediening aan ratten met gecanuleerde galwegen niet geacht representatief te zijn voor de niet-geabsorbeerde dosis. Als intestinale secretie wordt vermoed, is het raadzaam om het percentage geabsorbeerde dosis te baseren op de absorptie die is berekend op basis van een vergelijking van de uitscheiding na de orale toediening en de intraveneuze toediening (intacte ratten of ratten met gecanuleerde galwegen) (zie punt 35). Als kwantificering van de intestinale secretie noodzakelijk wordt geacht, is het daarnaast raadzaam om de uitscheiding bij ratten met gecanuleerde galwegen te meten na intraveneuze toediening van de dosis.

▼M4

Biologische beschikbaarheid

35. De biologische beschikbaarheid kan worden bepaald op basis van de kinetiek in het plasma/bloed van de orale en intraveneuze groepen, zoals beschreven in de punten 50-52, door middel van een specifieke chemische analyse van de teststof en/of relevante metabolieten; hiervoor is derhalve geen radioactief gemerkte teststof vereist. De biologische beschikbaarheid (F) van de teststof of relevante metabolieten kan dan als volgt worden berekend:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (dosis_{IV}/dosis_{exp})$$

Hierbij is AUC de oppervlakte onder de plasmaconcentratie-tijdcurve en exp de toedieningsweg (oraal, dermaal of via inhalatie).

36. Met het oog op de risicobeoordeling van systemische effecten wordt in het algemeen de voorkeur gegeven aan de biologische beschikbaarheid van het toxische bestanddeel boven het absorptiepercentage voor het vergelijken van systemische concentraties die zijn vastgesteld in het kader van onderzoek bij dieren met gelijkwaardige biomonitoringgegevens die afkomstig zijn van blootstellingsonderzoek onder werknemers. De complexiteit kan toenemen als de doses in het niet-lineaire bereik liggen. Het is daarom belangrijk dat bij de toxicokinetische screening de doses in het lineaire bereik worden bepaald.

Weefseldistributie

37. Kennis van de weefseldistributie van een teststof en/of de metabolieten ervan is van belang voor de identificatie van doelweefsels en een beter begrip van het onderliggende toxiciteitsmechanisme, alsook voor het verkrijgen van informatie over de mogelijkheid van accumulatie en persistentie van teststof en metabolieten. Het percentage totale (radioactieve) dosis in de weefsels en het resterende karkas moet ten minste worden gemeten bij beëindiging van het uitscheidingsexperiment (gewoonlijk zeven dagen of minder na toediening van de dosis, afhankelijk van het gedrag van de specifieke teststof). Als er bij beëindiging van het onderzoek geen teststof wordt gevonden in weefsels (bv. omdat de teststof vanwege zijn korte halveringstijd vóór de beëindiging van het onderzoek is verdwenen), moet erop worden gelet dat de gegevens niet verkeerd worden geïnterpreteerd. In dergelijke gevallen moet de weefseldistributie worden onderzocht ten tijde van de piekconcentratie van de teststof (en/of metabolieten) in het plasma/bloed (T_{max}) of de hoogste uitscheiding via de urine, naargelang hetgeen van toepassing is (zie punt 38). Daarnaast kan het noodzakelijk zijn vaker weefsels te verzamelen om de weefseldistributie van de teststof en/of de metabolieten ervan te bepalen, zodat de tijdafhankelijkheid kan worden geëvalueerd (indien van toepassing) en de massabalans kan worden bepaald, indien een bevoegde autoriteit dat verlangt. De weefsels die moeten worden verzameld, omvatten lever, vet, maag-darmkanaal, nier, milt, volledig bloed, resterend karkas, weefsels van doelorganen en andere weefsels, bijvoorbeeld schildklier, erytrocyten, voortplantingsorganen, huid, oog (met name bij gepigmenteerde dieren) die mogelijk van belang zijn voor de toxicologische evaluatie van de teststof. Er moet worden overwogen aanvullende weefsels op dezelfde tijdstippen te analyseren om de dieren zo doelmatig mogelijk te gebruiken en indien bij onderzoek naar de subchronische en/of chronische toxiciteit doelorgaantoxiciteit wordt waargenomen. Ook de concentratie van (radioactieve) residuen en de verhouding weefsel/plasma (bloed) moeten worden vermeld.

38. Het is mogelijk dat ook de weefseldistributie op aanvullende tijdstippen, zoals ten tijde van de piekconcentratie in het plasma/bloed (bijvoorbeeld T_{max}) of de hoogste uitscheiding via de urine, die zijn verkregen op basis van het desbetreffende onderzoek naar de kinetiek in het plasma/bloed of de uitscheiding, moet worden geëvalueerd of dat dit door een bevoegde autoriteit wordt verlangd. Deze informatie kan nuttig zijn om een beter begrip te krijgen van de toxiciteit en de mogelijkheid van accumulatie en persistentie van de teststof en metabolieten. De keuze van de monsters moet worden gemotiveerd; de monsters voor de analyse moeten in het algemeen gelijk zijn aan die welke hierboven worden vermeld (zie punt 37).

▼M4

39. Bij onderzoek naar de weefseldistributie kan radioactiviteit worden gekwantificeerd door middel van sectie op de organen, homogenisering, verbranding en/of solubilisatie, gevolgd door een vloeistofscintillatietelling van de ingesloten residuen. Bepaalde technieken die momenteel worden ontwikkeld, zoals Quantitative whole-body autoradiography en receptor microscopic autoradiography, kunnen nuttig zijn bij het bepalen van de verdeling van een teststof over de organen en/of weefsels (3)(4).

40. Voor andere blootstellingsroutes dan de orale moeten specifieke weefsels worden verzameld en geanalyseerd, zoals de longen bij inhalatieonderzoek en de huid bij dermaal onderzoek. Zie hiervoor de punten 74-78.

Metabolisme

41. Excreta (en plasma, indien van toepassing) moeten worden verzameld ter identificatie en kwantificering van de onveranderde teststof en metabolieten, zoals beschreven in de punten 44-49. Samenvoeging van de excreta is aanvaardbaar ter vereenvoudiging van de identificatie van metabolieten binnen een specifieke dosisgroep. Profilering van de metabolieten uit elke periode wordt aanbevolen. Als dit vanwege een gebrek aan monsters en/of radioactiviteit niet mogelijk is, is het samenvoegen van op diverse tijdstippen verzamelde urine en feces aanvaardbaar, maar het samenvoegen daarvan voor de geslachten of doses is niet aanvaardbaar. Er moeten passende kwalitatieve en kwantitatieve methoden worden toegepast om urine, feces, door de behandelde dieren uitgeademde radioactiviteit en gal, indien van toepassing, te analyseren.

42. Er moeten redelijke inspanningen worden gedaan om alle metabolieten te identificeren die 5 % of meer van de toegediende dosis uitmaken en een metabolismeschema op te stellen voor de teststof. Teststoffen waarvan de aanwezigheid in de excreta in concentraties van 5 % of hoger van de toegediende dosis is vastgesteld, moeten worden geïdentificeerd. Hiermee wordt bedoeld dat de exacte structuur van de bestanddelen moet worden bepaald. Doorgaans wordt de identiteit van de stoffen bepaald door middel van co-chromatografie van de metaboliet aan de hand van bekende normen met behulp van twee ongelijke systemen of technieken die een positieve identificatie van de structuur mogelijk maken, zoals massaspectrometrie, kernspinresonantie (nuclear magnetic resonance, NMR) enz. In geval van co-chromatografie worden chromatografische technieken waarbij dezelfde stationaire fase wordt gebruikt met twee verschillende oplossingssystemen niet geacht een adequate verificatie van de identiteit van de metaboliet met behulp van twee methoden op te leveren, aangezien de toegepaste methoden niet onafhankelijk van elkaar zijn. Voor de identificatie met behulp van co-chromatografie moeten twee ongelijke, onafhankelijke analysesystemen worden gebruikt, zoals dunnelaagchromatografie (thin layer chromatography, TLC) met omgekeerde en normale fase en hogedrukvloeistofchromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC). Mits de chromatografische scheiding van voldoende hoge kwaliteit is, is aanvullende bevestiging door middel van spectroscopie niet noodzakelijk. Als alternatief kan ondubbelzinnige identificatie worden verkregen met behulp van methoden die informatie over de structuur bieden zoals: vloeistofchromatografie/massaspectrometrie (LC-MS), of vloeistofchromatografie/tandemmassaspectrometrie (LC-MS/MS), gaschromatografie/massaspectrometrie (GC-MS) en NMR-spectrometrie.

43. Als het niet mogelijk is metabolieten met 5 % of hoger van de toegediende dosis te identificeren, moet een rechtvaardiging/toelichting in het eindverslag worden opgenomen. Het kan passend zijn om metabolieten die minder dan 5 % van de toegediende dosis vertegenwoordigen te identificeren om een beter begrip te verwerven van de metabole route met het oog op de beoordeling van de gevaren en/of risico's die aan de teststof kleven. Zo mogelijk moet de structuur worden bevestigd. Hiertoe kan een metabool profiel in het plasma, bloed of andere weefsels worden opgesteld.

▼M4

Uitscheiding

44. De snelheid en omvang van de uitscheiding van de toegediende dosis moeten worden bepaald door het percentage (radioactieve) dosis te meten dat is teruggevonden in urine, feces en uitgeademde lucht. Aan de hand van deze gegevens kan tevens de massabalans worden bepaald. De in de urine, feces en uitgeademde lucht verwijderde hoeveelheden van de teststof (radioactiviteit) moeten met de juiste tussenpozen worden bepaald (zie de punten 47-49). Experimenten met herhaalde toediening moeten zodanig worden opgezet dat het mogelijk is uitscheidingsgevens te verzamelen overeenkomstig de doelstellingen die in punt 26 worden beschreven. Op die manier kunnen experimenten met eenmalige toediening met elkaar worden vergeleken.

45. Als uit verkennend onderzoek is gebleken dat er geen significante hoeveelheid van de teststof (radioactiviteit) (overeenkomstig punt 49) in de uitgeademde lucht wordt uitgescheiden, hoeft de uitgeademde lucht in het definitieve onderzoek niet te worden verzameld.

46. Elk dier wordt in een aparte behuizing geplaatst zodat de excreta (urine, feces en uitgeademde lucht) kunnen worden verzameld. Aan het einde van elke verzamelperiode (zie de punten 47-49) worden deze metabole eenheden gereinigd met een geschikt oplosmiddel (het „uitwassen") om ervoor te zorgen dat zo veel mogelijk teststof (radioactiviteit) wordt teruggevonden. Het verzamelen van excreta moet worden beëindigd na zeven dagen of, indien dit eerder plaatsvindt, nadat 90 % van de toegediende dosis is teruggevonden.

47. De totale hoeveelheden van de teststof (radioactiviteit) in de urine dienen op ten minste twee tijdstippen op dag 1 van de verzameling te worden bepaald, eenmaal 24 uur na toediening van de dosis en daarna dagelijks totdat het onderzoek wordt beëindigd. Het wordt aangeraden op dag 1 meer dan twee bemonsteringstijdstippen (bv. om 6, 12 en 24 uur) te kiezen. De resultaten van verkenned onderzoek moeten worden geanalyseerd om informatie te verkrijgen over alternatieve of aanvullende bemonsteringstijdstippen. Wanneer een ander bemonsteringsschema wordt gebruikt, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

48. De totale hoeveelheden van de teststof (radioactiviteit) in feces dienen dagelijks te worden bepaald, vanaf 24 uur na toediening van de dosis totdat het onderzoek wordt beëindigd, tenzij op grond van modelonderzoek alternatieve of aanvullende bemonsteringstijdstippen worden aangeraden. Wanneer een ander bemonsteringsschema wordt toegepast, moet dit worden gemotiveerd.

49. Het verzamelen van uitgeademd CO_2 en andere vluchtige stoffen tijdens een onderzoeksexperiment kan worden gestaakt wanneer in de uitgeademde lucht minder dan 1 % van de toegediende dosis wordt gevonden in de loop van een bemonsteringsperiode van 24 uur.

Onderzoek naar het tijdsverloop

Kinetiek in plasma/bloed

50. Dit onderzoek heeft tot doel schattingen te verkrijgen van toxicokinetische basisparameters (bijvoorbeeld C_{max}, T_{max}, halveringstijd ($t_{1/2}$), AUC) voor de teststof. Dergelijk onderzoek kan worden verricht met één dosis of, bij voorkeur, met twee of meer doses. De dosering wordt bepaald door de aard van het experiment en/of het onderzochte vraagstuk. Om antwoord te geven op vraagstukken over bijvoorbeeld de biologische beschikbaarheid van de teststof en/of het effect van de dosis op de zuivering door de nieren (bv. om te verduidelijken of afhankelijk van de dosering verzadiging van de zuivering optreedt) kunnen kinetische gegevens noodzakelijk zijn.

51. Voor dergelijk onderzoek moeten per dosisgroep ten minste vier dieren van hetzelfde geslacht worden gebruikt. Het gebruikte geslacht dient te worden gemotiveerd. Als er voldoende aanwijzingen zijn om aan te nemen dat er significante verschillen in toxiciteit zijn die samenhangen met het geslacht, moet het gebruik van beide geslachten (vier mannetjes en vier vrouwtjes) worden overwogen.

▼M4

52. Na toediening van de teststof (radioactief gemerkt) moeten op geschikte bemonsteringstijdstippen van elk dier bloedmonsters worden genomen volgens de passende bemonsteringsmethode. De hoeveelheid en het aantal bloedmonsters die per dier kunnen worden afgenomen kunnen worden beperkt door de mogelijke effecten van de herhaalde bemonstering op de gezondheid/fysiologie van het dier en/of de gevoeligheid van de analysemethode. De monsters moeten voor elk dier afzonderlijk worden geanalyseerd. In bepaalde gevallen (bijvoorbeeld met het oog op de karakterisering van metabolieten) kan het noodzakelijk zijn monsters van meerdere dieren samen te voegen. Samengevoegde monsters moeten duidelijk als zodanig worden gemarkeerd en er moet een motivering worden gegeven voor het samenvoegen. Als een radioactief gemerkte teststof wordt gebruikt, kan een analyse van de totaal aanwezige radioactiviteit toereikend zijn. In dat geval wordt de totale radioactiviteit geanalyseerd in volledig bloed en plasma of plasma en rode bloedcellen om berekening van de verhouding bloed/plasma mogelijk te maken. In andere gevallen kan nader onderzoek noodzakelijk zijn waarvoor identificatie van de oorspronkelijke verbinding en/of metabolieten vereist is of ter beoordeling van de eiwitbinding.

Kinetiek in andere weefsels

53. Dit onderzoek heeft tot doel tijdgebonden informatie te verkrijgen met betrekking tot vraagstukken die verband houden met de toxische werkingswijze, bioaccumulatie en biopersistentie door de niveaus van de teststof in uiteenlopende weefsels te bepalen. Welke weefsels worden gekozen en hoeveel tijdstippen worden geëvalueerd is afhankelijk van het te onderzoeken weefsel en de toxicologische databank voor de teststof. Bij het opzetten van aanvullend onderzoek naar de kinetiek in weefsels moet rekening worden gehouden met de informatie die overeenkomstig de punten 37-40 is verzameld. Dit onderzoek kan worden verricht met eenmalige of herhaalde toediening. De gekozen aanpak moet nader worden gemotiveerd.

54. Er kan onderzoek naar kinetiek in andere weefsels worden verricht:

— als er aanwijzingen zijn voor een verlengde halveringstijd in bloed, wat zou kunnen wijzen op de mogelijke accumulatie van de teststof in diverse weefsels, of

— om te zien of een stabiele waarde is bereikt voor bepaalde weefsels (bij onderzoek met herhaalde toediening kan het bv. interessant zijn te bepalen of er ook een stabiele waarde is bereikt in de doelweefsels, ook al is er in het bloed blijkbaar een stabiele waarde voor de teststof bereikt).

55. Voor dergelijk onderzoek naar het tijdsverloop dient een passende orale dosis van de teststof te worden toegediend aan ten minste vier dieren per dosis per tijdstip en het tijdsverloop van de distributie in geselecteerde weefsels te worden gevolgd. Hierbij mogen dieren van één geslacht worden gebruikt, tenzij geslachtsspecifieke toxiciteit wordt waargenomen. Of de totale radioactiviteit of de oorspronkelijke chemische stof en/of metabolieten worden geanalyseerd, is mede afhankelijk van het onderzochte vraagstuk. De beoordeling van de weefseldistributie dient te worden verricht met gebruikmaking van passende technieken.

Inductie/remming van enzymen

56. Het is mogelijk dat onderzoek moet worden verricht naar de mogelijke effecten van inductie/remming van enzymen of biotransformatie van de onderzochte teststof als aan één of meer van de volgende voorwaarden wordt voldaan:

1. de beschikbare gegevens wijzen op een verband tussen de biotransformatie van de teststof en een verhoogde toxiciteit;

2. de beschikbare toxiciteitsgegevens wijzen op een niet-lineair verband tussen dosis en metabolisme;

▼M4

3. de resultaten van onderzoek dat was gericht op de identificatie van metabolieten wijzen op een mogelijk toxische metaboliet die het resultaat kan zijn van een enzympad dat door de teststof wordt geïnduceerd;

4. effecten waarvan men vermoed dat ze verband houden met enzyminductie zouden door dergelijk onderzoek kunnen worden verklaard;

5. als er vanuit toxicologisch opzicht significante veranderingen in het metabole profiel van de teststof worden waargenomen tijdens proeven in vitro of in vivo met verschillende diersoorten of onder verschillende omstandigheden, kan karakterisering van de betrokken enzymen noodzakelijk zijn (bijvoorbeeld fase I-enzymen zoals de iso-enzymen van het cytochroom P450-afhankelijk mono-oxygenasesysteem, fase II-enzymen zoals de iso-enzymen van sulfotransferase of UDP-glucuronyltransferase of andere relevante enzymen). Deze informatie kan worden gebruikt om het belang van bepaalde soorten voor extrapolatie naar andere soorten te evalueren.

57. Er moeten passende onderzoeksprotocollen worden gebruikt om veranderingen in de toxicokinetiek die verband houden met de teststof te evalueren, mits deze gevalideerd en voorzien zijn van een passende motivering. Voorbeelden van onderzoeksopzetten zijn onderzoek met herhaalde toediening van een niet-gemerkte teststof, gevolgd door een eenmalige radioactief gemerkte dosis op dag 14, of met herhaalde toediening van een radioactief gemerkte teststof en bemonstering op dag 1, 7 en 14 om de metabole profielen te bepalen. Herhaalde toediening van een radioactief gemerkte teststof kan ook informatie opleveren over bioaccumulatie (zie punt 26).

AANVULLENDE BENADERINGEN

58. Benaderingen in aanvulling op de proeven in vivo die in deze testmethode worden beschreven, kunnen nuttige informatie verschaffen over de absorptie, de distributie, het metabolisme of de verwijdering van een teststof bij bepaalde diersoorten.

Gebruik van in-vitro-informatie

59. Met behulp van de juiste testsystemen kunnen bij onderzoek in vitro vraagstukken in verband met het metabolisme van de teststof worden onderzocht. Pas geïsoleerde of gekweekte hepatocyten en subcellulaire fracties (bv. microsomen en cytosol of S9-fractie) uit de lever kunnen worden gebruikt om mogelijke metabolieten te onderzoeken. Het lokaal metabolisme van het doelorgaan, bv. de long, kan van belang zijn voor de risicobeoordeling. Hiertoe kunnen microsomiale fracties van doelweefsels van nut zijn. Onderzoek op het gebied van microsomen kan dienen om mogelijke, van het geslacht en het levensstadium afhankelijke verschillen te onderzoeken en enzymparameters (K_m en V_{max}) te karakteriseren die kunnen helpen bij het beoordelen van de mate waarin de dosisafhankelijkheid van het metabolisme reageert op verschillende blootstellingsniveaus. Daarnaast kunnen met behulp van microsomen de specifieke bij het metabolisme van de teststof betrokken microsomiale enzymen worden geïdentificeerd die relevant kunnen zijn voor de extrapolatie naar andere soorten (zie ook punt 56). De mogelijkheid van inductie van biotransformatie kan ook worden onderzocht met behulp van subcellulaire fracties uit de lever (bv. microsomen en cytosol) van dieren die vooraf zijn behandeld met de onderzochte teststof, in vitro via onderzoek naar de inductie van hepatocyten of op basis van specifieke cellijnen waarin specifieke enzymen tot expressie komen. In bepaalde gevallen en onder de juiste omstandigheden kan worden overwogen subcellulaire fracties van menselijke weefsels te gebruiken bij het bepalen van mogelijke soortafhankelijke verschillen op het gebied van biotransformatie. De resultaten van onderzoek in vitro kunnen ook nuttig zijn bij het ontwikkelen van PBTK-modellen (5).

▼M4

60. Onderzoek in vitro naar dermale absorptie kan aanvullende informatie opleveren voor het karakteriseren van de absorptie (6).

61. Met primaire celculturen van levercellen en verse weefselcoupes kunnen vergelijkbare vraagstukken worden onderzocht als met levermicrosomen. In bepaalde gevallen kunnen cellijnen waarin het relevante enzym tot specifieke expressie komt of genetisch aangepaste cellijnen antwoord verschaffen op specifieke vragen. In andere gevallen kan het nuttig zijn de inductie en de remming van specifieke cytochrome P450-iso-enzymen (bv. CYP1A1, 2E1, 1A2 e.a.) en/of van fase II-enzymen door de oorspronkelijke verbinding door middel van onderzoek in vitro te bestuderen. De verkregen informatie kan nut hebben voor verbindingen met een verwante structuur.

Het gebruik van toxicokinetische gegevens uit toxiciteitsonderzoek als aanvullende informatie

62. Aan de analyse van bloed-, weefsel- en/of excretamonsters die zijn verkregen tijdens ander toxiciteitsonderzoek kunnen gegevens worden ontleend over de biologische beschikbaarheid, veranderingen in de plasmaconcentratie in de tijd (AUC, C_{max}), de mogelijkheid van bioaccumulatie, de zuiveringssnelheid en van het geslacht of het levensstadium afhankelijke veranderingen in metabolisme en kinetiek.

63. Aan de hand van de onderzoeksopzet kunnen vraagstukken worden onderzocht in verband met: de verzadiging van de absorptie-, biotransformatie- of uitscheidingsroutes bij hogere doseringen; de werking van nieuwe metabole routes bij hogere doseringen en de beperking van toxische metabolieten tot hogere doseringen.

64. In verband met de beoordeling van de gevaren kunnen ook de volgende vraagstukken worden onderzocht:

— leeftijdsafhankelijke gevoeligheid vanwege verschillen in status van de bloed-hersenbarrière, de nieren en/of het detoxificatievermogen;

— de gevoeligheid van subpopulaties voor verschillen in biotransformatievermogen of andere toxicokinetische verschillen;

— de mate van blootstelling van de foetus als gevolg van de transplacentale overdracht van chemische stoffen of van het pasgeboren jong als gevolg van de lactatie.

Het gebruik van toxicokinetische modellering

65. Toxicokinetische modellen kunnen van nut zijn voor diverse aspecten van de gevaar- en risicobeoordeling, zoals het voorspellen van de systemische blootstelling en de interne dosis in weefsels. Daarnaast kunnen specifieke vragen over de werkingswijze worden onderzocht en deze modellen kunnen de basis vormen voor de extrapolatie naar andere soorten, blootstellingsroutes, doseringspatronen en de risicobeoordeling bij de mens. Gegevens die nuttig zijn voor het ontwikkelen van PBTK-modellen voor een teststof bij een willekeurige soort omvatten 1) partitiecoëfficiënten, 2) biochemische constanten en fysiologische parameters, 3) routespecifieke absorptieparameters en 4) kinetische in-vivogegevens voor de evaluatie van modellen (bijvoorbeeld zuiveringsparameters voor relevante (> 10 %) uitscheidingsroutes, K_m en V_{max} voor het metabolisme]. De experimentele gegevens die worden gebruikt bij het ontwikkelen van modellen moeten met wetenschappelijk verantwoorde methoden worden gegenereerd en de modelresultaten moeten worden gevalideerd. Vaak worden aan de hand van voor de teststof en diersoort specifieke parameters als de absorptiesnelheid, de partitionering van bloed en weefsel en de metabole constanten niet-gecompartimenteerde of op de fysiologie gebaseerde modellen ontwikkeld (7).

▼M4

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

66. Het verdient aanbeveling een inhoudsopgave op te nemen in het onderzoeksverslag.

Hoofdtekst van het verslag

67. De hoofdtekst van het verslag moet de in deze testmethode behandelde informatie bevatten, die als volgt is onderverdeeld in afdelingen en punten:

Samenvatting

68. In deze afdeling van het onderzoeksverslag moeten een samenvatting van de onderzoeksopzet en een beschrijving van de gebruikte methoden worden opgenomen. Daarnaast moet aandacht worden besteed aan de voornaamste bevindingen op het gebied van de massabalans, de aard en omvang van de metabolieten, weefselresiduen, de zuiveringssnelheid, de mogelijkheid van bioaccumulatie, geslachtsafhankelijke verschillen enz. De samenvatting moet voldoende gedetailleerd zijn om evaluatie van de bevindingen mogelijk te maken.

Inleiding

69. In deze afdeling van het verslag moeten de doelstellingen, de motivering en de opzet van het onderzoek worden beschreven, alsmede passende referenties en eventuele achtergrondinformatie worden verschaft.

Materialen en methoden

70. In deze afdeling van het verslag moet een gedetailleerde beschrijving van alle ter zake doende informatie worden opgenomen:

a) Teststof

In deze onderafdeling moet de aard van de teststof worden beschreven: de chemische naam, de moleculaire structuur, de kwalitatieve en kwantitatieve analyse van de chemische samenstelling, de chemische zuiverheid en zo mogelijk de aard en de hoeveelheden van eventuele onzuiverheden. Daarnaast moet informatie over de fysisch-chemische eigenschappen worden opgenomen, met inbegrip van de fysische toestand, de kleur, de algemene oplosbaarheid en/of de partitiecoëfficiënt, de stabiliteit, en, indien van toepassing, de corrosiviteit. Daarnaast moet informatie over eventuele isomeren worden verstrekt, indien van toepassing. Als de teststof radioactief gemerkt is, moet ook de volgende informatie worden opgenomen: het soort radio-isotoop, de positie van het radioactief merkteken, de specifieke activiteit en de radiochemische zuiverheid.

Verder dient te worden beschreven wat voor soort media, verdunningsmiddelen, suspenderingsmiddelen en emulgatoren of andere materialen bij het toedienen van de teststof zijn gebruikt;

b) Proefdieren

Deze onderafdeling moet informatie bevatten over de proefdieren, alsook over de keuze van de diersoort, de stam en de leeftijd bij aanvang van het onderzoek, het geslacht, het lichaamsgewicht, de gezondheidstoestand en de verzorging van de dieren, samen met een motivering;

c) Methoden

Deze onderafdeling bevat bijzonderheden van de onderzoeksopzet en de gebruikte methodologie, met inbegrip van:

1) een motivering voor eventuele aanpassingen van de blootstellingsroute en de blootstellingsomstandigheden, indien van toepassing;

▼M4

2) een motivering voor de keuze van de dosisniveaus;

3) een beschrijving van verkennend onderzoek dat is gebruikt bij het opzetten van de proeven van het vervolgonderzoek, indien van toepassing. Er moeten ondersteunende gegevens van verkennend onderzoek worden verstrekt;

4) de manier waarop de doseeroplossing is bereid en het soort oplosmiddel of medium dat is gebruikt, indien van toepassing;

5) het aantal behandelingsgroepen en het aantal dieren in elke groep;

6) de doseringsniveaus en -hoeveelheden (en de specifieke activiteit van de dosis bij gebruik van radioactiviteit);

7) de toedieningsweg(en) en -methoden;

8) de doseerfrequenties;

9) de vastperiode (indien van toepassing);

10) de totale radioactiviteit per dier;

11) de behandeling van dieren;

12) de bemonstering en de behandeling van de monsters;

13) de analysemethoden die zijn gebruikt voor het scheiden, kwantificeren en identificeren van de metabolieten;

14) de detectiegrens voor de toegepaste methoden;

15) andere metingen en procedures die tijdens het onderzoek zijn uitgevoerd (met inbegrip van de validatie van de methoden voor de analyse van metabolieten).

d) Statistische analyse

Als gebruik wordt gemaakt van statistische analyse om de bevindingen van het onderzoek te analyseren, moet het verslag voldoende informatie over de analysemethode en het gebruikte computerprogramma bevatten, zodat een onafhankelijke evaluator/statisticus de analyse kan beoordelen en reconstrueren.

Ingeval van onderzoek aan de hand van systeemmodellen zoals PBTK moeten de gepresenteerde modellen een volledige modelomschrijving omvatten om onafhankelijke reconstructie en validatie van het model mogelijk te maken (zie punt 65 en het aanhangsel: Definities).

Resultaten

71. Alle gegevens in deze afdeling moeten worden samengevat en in tabelvorm worden gepresenteerd, voorzien van een passende statistische evaluatie en een beschrijving. De gegevens van de radioactiviteitsbepaling moeten op passende wijze worden samengevat en gepresenteerd, gewoonlijk als microgram- of milligramequivalent per monstermassa, hoewel ook andere eenheden mogen worden gebruikt. Neem in deze afdeling grafische illustraties van de bevindingen, reproducties van representatieve chromatografische en spectrometrische gegevens, gekwantificeerde/geïdentificeerde metabolieten en de voorgestelde metabole routes, inclusief de moleculaire structuur van de metabolieten, op. Neem daarnaast ook de volgende informatie op, indien van toepassing:

1) de hoeveelheid en het percentage teruggevonden radioactiviteit in de urine, de feces, de uitgeademde lucht alsmede de wasvloeistof uit de kooien.

— Neem in geval van huidonderzoek ook gegevens op over de recovery van de teststof van de behandelde huid, de wasvloeistof na het wassen van de huid en de resterende radioactiviteit in het toestel dat de huid bedekt en de metabole eenheid, alsmede de resultaten van het onderzoek waarbij de huid wordt gewassen. Zie de punten 74-77 voor nadere informatie.

▼M4

— Neem in geval van inhalatieonderzoek ook gegevens op over de recovery van de teststof uit de longen en weefsels uit de neus (8). Zie punt 78 voor nadere informatie.

2) de weefseldistributie uitgedrukt als percentage van de toegediende dosis en de concentratie (microgramequivalenten per gram weefsel), alsmede de verhouding weefsel-bloed of weefsel-plasma;

3) de materiaalbalans die is opgemaakt op basis van de verschillende studies aan de hand van de analyse van lichaamsweefsels en excreta;

4) plasmaconcentraties en toxicokinetische parameters (biologische beschikbaarheid, AUC, C_{max}, T_{max}, zuivering, halveringstijd) na toediening via de relevante blootstellingsroute(s);

5) de snelheid en omvang van de absorptie van de teststof na toediening via de relevante blootstellingsroute(s);

6) de hoeveelheden van de teststof en metabolieten (uitgedrukt als een percentage van de toegediende dosis) die in de excreta zijn verzameld;

7) verwijzingen naar gegevens in de bijlage over alle gemeten eindpunten voor alle afzonderlijke dieren (bv. toediening van de dosis, percentage recovery, concentraties, toxicokinetische parameters enz.);

8) een illustratie van de veronderstelde metabole routes en de moleculaire structuren van de metabolieten.

Bespreking en conclusies

72. In deze afdeling moet de auteur:

1) een veronderstelde metabole route voorstellen die is gebaseerd op de resultaten van het metabolisme en de dispositie van de teststof;

2) mogelijke soort- en geslachtsafhankelijke verschillen bespreken met betrekking tot de dispositie en/of de biotransformatie van de teststof;

3) de identificatie en omvang van metabolieten, zuiveringssnelheden, mogelijkheid van bioaccumulatie, en niveau van weefselresiduen van oorspronkelijke verbindingen en/of metaboliet(en), alsmede mogelijke dosisafhankelijke veranderingen in toxicokinetische parameters, naargelang hetgeen van toepassing is, in tabellen zetten en bespreken;

4) eventuele relevante toxicokinetische gegevens opnemen die zijn verkregen tijdens het verrichte toxiciteitsonderzoek;

5) een beknopte conclusie formuleren die door de bevindingen van het onderzoek wordt gestaafd;

6) afdelingen toevoegen (voor zover noodzakelijk of van toepassing).

73. Er moeten afdelingen worden toegevoegd voor ondersteunende bibliografische gegevens, tabellen, illustraties, aanhangsels enz.

▼M4

ALTERNATIEVE BLOOTSTELLINGSROUTES

Dermaal

Dermale behandeling

74. In deze afdeling wordt specifieke informatie verschaft over het onderzoek naar de toxicokinetiek van de teststof via de dermale route. Raadpleeg voor dermale absorptie hoofdstuk B.44 van deze bijlage (Absorptie door de huid: in-vivomethode (9)). Voor andere eindpunten, zoals distributie en metabolisme, kan deze testmethode B.36, worden gebruikt. Bij de dermale behandeling moeten één of meer dosisniveaus worden gebruikt voor de teststof. De teststof (bijvoorbeeld puur, verdund of geformuleerd materiaal met de teststof dat op de huid wordt aangebracht) moet hetzelfde zijn (of een realistisch surrogaat) als die waaraan mensen of andere potentiële doelsoorten kunnen worden blootgesteld. De dosisniveaus moeten overeenkomstig de punten 20-26 van deze testmethode worden gekozen. Bij het kiezen van de dermale dosis kan rekening worden gehouden met factoren als de verwachte blootstelling bij de mens en/of doses waarbij toxiciteit is waargenomen bij ander onderzoek naar de huidtoxiciteit. Indien nodig moet/moeten de dermale dosis/doses worden opgelost in een geschikt medium en worden aangebracht in een hoeveelheid die toereikend is voor toediening van de dosis/doses. Kort voor de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt. Het dier kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur voor de proef geschieden. Bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast, omdat daardoor de doorlaatbaarheid van de huid zou kunnen veranderen. Ca. 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij zeer toxische stoffen mag de te bedekken oppervlakte kleiner zijn dan ca. 10 %, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet met een dunne en gelijkmatig aangebrachte laag worden bedekt. Van alle bij dermaal onderzoek gebruikte testgroepen moet dezelfde oppervlakte worden behandeld. De toedieningsgebieden moeten worden beschermd met een geschikte afdekking die niet kan verschuiven. De dieren worden in aparte kooien gehuisvest.

75. Er moet onderzoek worden verricht om te beoordelen hoeveel van de opgebrachte dosis van de teststof van de huid kan worden verwijderd door de behandelde huid te wassen met een milde oplossing van zeep en water. Dit onderzoek kan ook nuttig zijn bij het bepalen van de massabalans wanneer de teststof via de huid wordt toegediend. Bij onderzoek waarbij de huid wordt gewassen moet een eenmalige dosis van de teststof bij twee dieren worden opgebracht. Het dosisniveau wordt gekozen overeenkomstig punt 23 van deze testmethode (zie ook punt 76 voor een bespreking van de duur van het huidcontact). De hoeveelheid in de wasvloeistof teruggevonden teststof moet worden bepaald om te beoordelen hoe effectief de teststof door middel van wassen wordt verwijderd.

76. Tenzij de corrosiviteit dit onmogelijk maakt, moet de opgebrachte teststof ten minste 6 uur op de huid aanwezig blijven. Wanneer de afdekking wordt verwijderd, moet het behandelde gebied worden gewassen nadat de procedure is toegepast die wordt beschreven in punt 75. Zowel de afdekking als de wasvloeistof moeten worden geanalyseerd op resterende teststof. Bij beëindiging van het onderzoek moet elk dier overeenkomstig (2) op humane wijze worden gedood en moet de behandelde huid worden verwijderd. Een geschikt gedeelte van de behandelde huid moet worden geanalyseerd om de resterende teststof (radioactiviteit) te bepalen.

77. Het is mogelijk dat voor de toxicokinetische beoordeling van geneesmiddelen andere procedures moeten worden toegepast, afhankelijk van het desbetreffende regelgevingssysteem.

▼M4

Inhalatie

78. Er dient één concentratie (of meer, indien noodzakelijk) van de teststof te worden gebruikt. De concentraties moeten worden gekozen overeenkomstig de punten 20-26 van deze testmethode. Inhalatiebehandelingen moeten worden uitgevoerd met behulp van een „neuskegel" of een apparaat dat de toediening beperkt tot het hoofd ter voorkoming van absorptie via andere blootstellingsroutes (8). Als andere blootstellingsvormen dan inhalatie worden gebruikt, moet worden gedocumenteerd waarom. De duur van de blootstelling via inhalatie moet worden vastgesteld; de inhalatieduur bedraagt doorgaans 4-6 uur.

LITERATUUR:

(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 W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 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) Hoofdstuk B.45 van deze bijlage, Absorptie door de huid: in-vitromethode.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic 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) Hoofdstuk B.44 van deze bijlage, Absorptie door de huid: in-vivomethode.

(10) Barton H.A., *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. en Perrier D., (1982). Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Aanhangsel

DEFINITIES

Absorptie: de processen die verband houden met de opname van chemische stoffen in of door weefsels. De term absorptie heeft betrekking op de oorspronkelijke verbinding en alle metabolieten ervan en mag niet worden verward met „biologische beschikbaarheid".

Accumulatie (bioaccumulatie): de toename in de tijd van de hoeveelheid van een teststof in weefsels (doorgaans vetweefsels, na herhaalde blootstelling); als de hoeveelheid toegevoegde teststof in het lichaam groter is dan de snelheid waarmee deze verdwijnt, stapelt de teststof zich op in het organisme en kunnen er toxische concentraties van de teststof worden bereikt.

ADME: een acroniem voor „absorptie, distributie, metabolisme en excretie".

AUC: (area under the curve, oppervlakte onder de plasmaconcentratie-tijdcurve): de oppervlakte onder de curve in een grafiek van de ontwikkeling in de tijd van de concentratie van een teststof in plasma. Deze oppervlakte is een maat voor de totale hoeveelheid van de teststof die gedurende een vooraf bepaalde tijd door het lichaam is geabsorbeerd. Onder lineaire omstandigheden is de AUC (vanaf tijdstip nul tot oneindig) evenredig aan de totale hoeveelheid van een teststof die door het lichaam wordt geabsorbeerd, ongeacht de absorptiesnelheid.

Autoradiografie: (autoradiografie van het gehele lichaam): een kwalitatieve of kwantitatieve techniek die wordt gebruikt om de ligging in het weefsel van een radioactieve teststof te bepalen. Hiertoe worden met behulp van röntgenopnamen of meer recentelijk met behulp van Digital Phosphor Imaging radioactief gemerkte moleculen of fragmenten van moleculen in beeld gebracht door de straling vast te leggen die door het onderzochte voorwerp wordt uitgezonden. Ten opzichte van sectie op de organen kan kwantitatieve autoradiografie van het gehele lichaam voordelen bieden bij de evaluatie van de distributie van de teststof en de beoordeling van de algemene recovery en resolutie van radioactief materiaal in weefsels. Zo heeft deze techniek bijvoorbeeld als voordeel dat deze kan worden toegepast bij een gepigmenteerd diermodel om een mogelijke binding van de teststof aan melanine, dat zich aan bepaalde moleculen kan binden, te beoordelen. Hoewel op deze manier voor het hele lichaam een overzicht kan worden verkregen van de bindingsplaatsen met een grote capaciteit en een geringe affiniteit, is het nut van deze techniek beperkt als het erom gaat specifieke doelgebieden te herkennen zoals receptorbindende gebieden waar voor detectie een betrekkelijk hoge resolutie en hoge gevoeligheid vereist is. Wanneer autoradiografie wordt toegepast, moeten proeven die zijn bedoeld om de massabalans van de toegediende verbinding te bepalen in een andere groep of in een ander onderzoek worden uitgevoerd dan in de proef waarmee de weefseldistributie wordt onderzocht, waarbij alle excreta (eventueel met inbegrip van de uitgeademde lucht) en hele karkassen worden gehomogeniseerd en door middel van vloeistofscintillatietelling worden geanalyseerd.

Galexcretie: uitscheiding via de galwegen.

Bioaccumulatie: zie „accumulatie".

Biologische beschikbaarheid: de fractie van de toegediende dosis die in de systemische circulatie terechtkomt of beschikbaar wordt gemaakt op de plaats waar de fysiologische activiteit zich voordoet. De biologische beschikbaarheid van een teststof heeft gewoonlijk betrekking op de oorspronkelijke verbinding, maar kan ook betrekking hebben op de metaboliet(en) ervan. Slechts één chemische vorm wordt onderzocht. *NB:* biologische beschikbaarheid en absorptie zijn niet hetzelfde. Het verschil tussen bijvoorbeeld orale absorptie (d.w.z. aanwezigheid in de darmwand en de portaalcirculatie) en biologische beschikbaarheid (d.w.z. aanwezigheid in systemisch bloed en in weefsels) kan onder meer worden toegeschreven aan chemische afbraak als gevolg van het metabolisme in de darmwand of het transport van efflux naar het darmlumen of het presystemisch metabolisme in de lever (10). De biologische beschikbaarheid van een toxisch bestanddeel (oorspronkelijke verbinding of een metaboliet) is een essentiële parameter voor de risicobeoordeling bij de mens (extrapolatie van hoge naar lage dosis, extrapolatie van de ene route naar de andere), aan de hand waarvan een interne waarde kan worden afgeleid van de externe NOAEL of BMD (toegepaste dosis). Voor het bepalen van levereffecten bij orale toediening volstaat de orale absorptie. Voor alle andere effecten die niet met de toedieningsplaats samenhangen, levert de biologische beschikbaarheid in het algemeen betrouwbaarder resultaten op als parameter voor gebruik bij de risicobeoordeling dan de absorptie.

▼M4

Biopersistentie: zie „persistentie”.

Biotransformatie: (gewoonlijk een enzymatische) chemische omzetting van de onderzochte teststof in een andere chemische stof in het lichaam. Synoniem met „metabolisme”.

C_{max}: hetzij de piekconcentratie in het bloed (plasma/serum) na toediening hetzij de hoogste uitscheiding (in urine of feces) na toediening.

Zuiveringssnelheid: een kwantitatieve maat voor de snelheid per tijdseenheid waarmee de teststof uit het bloed, het plasma of een bepaald weefsel wordt verwijderd.

Compartiment: een structureel of biochemisch onderdeel (of eenheid) van een lichaam, weefsel of cel, dat is gescheiden van de rest.

Detoxificatiewegen: een reeks stappen die leidt tot de verwijdering van toxische stoffen uit het lichaam, hetzij via metabole verandering, hetzij via uitscheiding.

Distributie: de verspreiding van de teststof en de daarvan afgeleide stoffen door een organisme.

Enzymen/iso-enzymen: eiwitten die optreden als katalysator van chemische reacties. Iso-enzymen zijn enzymen die vergelijkbare chemische reacties katalyseren, maar een andere aminozuurvolgorde hebben.

Enzymatische parameters: K_m: constante van Michaelis en V_{max}: maximale snelheid.

Uitscheiding: één of meer processen waardoor de toegediende teststof en/of de metabolieten ervan door het lichaam worden uitgescheiden.

Exogeen: afkomstig van of het gevolg van invloed van buiten het organisme of systeem.

Extrapolatie: op basis van wat bekend is of wat waargenomen is uitspraken doen over één of meer onbekende waarden.

Halveringstijd ($t_{1/2}$): de tijd waarin de concentratie van de teststof in een compartiment met de helft afneemt. Doorgaans verwijst deze term naar de plasmaconcentratie of de hoeveelheid van de teststof in het hele lichaam.

Inductie (van enzymen): de aanmaak van één of meer enzymen als reactie op een prikkel vanuit de omgeving of een inducerend molecuul.

Lineariteit/lineaire kinetiek: volgens de kinetiek is een proces lineair als de snelheid van alle overdrachten tussen de compartimenten evenredig is aan de aanwezige hoeveelheden of concentraties, d.w.z. van de eerste orde is. Bijgevolg zijn de zuiverings- en de distributievolumes constant, evenals de halveringstijden. De bereikte concentraties zijn evenredig aan de toedieningssnelheid (blootstelling) en accumulatie kan eenvoudiger worden voorspeld. De lineariteit/niet-lineariteit kan worden bepaald door de relevante parameters, bijvoorbeeld de AUC, met elkaar te vergelijken na verschillende doses of na eenmalige en herhaalde blootstelling. Het achterwege blijven van dosisafhankelijkheid kan wijzen op verzadiging van de enzymen die betrokken zijn bij het metabolisme van de verbinding, terwijl een toename van de AUC na herhaalde blootstelling in vergelijking met eenmalige blootstelling kan wijzen op remming van het metabolisme en een afname van de AUC kan wijzen op inductie van het metabolisme (zie ook (11)).

▼M4

Massabalans: het bijhouden van de hoeveelheid teststof die het systeem binnenkomt en verlaat.

Materiaalbalans: zie „massabalans”.

Toxisch werkingsmechanisme/werkingswijze: het werkingsmechanisme heeft betrekking op de specifieke biochemische wisselwerkingen waaraan de teststof zijn effect ontleent. De werkingswijze heeft betrekking op algemenere wegen die leiden tot de toxiciteit van de teststof.

Metabolisme: synoniem met „biotransformatie”.

Metabolieten: producten van het metabolisme of metabole processen.

Orale absorptie: het percentage van de dosis van de teststof dat wordt geabsorbeerd op de toedieningsplaats (bijvoorbeeld het spijsverteringskanaal). Aan de hand van deze kritische parameter kan de fractie van de toegediende teststof worden onderzocht die de poortader en vervolgens de lever bereikt.

Partitiecoëfficiënt: ook verdelingscoëfficiënt genoemd. Een maat voor de differentiële oplosbaarheid van een chemische stof in twee oplosmiddelen.

Piekconcentraties in het bloed (plasma/serum): de hoogste concentratie in het bloed (plasma/serum) na toediening (zie ook „C_{max}”).

Persistentie (biopersistentie): de langdurige aanwezigheid van een chemische stof (in een biologisch systeem) die bestand is tegen afbraak/verwijdering.

Read-across: aan de hand van de informatie over het eindpunt van één of meer chemische stoffen kan het eindpunt van de onderzochte stof worden voorspeld.

Receptor Microscopic Autoradiography (of Receptor Micro-Autoradiography): deze techniek kan worden gebruikt om de wisselwerking tussen lichaamsvreemde stoffen en specifieke weefsellocaties of celpopulaties te onderzoeken in het kader van bijvoorbeeld onderzoek naar receptorbinding of specifieke werkingswijzen waarvoor een hoge resolutie en een hoge gevoeligheid vereist zijn en die met andere technieken, zoals autoradiografie van het gehele lichaam, niet mogelijk zijn.

Toedieningsweg (oraal, intraveneus, dermaal, inhalatie enz): heeft betrekking op de manier waarop chemische stoffen aan het lichaam worden toegediend (bijvoorbeeld via een orale maagsonde, via de voeding, via de huid, door inademing, intraveneus enz.).

Verzadiging: de toestand waarbij één of meer kinetische processen (bijvoorbeeld absorptie, metabolisme of zuivering) hun hoogste punt hebben bereikt (verzadigd zijn).

Gevoeligheid: het vermogen van een methode of instrument om onderscheid te maken tussen gemeten reacties die overeenstemmen met verschillende niveaus van de onderzochte variabele.

Concentratie in het bloed (plasma) in stationaire toestand: een niet-evenwichtstoestand van een open systeem waarbij alle krachten die op het systeem inwerken exact worden opgeheven door tegengestelde krachten, zodanig dat de concentratie van alle elementen in het systeem stabiel is hoewel er materiaal door het systeem stroomt.

Systeemmodellering (op fysiologie gebaseerde toxicokinetische, op farmacokinetiek gebaseerde, op fysiologie gebaseerde farmacokinetische, op biologie gebaseerde enz.): het opstellen van een abstract model waarin het gedrag van een systeem wiskundig wordt beschreven.

Doelweefsel: het weefsel waarin een belangrijk schadelijk effect van een toxische stof optreedt.

▼M4

Teststof: iedere chemische stof of ieder mengsel die/dat met deze testmethode wordt getest.

Weefseldistributie: de omkeerbare beweging van een teststof tussen verschillende plaatsen in het lichaam. De weefseldistributie kan worden onderzocht door middel van sectie op de organen, homogenisering, verbranding en vloeistofscintillatietelling of met behulp van kwalitatieve en/of kwantitatieve autoradiografie van het gehele lichaam. De eerste techniek is nuttig voor het bepalen van de concentratie en het recoverypercentage bij weefsels en het resterende karkas van dezelfde dieren, maar biedt mogelijk niet voldoende onderscheidingsvermogen voor alle weefsels en biedt mogelijk een minder gunstige algemene recovery (< 90 %). Zie hierboven voor een definitie van de laatste techniek.

$\mathbf{T_{max}}$: de tijd die nodig is om C_{max} te bereiken.

Toxicokinetiek: (farmacokinetiek): de bestudering van de absorptie, de distributie, het metabolisme en de uitscheiding van teststoffen in de loop van de tijd.

Validatie van modellen: het beoordelen van de mate waarin een model in staat is de beschikbare toxicokinetische gegevens toereikend te beschrijven. Modellen kunnen worden geëvalueerd door een statistische en visuele vergelijking van de voorspellingen met de experimentele waarden aan de hand van een gemeenschappelijke onafhankelijke variabele (bijvoorbeeld de tijd). De omvang van de evaluatie moet in verhouding staan tot het beoogde gebruik van het model..

▼B

B.37 **VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBIN-DINGEN NA ACUTE BLOOTSTELLING**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische effecten van stoffen is het van belang rekening te houden met het vermogen van sommige soorten stoffen om specifieke typen neurotoxiciteit te veroorzaken die niet met andere toxiciteitstesten kunnen worden aangetoond. Bij sommige organische fosforverbindingen is waargenomen dat vertraagde neurotoxiciteit optreedt; deze stoffen moeten worden beschouwd als kandidaten voor evaluatie.

Door screening *in vitro* kan worden nagegaan welke stoffen vertraagde polyneuropathie kunnen veroorzaken; negatieve uitkomsten vormen echter geen bewijs dat de teststof niet neurotoxisch is.

Zie ook de algemene inleiding deel B.

1.2. DEFINITIES

Organische fosforverbindingen omvatten ongeladen organische esters, thioesters of anhydriden van organische fosforzuren, organische fosforzuren of organische fosforamidezuren of van verwante fosforthiozuren, fosforthiozurcn of fosforthioamidezuren, of andere stoffen die de vertraagde neurotoxiciteit kunnen veroorzaken die soms bij stoffen uit deze klasse wordt waargenomen.

Vertraagde neurotoxiciteit is een syndroom dat gepaard gaat met het langdurig vertraagde begin van ataxie, distale axonopathieén in het ruggemerg en perifere zenuwen en inhibitie en veroudering van NTE (neuropathy target esterase) in zenuwweefsel.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest met een positieve controlegroep om aan te tonen dat de respons van geteste diersoorten onder laboratoriumomstandigheden niet significant is veranderd.

Een voorbeeld van een vaak toegepaste neurotoxicum is tri-o-tolylfosfaat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-naam: fosforzuur, tris(2,methylfenyl)ester), ook bekend als tri-o-kresylfosfaat.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt oraal in één enkele dosis toegediend aan hennen die, zo nodig, beschermd zijn tegen acute cholinerge effecten. De dieren worden gedurende 21 dagen geobserveerd op abnormaal gedrag, ataxie en verlammingsverschijnselen. Bij willekeurig geselecteerde hennen uit elke groep worden, gewoonlijk 24 en 48 uur na de toediening, biochemische bepalingen verricht, met name op inhibitie van NTE. Eenentwintig dagen na de toediening worden de resterende hennen gedood en wordt histopathologisch onderzoek verricht aan geselecteerd zenuwweefsel.

▼B

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Voorbereidingen**

Gezonde jonge volwassen hennen die geen storende virusinfecties of medicatie hebben en die een normale gang vertonen worden aselect verdeeld over behandelde en controlegroepen en ten minste gedurende vijf dagen voor de aanvang van het onderzoek geacclimatiseerd aan de laborato-riumomstandigheden.

De kooien of verblijven moeten zó ruim zijn, dat de hennen vrij kunnen bewegen en dat de gang van de dieren makkelijk kan worden waargenomen.

Het toedienen van de teststof gebeurt gewoonlijk langs orale weg door middel van een maagsonde, gelatinecapsules of een vergelijkbare methode.Vloeistoffen kunnen onverdund of opgelost in een geschikt vehiculum zoals maïsolie worden toegediend. Vaste stoffen moeten waar mogelijk worden opgelost omdat grote hoeveelheden vaste stof in gelatinecapsules mogelijk niet helemaal worden geresorbeerd. Van een niet-waterig vehiculum dienen de toxische eigenschappen bekend te zijn. Als dit niet zo is moeten deze voor de aanvang van de proef worden bepaald.

1.5.2. **Proefomstandigheden**

1.5.2.1. *Proefdieren*

Het gebruik var jonge volwassen leghennen (*Gallus gallus domesticus*) van 8-12 maanden wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van rassen en stammen van normale grootte en de hennen moeten zijn gefokt onder omstandigheden die vrij bewegen mogelijk maken.

1.5.2.2. *Aantal en geslacht*

Als aanvulling op de behandelde groep moet een controlegroep (vehiculum) en een positieve controlegroep worden gebruikt. De controlegroep (vehiculum) wordt op dezelfde wijze behandeld als de behandelde groep; alleen het toedienen van de teststof wordt achterwege gelaten.

Iedere groep vogels moet uit zoveel hennen beslaan dat er ten minste zes kunnen worden gedood voor biochemische bepalingen (telkens drie op twee tijdstippen) en zes de observatieperiode van 21 dagen kunnen overleven ten behoeve van pathologisch onderzoek.

Als positieve controle kan een gelijktijdig geobserveerde groep worden gebruikt of een groep uit een recent verricht onderzoek. De groep moet uit ten minste zes hennen bestaan die worden behandeld met een stof waarvan bekend is dat deze een vertraagd neurotoxische werking heeft. Drie hennen zijn bestemd voor biochemisch onderzoek en drie voor pathologisch onderzoek. Aangeraden wordt om gegevens uit eerdere onderzoeken periodiek aan te vullen. Als een essentieel onderdeel van de proef door het uitvoerend laboratorium wordt veranderd (bijvoorbeeld stam, voedsel, behuizing), motten nieuwe positieve controlegegevens worden ontwikkeld.

▼B

1.5.2.3. *Dosisniveaus*

Om het dosisniveau in het hoofdonderzoek vast te stellen moet een vooronderzoek worden verricht met een voldoende aantal hennen en dosis niveaugroepen. Er dient, om een juist dosisniveau voor de hoofdstudie te kunnen vaststellen, normaal gesproken enige mortaliteit op de treden in deze voorstudie. Om echter sterfte ten gevolge van acute cholinerge effecten te voorkomen, kan atropine of een ander preventief middel, waarvan bekend is dat het niet interfereert met vertraagde neurotoxische reacties, worden toegediend. Voor het vaststellen van de maximale niet-letale dosis van [eststoffen kan een aantal verschillende methoden worden gebruikt (zie methode B.1bis). Gegevens uit eerdere onderzoeken bij de hen of andere toxicologische gegevens kunnen ook nuttig zijn bij de keuze van de dosis.

Het dosisniveau van de teststof in de hoofdstudie moet zo hoog mogelijk liggen, rekening houdend met de resultaten van de voorstudie en de bovengrens van 2 000 mg/kg lichaamsgewicht. Als er tussentijdse mortaliteit optreedt mag dit er niet toe leiden dat er te weinig proefdieren overblijven voor biochemisch (6) en pathologisch (6) onderzoek na 21 dagen. Ter voorkoming van sterfte door acute cholinerge effecten kan atropine of een ander preventief middel worden toegediend waarvan bekend is dat het niet interfereert met vertraagde neuro-toxische reacties.

1.5.2.4. *Limiettest*

Als een test op een dosisniveau van ten minste 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek geen waarneembare toxische effecten geeft en als dit, door gegevens van proeven met structureel verwante stoffen, ook niet verwacht mag worden, kan een onderzoek waarbij van een hogere dosering gebruik wordt gemaakt achterwege blijven. De limiettest is van toepassing tenzij blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt.

1.5.3. ***Observatieperiode***

De observatieperiode dient 21 dagen te zijn.

1.5.4. **Procedure**

Na toediening van een preventief middel om sterfte ten gevolge van acute cholinerge effecten te voorkomen, wordt de teststof in één enkele dosis toegediend.

Algemene observatie

Het observeren moet onmiddellijk na het toedienen beginnen. Alle hennen moeten gedurende de eerste twee dagen enkele malen per dag worden geobserveerd en daarna ten minste eenmaal per dag over een periode van 21 dagen of totdat de dieren worden gedood Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur van abnormaal gedrag Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moe[worden gelet op verlammingsverschijnselen. De hennen die zijn geselecteerd voor pathologie moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden genomen voor een periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieren en dieren die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.

▼B

Lichaamsgewicht

Alle dieren worden vlak voor het toedienen van de teststof en daarna minstens éénmaal per week gewogen.

Biochemie

Zes hennen die willekeurig uit iedere behandelde en vehiculumcontrolegroep worden gekozen en drie hennen uit de positieve controlegroep (als die tegelijkertijd wordt onderzocht) moeten binnen een paar dagen na toediening worden gedood. De hersenen en het lumbale ruggemerg worden geprepareerd en onderzocht op NTE-remmende effecten. Verder kan het nuttig zijn om weefsel van de nervus ischiadicus voor hetzelfde doel te prepareren en te onderzoeken. Meestal worden van de controlegroep en alle behandelde groepen na 14 uur drie vogels gedood en na 48 uur nog eens drie, terwijl de drie hennen van de positieve controlegroep na 24 uur worden gedood. Als de waarneming van klinische verschijnselen van toxiciteit (vaak op grond van het begin van choli-nerge verschijnselen) er op duidt dat du toxische stol zeer langzaam wordt uitgescheiden, kan het aan te bevelen zijn om op twee tijdstippen tussen 24 uur en maximaal 72 uur na toediening weefsel van drie vogels te verzamelen.

Bepaling van acetylcholesterinase (AChE) kan ook bij deze monsters worden uitgevoerd als dat nodig lijkt. Er kan echter spontane reactivering van AChE *in vivo* optreden: dit kan leiden tot onderschatting van de remmende werking van de teststof op AChE.

Marcroscopische necropsie

Bij macroscopische necropsie van alle (volgens plan of omdat ze stervend waren) gedode dieren moet onder meer het uiterlijk van de hersenen en het ruggemerg worden onderzocht.

Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht- Het weefsel moet *in situ* worden gefixeerd door perfusietechnieken, Ondere andere moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen [ongeveer halverwege de lengte-as), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van het ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de Jumbo-sacrale regio. Ook moeten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen.

2. **GEGEVENS**

Indien negatieve resultaten worden behaald met betrekking tot de parameters van deze methoden (biochemie, histopathologie en gedragsobservatie) is in het algemeen verder testen op vertraagde neurotoxiciteit niel nodig. Bij onduidelijke of dubbelzinnige resultaten voor deze parameters kan verdere evaluatie nodig zijn.

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt. Verder moeten alle resultaten in tabelvorm worden gepresenteerd, waarbij voor iedere testgroep het aantal dieren bij aanvang moet worden vermeld, het aantal dieren dat laesies of gedrags- of biochemische effecten vertoont, het soort en de ernst van deze laesies of effecten en het percentage dieren dat een bepaalde laesie of een bepaald effect in een bepaalde mate vertoont

▼B

De bevindingen van dit onderzoek moeten worden geëvalueerd wal betreft het voorkomen, de ernst en de correlatie van gedrags-, biochemische en histopathologische effecten en ieder ander waargenomen effect bij de behandelde en de controlegroepen.

Numerieke resultaten moeten wordien geinterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De gebruikte statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

3. **RAPPORTAGE**

VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het rapport moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

3.1. proefdieren:

— gebruikte stam;

— aantal en leeftijd van de dieren;

— herkomst, behuizing, enz.;

— individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.

3.2. Proefomstandigheden:

— bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar dat van toepassing is;

— motivering van de keuze van het vehiculum;

— bijzonderheden over de toediening van de teststof;

— bijzonderheden over voedsel en water;

— motivering van de dosiskeuze;

— specificatie van de toegediende doses. met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;

— naam van het eventueel toegediende preventieve middel en gegevens over de wijze van toedie ning.

3.3. Resultaten:

— gegevens over het lichaamsgewicht;

— gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar groep, met inbegrip van de mortaliteit;

— aard, ernst en duur van de klinische observaties (al of niet reversibel);

— een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;

— necropsieverslagen;

— een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen, statistische bewerking van de resultaten,

— indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 418 van de OESO.

▼B

B.38 **VERTRAAGDE NEUROTOXICITEIT VAN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)**

1. **METHODE**

1.1. INLEIDING

Bij de bepaling en evaluatie van de toxische effecten van stoffen is het van belang rekening te houden met het vermogen van sommige soorten stoffen om specifieke typen neurotoxiciteit te veroorzaken die niet met andere toxiciteitstesten kunnen worden aangetoond Bij sommige organische fosforverbindingen is waargenomen dat vertraagde neurotoxiciteit optreedt, deze stoffen moeten worden beschouwd als kandidaten voor evaluatie.

Door screening *in vitro* kan worden nagegaan welke stoffen vertraagde polyneuropathie kunnen veroorzaken; negatieve uitkomsten vormen echter geen bewijs dat de teststof niet neurotoxisch is.

Deze 28-daagse test op vertraagde neurotoxiciteit geeft informatie over mogelijke gevaren voor de gezondheid die zich kunnen voordoen bij herhaalde blootstelling gedurende een beperkte tijd en over de relatie tussen dosis en respons. Tevens kan op grond van de test een schatting worden gemaakt van een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten, hetgeen van nut kan zijn bij het vaststellen van veiligheidseisen bij blootstelling.

Zie ook de algemene inleiding deel B.

1.2. DEFINITIES

Organische fosforverbindingen omvatten ongeladen organische esters, thioesters of anhydriden van organische fosforzuren, organische fosforzuren of organische fosforamidezuren of van verwante fosforthiozuren, fosforthiozuren of fosforthioamidezuren, of andere stoffen die de vertraagde neurotoxiciteit kunnen veroorzaken die soms bij stoffen uit deze klasse wordt waargenomen.

Vertraagde neurotoxiciteit is een syndroom dat gepaard gaat met het langdurig vertraagde begin van ataxie, distale axonopathieen in het ruggemerg en perifere zenuwen en inhibitie en veroudering van NTE (neuropathy target esterase) in zenuwweefsel.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Aan hennen wordt dagelijks, gedurende 28 dagen, oraal een dosis van de teststof toegediend. De dieren worden tot 14 dagen na de laatste dosis tenminste eenmaal per dag geobserveerd op abnormaal gedrag, ataxie en verlammingsverschijnselen. Bij willekeurig geselecteerde hennen uit elke groep worden, gewoonlijk 24 en 48 uur na de laatste toediening, biochemische bepalingen verricht, met name op inhibitie van NTE. Twee weken na de laatste dosis worden de resterende hennen gedood en wordt histopathologisch onderzoek verricht aan geselecteerd zenuwweefsel.

▼B

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1 **Voorbereidingen**

Gezonde jonge volwassen hennen die geen storende virusinfecties of medicatie hebben en die een normale gang verronen worden aselect verdeeld over behandelde en controlegroepen en ten minste gedurende vijf dagen voor de aanvang van het onderzoek geacclimatiseerd aan de laborato-riumomstandigheden

De kooien of verblijven moeten zó ruim zijn. dat de hennen vrij kunnen bewegen en dat de gang van de dieren makkelijk kan warden waargenomen.

Het tot-dienen van de teststof moet iedere dag plaatsvinden, zeven dagen per week. bij voorkeur door middel van een maagsonde of gelatinecapsules. Vloeistoffen kunnen onverdund of opgelost in een geschikt vehiculum zoals maïsolie worden toegediend. Vaste stoffen moeten waar mogelijk worden opgelost omdat grote hoeveelheden vaste stof in gelatinecapsules mogelijk niet helemaal worden geresorbeerd. Van een niet-waterig vehiculum dienen de toxische eigenschappen bekend te zijn Als dit niet zo is moeten deze voor de aanvang van de proef worden bepaald.

1.4.2. **Proefomstandigheden**

Proefdieren

Het gebruik van jonge volwassen leghennen (Gallus gallus domesticus), 8-12 maanden oud, wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van gangbare rassen en stammen van normale grootte en de hennen moeten zijn gefokt onder omstandigheden die vrij bewegen mogelijk maken.

Aantal en geslacht

In het algemeen moeten ten minste drie behandelde groepen en een controlegroep (vehiculum) worden gebruikt. De controlegroep (vehiculum) wordt op dezelfde wijze behandeld als de behandelde groep; alleen het toedienen van de testof wordt achterwege gelaten.

ledere groep vogels moet uit zoveel hennen bestaan dal er ten minste zes kunnen worden gedood voor biochemische bepalingen (telkens drie op twee tijdstippen) en zes de observatieperiode van 14 dagen na de behandeling kunnen overleven ten behoeve van pathologisch onderzoek.

Dosisniveaus

De keuze dosisniveaus moet worden gemaakt met inachtneming van de resultaten van een acute test op vertraagde neurotoxiciteit en alle andere beschikbare gegevens over toxiciteit of kinetica van de teststof Het hoogste dosisniveau moet gekozen worden met het doel toxische effecten te veroorzaken, bij voorkeur vertraagde neurotoxiciteit, zonder dat deze leiden tot sterfte of duidelijk lijden. Daarna moet een dalende reeks dosisniveaus gekozen worden om het verband tussen dosis en respons aan te tonen en bij het laagste niveau te komen tot een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten.

▼B

Limiettest

Als een test op een dosisniveau van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij gebruikmaking van de beschreven procedures voor dit onderzoek geen waarneembare toxische effecten geeft en als dit, door gegevens van proeven met structureel verwante stoffen, ook niet verwacht mag worden, kan een onderzoek waarbij van een hogere dosering gebruik wordt gemaakt achterwege blijven. De limiettest is van toepassing tenzij de verwachte blootstelling bij mensen een hogere dosering noodzakelijk maakt.

Observatie periode

Alle dieren moeten ten minste eenmaal per dag worden geobserveerd gedurende de periode van blootstelling en 14 dagen daarna of totdat ze worden geobduceerd.

1.4.3. **Procedure**

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks (zeven dagen per week) aan de proefdieren toegediend.

Algemene observaties

Het observeren moet onmiddellijk na de eerste toediening beginnen. Alle hennen moeten gedurende de periode van 28 dagen waarop de stof wordt toegediend en gedurende 14 dagen daarna of totdat ze worden gedood, tenminste eenmaal per dag worden geobserveerd. Alle tekenen van toxiciteit moeten worden geregistreerd, zoals tijdstip van aanvang, soort, ernst en duur. Waarnemingen moeten onder meer, maar niet alleen, het observeren van abnormaal gedrag inhouden. Ataxie moet worden gemeten op een schaalverdeling met ten minste vier niveaus en er moet worden gelet op verlammingsverschijnselen. De hennen moeten ten minste tweemaal per week uit de kooi worden genomen voor ten periode van gedwongen motorische activiteit, zoals het beklimmen van een ladder, om het observeren van minimale toxische effecten te vergemakkelijken. Stervende dieten die hevige stress of pijn vertonen moeten, zodra dit wordt opgemerkt, worden verwijderd, op humane wijze worden gedood en worden geobduceerd.

Lichaamsgewicht

Alle dieren worden vlak voor het toedienen van de teststof en daarna minstens éénmaal per weck gewogen.

Biochemie

Zes hennen die willekeurig uit iedere behandelde en vehiculumcontrolegroep worden gekozen moeten binnen een paar dagen na toediening van de laatste dosis worden gedood. De hersenen en het lumbale ruggemerg worden geprepareerd en onderzocht op NTE-remmende effecten. Verder kan het nuttig zijn om weefsel van de nervus ischiadicus voor hetzelfde doel (NTE) te prepareren en te onderzoeken. Meestal worden van de controlegroep en alle behandelde groepen drie vogels 24 uur (en drie vogels 48 uur na de laatste dosis gedood Als gegevens van het acute onderzoek of andere (hij voorbeeld toxicokinetische) onderzoeken er op duiden dat het doden na de laatste dosis beter op een ander tijdstip kan gebeuren, dan moet dat tijdstip aangehouden worden en de motivering worden gedocumenteerd.

Bepaling van acetylcholesterinase (AChE) kan ook bij deze monsters worden uitgevoerd als dal nodig lijkt. Er kan echter spontane reactivering van AChE *in vivo* optreden; dit kan leiden tot onderschatting van de remmende werking van de teststof op AChE.

▼B

Macroscopische necropsie

Bij macroscopische necropsie van alle (volgens plan of omdat ze stervend waren) gedode dieren moet onder meer het uiterlijk van de hersenen en het ruggemerg worden onderzocht.

Histopathologisch onderzoek

Zenuwweefsel van dieren die de observatieperiode hebben overleefd en niet gebruikt zijn voor biochemisch onderzoek, moet microscopisch worden onderzocht. Het weefsel moet *in situ* worden gefixeerd door perfusietechnieken. Onder andere moeten preparaten worden gemaakt van de kleine hersenen (ongeveer halverwege de lengte-as), het verlengde merg, het ruggemerg en perifere zenuwen. De preparaten van tiet ruggemerg moeten worden genomen uit het bovenste cervicaal segment, het midden van de thoracale regio en de lumbo-sacrale regio. Ook motten er preparaten van het distale deel van de nervus tibialis, de vertakkingen hiervan naar de musculus gastrocnemius en van de nervus ischiadicus worden genomen. De preparaten moeten worden gekleurd met de juiste voor myeline en axonen specifieke kleurstoffen. In eerste instantie moet microscopisch onderzoek worden verricht op de geprepareerde weefsels van alle dieren uit de controlegroep en de groep met de hoogste dosis. Als er aanwijzingen zijn voor effecten in de groep met de hoogste dosering, moeten ook dieren uit de groepen met lagere doseringen worden onderzocht.

2. **GEGEVENS**

Indien negatieve resultaten worden behaald met betrekking tot de parameters van deze methode (biochemie, histopathologie en gedragsobservatie) is in het algemeen verder testen op vertraagde neurotoxiciteit niet nodig. Bij onduidelijke of dubbelzinnige resultaten voor deze parameters kan verdere evaluatie nodig zijn.

Er moeten individuele gegevens worden verstrekt- Verder moeten alle resultaten in tabelvorm worden gepresenteerd, waarbij voor iedere testgroep moeten worden vermeld het aantal dieren bij aanvang, het aantal dieren dat laesies of gedrags- of biochemische effecten vertoont, het soort en de ernst van deze laesies of effecten en het percentage dieren dat een bepaalde laesie of een bepaald effect in een bepaalde mate vertoont.

De bevindingen van dit onderzoek moeten worden geëvalueerd wat betreft het voorkomen, de ernst en de correlatie van gedrags-, biochemische en histopathologische effecten en ieder ander waargenomen effect bij de behandelde en de controlegroepen.

Numerieke resultaten moeten worden geïnterpreteerd met behulp van geschikte en algemeen geaccepteerde statistische methoden. De te gebruiken statistische methoden moeten bij het ontwerp van het onderzoek worden gekozen.

3. **RAPPORTAGE**

VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het rapport moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

3.1. Proefdieren:

— gebruikte stam;

— aantal en leeftijd van de dieren;

— herkomst, behuizing, enz.;

— individueel gewicht van de dieren bij het begin van de proef.

▼B

3.2. Proefomstandigheden:

— bijzonderheden over de bereiding van de teststof, de stabiliteit en homogeniteit, waar van toepassing;

— motivering van de keuze van het vehiculum;

— bijzonderheden over de toediening van de teststof;

— bijzonderheden over voedsel en water;

— motivering van de dosiskeuze;

— specificatie van de toegediende doses, met inbegrip van bijzonderheden over het vehiculum, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal,

— motivering van de keuze van andere tijden voor de biochemische bepaling dan 24 en 48 uur.

3.3. Resultaten:

— gegevens over het lichaamsgewicht;

— gegevens over de toxische respons, uitgesplitst naar dosisniveau, met inbegrip van de mortali- teit;

— niveau waarop geen schadelijke effecten werden waargenomen (NOAEL);

— aard, ernst en duur van de klinische observaties (al dan niet reversibel);

— een gedetailleerde beschrijving van de biochemische methoden en bevindingen;

— necropsieverslagen;

— ten gedetailleerde beschrijving van alle histopathologisch e bevindingen;

— statistische bewerking van de resultaten, indien dit van toepassing is.

Bespreking van de resultaten

Conclusies.

4. **LITERATUUR**

Deze methode komt overeen met TG 419 van de OESO.

▼B

B.39. *IN-VIVO* TEST OP DNA-HERSTELSYNTHESE IN LEVERCELLEN VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 486 van de OESO: in-vivo-test op DNA-herstelsynthese in levercellen van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De *in-vivo* test op DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis — UDS) in levercellen van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoften DNA-herstel in levercellen van behandelde dieren induceren (1)(2)(3)(4).

Deze in-vivotest maakt het mogelijk de genotoxische effecten van chemische stoffen in de lever te onderzoeken. Het gemeten eindpunt levert een indicatie op van de DNA-beschadiging en het herstel daarvan in lever-cellen. De lever is de plaats waar het metabolisme van geresorbeerde verbindingen zich meestal voor het grootste deel afspeelt en is derhalve een goede plaats om DNA-beschadiging *in vivo* te meten.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Het eindpunt van UDS wordt gemeten door bepaling van de opname van gelabelde nucleosiden in cellen waar geen geprogrammeerde DNA-synthese (in de S-fase) plaatsvindt. De meest gebruikte techniek is bepaling van de opname van met tritium gelabeld thymidine ('H-TdR) met behulp van autoradiografie. Bij een *in vivo* UDS-test wordt bij voorkeur gebruikgemaakt van de rattenlever. Ook andere weefsels dan de lever kunnen worden gebruikt, maar daarvoor is deze methode niet geschikt.

De detectie van een UDS-respons is afhankelijk van het aantal DNA-basen dat op de beschadigde plaats wordt verwijderd en vervangen. De UDS-test is dan ook bijzonder geschikt voor de detectie van stoffen die leiden tot vervanging van grote stukken van 20-30 basen („longpatch repair"). De gevoeligheid bij de detectie van „shortpatch repair", waarbij één tot drie basen worden vervangen, is daarentegen veel lager. Bovendien kunnen mutagene effecten een gevolg zijn van niet of verkeerd herstelde of verkeerd gerepliceerde DNA-beschadi-gingen. De intensiteit van de UDS-respons levert geen indicatie op omtrent de betrouwbaarheid van het herstelproces. Daarnaast is het mogelijk dat een mutagene stof met DNA reageert, maar dat de DNA-beschadiging niet via een excisieherstelproces wordt gerepareerd. De UDS-test levert dus niet veel specifieke informatie over een mutagene werking op, maar dit wordt gecompenseerd door de potentiële gevoeligheid van dit eindpunt omdat het in het hele genoom wordt gemeten.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Cel in herstel: een cel met een hogere nettokernkorreling (NKK) dan een vooraf bepaalde waarde, waarvoor het laboratorium dat de test uitvoert een motivering moet geven.

Nettokernkorreling: een kwantitatieve maat voor de UDS-activiteit van cellen bij een UDS-test met autoradiografie, berekend door het gemiddelde aantal cytoplasmakorrels in kern-equivalente cytoplasmagebieden (CK) af te trekken van het aantal kernkorrels (KK): NKK = NK — CK. De NKK wordt per cel apart berekend en vervolgens samengevoegd voor cellen in een cultuur, in parallelle culturen, enz.

▼B

DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis — UDS): herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De *in vivo* UDS-test in levercellen van zoogdieren levert een indicatie op van de herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens. Meestal is de test gebaseerd op de inbouw van ^{3}H-TdR in het DNA van levercellen met een geringe frequentie van cellen in de S-fase van de celcyclus. De opname van ^{3}H-TdR wordt meestal bepaald met behulp van autoradiografie. aangezien deze techniek niet zo gevoelig is voor storing door cellen in de S-fase als bijvoorbeeld vloeistofscintillatietelling.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Voorbereiding**

1.4.1.1. *Keuze van de diersoort*

Meestal worden ratten gebruikt, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal ±20 % van het gemiddelde gewicht van eik geslacht bedragen.

1.4.1.2. *Huisvesting en voeding*

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. *Voorbereiding van de dieren*

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselect ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie en blijven voordat de test begint minimaal vijf dagen in hun kooi om in het laboratorium te acclimatiseren.

1.4.1.4. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspendeerd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. **Testomstandigheden**

1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

▼B

1.4.2.2. *Controles*

In elk onafhankelijk uitgevoerd deel van het experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt waarvan bekend is dat deze tot UDS leidt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. Wanneer voor een positieve controle metabole activering nodig is, moet de dosering zodanig worden gekozen dat de respons gematigd is (4). De doseringen kunnen zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt:

Stof Bemonsteringstijdstip	Stut	CAS-nr	Einecs-nr.
Vroeg (2-4 uur)	N'-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-249-8
Laat (12-16 uur)	N-Fluoreen-2-ylaceetamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ook andere geschikte stollen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof.

1.5. UITVOERING

1.5.1. **Aantal en geslacht van de dieren**

Er moet een afdoende aantal dieren worden gebruikt om rekening te houden met de natuurlijke biologische variatie in de respons op de test. Elke groep moet minimaal drie analyseerbare dieren bevatten. Wanneer er een significant basisbestand met gegevens uit het verleden is opgebouwd, zijn er voor de gelijktijdige negatieve en positieve controlegroepen slechts één o(twee dieren nodig.

Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht, bij voorkeur mannetjes, uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals dit bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

1.5.2. **Behandelingsschema**

De teststof wordt in het algemeen in één behandeling toegediend.

1.5.3. **Dosisniveaus**

Normaal gesproken worden er ten minste twee dosisniveaus gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. In het algemeen wordt als laagste dosis 25-50 % van de hoogste dosis gebruikt.

▼B

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek.

De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit in de lever oplevert (bv. pyknotische kernen).

1.5.4. **Limiettest**

Als een test met één dosis van minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau, bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. **Toediening van de doses**

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Intra-peritoneale toediening wordt echter niet aanbevolen, aangezien de lever dan rechtstreeks aan de teststof kan worden blootgesteld in plaats van via de bloedsomloop, tiet maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. **Levercelpreparaten**

Normaal gesproken worden twaalf tot 1» uur na de toediening van de teststof levercelpreparaten van de behandelde dieren gemaakt. Meestal is ook een eerder bemonsteringstijdstip (normaal gesproken twee tot vier uur na de behandeling! nodig, tenzij er op twaalf tot 16 uur een duidelijke positieve reactie is. Er kunnen echter ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt, wanneer daarvoor op basis van toxicokinetische gegevens een motivering kan worden gegeven.

Meestal worden kortetermijnculturen van zoogdierlevercellen gemaakt door de lever *in situ* met collagenase te perfuseren en de net losgemaakte levercellen zich te laten hechten aan een geschikt oppervlak. De levercellen van dieren uit de negatieve controlegroep moeten een levensvatbaarheid (5) van ten minste 50 % hebben

1.5.7. **Bepaling van de UDS**

Net geïsoleerde zoogdierlevercellen worden gedurende een geschikte periode, bijvoorbeeld drie tot acht uur, geïncubeerd met een medium dat meestal ^{3}H-TdR bevat. Aan het eind van de incubatieperiode worden de cellen uit het medium verwijderd en kunnen ze vervolgens worden geïncubeerd met medium dat een overmaat ongelabeld thymidine bevat, om de niet ingebouwde radioactiviteit te verdrijven („cold chase”). De cellen worden vervolgens gespoeld, gefixeerd en gedroogd. Bij een langduriger incubatietijd zal de „cold chase” wellicht niet nodig zijn. De objectglaasjes worden in autoradiografischc emulsie gedoopt, in het donker belicht (bv. gekoeld gedurende zeven tot 14 dagen), ontwikkeld en gekleurd, waarna de belichte zilverkorrels worden geteld. Voor elk dier worden twee tot drie objectglaasjes geprepareerd.

▼B

1.5.8. **Analyse**

De geprepareerde objectglaasjes moeten voldoende cellen met een normale morfologie bevatten om een zinvolle bepaling van de UDS mogelijk te maken. De preparaten worden microscopisch onderzocht op tekenen van duidelijke cytotoxiciteit (bv. pyknose of een verlaagd gehalte aan het radioactieve isotoop).

De objectglaasjes worden vóór het tellen van de korrels gecodeerd. Normaal gesproken worden voor elk dier 100 cellen van ten minste twee objectglaasjes gescoord. Voor het scoren van minder dan 100 cellen per dier moet een motivering worden gegeven.

Kr worden geen korrels geteld bij cellen waarvan de kern in de S-fase is, maar het relatieve aantal cellen in de S-fase kan wel geregistreerd worden.

Met behulp van geschikte methoden wordt aan de hand van de neergeslagen zilverkorrels de hoeveelheid ingebouwd ^{3}H-TdR in de kern en het cytoplasma van morfologisch normale cellen bepaald.

2. **GEGEVENS**

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk objectglaasje en elk dier apart worden verstrekt. Daarnaast moet een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden gegeven. Voor elke cel, voor elk dier en voor elke dosis en tijd wordt de nettokernkorreling (NKK) berekend volgens de formule: NKK = NK — CK. Als het aantal „cellen in herstel” wordt geteld, moet een motivering worden gegeven voor de criteria voor de definitie van „cel in herstel” op basis van de resultaten bij in het verleden of tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles. De numerieke resultaten kunnen met behulp van statistische methoden worden geëvalueerd. Als statistische tests worden gebruikt, moeten deze vóór de uitvoering van het onderzoek worden gekozen en gemotiveerd.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Criteria voor een positieve/negatieve respons zijn bijvoorbeeld:

Positief	i)	NKK-waarden boven een vooraf bepaalde drempelwaarde die op basis van gegevens van het laboratorium uit het verleden wordt gemotiveerd;
of	ii)	NKK-waarden die significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.
Negatief	i)	NKK-waarden binnen/onder de controledrempelwaarde uit het verleden:
of	ii)	NKK-waarden die niet significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.

▼B

Er moet naar de biologische relevantie van de gegevens worden gekeken. Daarbij moet bijvoorbeeld rekening worden gehouden met parameters als de spreiding over dieren, het verband tussen dosis en respons en de cytotoxiciteit. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststot in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de UDS-test met levercellen van zoogdieren *in vivo* wijzen erop dat een teststof *in vivo* DNA-beschadigingen in levercellen van zoogdieren induceert, die *in vitro* door DNA-herstelsynthese kunnen worden gerepareerd. Negatieve resultaten wijzen erop dat de teststof onder de testomstandigheden geen DNA-beschadigingen induceert die met deze test kunnen worden gedetecteerd.

De waarschijnlijkheid dat de teststof in cc grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomt (syste-mische toxiciteit), dient te worden besproken.

3. **RAPPORTAGE**

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Oplosmiddel/Medium:

— Motivering voor de keuze van het medium.

— Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren:

— Gebruikte soort/stam.

— Aantal, leeftijd en geslacht van de dieren.

— Herkomst, huisvesting, voeding, enz.

— Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden:

— Positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles.

— Gegevens uit het oriënterende onderzoek, indien dit is uitgevoerd.

— Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus.

— Gegevens over de bereiding van de teststof.

— Gegevens over de toediening van de teststof.

— Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg.

— Methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing.

▼B

— Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing.

— Gegevens over de kwaliteit van het \oer en het drinkwater.

— Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema.

— Methoden voor de meting van de toxiciteit.

— Methoden voor het kweken en prepareren van de levercellen.

— Gebruikte autoradiografietechniek.

— Aantal geprepareerde objectglaasjes en aantal gescoorde cellen.

— Criteria voor de beoordeling.

— Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten:

— Waarden voor de kernkorrels, de cytoplasmakorrels en de nettokernkorreling voor elk objectglaasje apart, — gemiddeld voor elk dier en gemiddeld per groep.

— Indien beschikbaar het verband tussen dosis en respons.

— Eventuele statistische analyses.

— Tekenen van toxiciteit.

— Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles.

— Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

— Aantal „cellen in herstel”, indien bepaald.

— Aantal cellen in de S-fase, indien bepaald.

— Levensvatbaarheid van de cellen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

(1) Ashby, j. Lefevre, P.A.., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis,). Probst, G. and Williams, G. (1987); A Protocol and Guide tor the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res., 189, pp. 123-133.

(3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, IS., 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 Muta- genicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Mel- bourne, Sydney, pp. 5 2-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean. S.W., Andrae, U., Brambilla. G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, CA. and Mori, H. (199 3). Recommendations tor the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, Mutation Res., 312, pp. 26 3-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo*/*In Vitro* DNA Repair Assay (UD.Sj. Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *in Vivo*/*In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553-562.

▼B

B.40. ***IN VITRO* -HUIDCORROSIE: TEST OP BASIS VAN DE TRANSCUTANE ELEKTRISCHE WEERSTAND (TEW)**

1. **METHODE**

Deze testmethode komt overeen met OESO TG 430 (2004).

1.1. INLEIDING

Onder huidcorrosie wordt verstaan: het ontstaan van irreversibele weefselschade in de huid na het aanbrengen van een testmateriaal [zoals gedefinieerd in het GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labelling of Chemicals, wereldwijd geharmoniseerd stelsel voor de indeling en etikettering van chemische stoffen] (1). Bij deze testmethode wordt de corrosiviteit bepaald volgens een procedure waarbij geen levende dieren worden gebruikt.

De bepaling van de huidcorrosiviteit ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren (2). Vanwege de pijn en het lijden van dieren waarvan bij deze procedure sprake was, is testmethode B.4 zodanig aangepast dat huidcorrosie met behulp van alternatieve *in vitro*-methoden kan worden bepaald, zodat pijn en lijden bij dieren kunnen worden vermeden.

Als eerste stap op weg naar de vaststelling van alternatieve tests die voor de bepaling van de huidcorrosiviteit met het oog op regelgeving kunnen worden gebruikt, zijn er prevalideringsstudies uitgevoerd (3). Daarna is een formele valideringsstudie van *in vitro*-methoden voor de bepaling van de huidcorrosie (4)(5) uitgevoerd (6)(7)(8). Het resultaat van deze studies en andere gepubliceerde literatuur hebben geleid tot de aanbeveling dat de volgende tests voor de bepaling van de *in vivo*-huidcorrosiviteit kunnen worden gebruikt (9)(10)(11): de test met het humane huidmodel (zie testmethode B.40 bis) en de test op basis van de transcutane elektrische weerstand (deze methode).

Op grond van een valideringsstudie en andere gepubliceerde studies is gerapporteerd dat met de bepaling op basis van de transcutane elektrische weerstand (TEW) bij rattenhuid (12)(13) een betrouwbaar onderscheid kan worden gemaakt tussen stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief c.q. niet-corrosief voor de huid zijn (5)(9).

Met de in deze methode beschreven test kunnen corrosieve chemische stoffen en mengsels worden geïdentificeerd. Daarnaast kunnen ook niet-corrosieve stoffen en mengsels worden geïdentificeerd wanneer ter ondersteuning de bewijskracht wordt bepaald met behulp van andere bestaande informatie (b.v. pH, structuur/activiteitrelaties en gegevens over mens en/of dier) (1)(2)(11)(14). De test levert geen informatie over huidirritatie op en ook een onderverdeling van corrosieve stoffen zoals in het GHS (1) is niet mogelijk.

Voor een volledige beoordeling van lokale huideffecten na één blootstelling op de huid wordt aanbevolen de sequentiële teststrategie te volgen die als bijlage bij testmethode B.4 (2) is opgenomen en ook in het GHS (1) wordt beschreven. Deze teststrategie behelst de uitvoering van *in vitro*-tests op huidcorrosie (zoals in deze methode wordt beschreven) en huidirritatie voordat tests op levende dieren worden overwogen.

▼B

1.2. DEFINITIE

Huidcorrosie *in vivo*: het ontstaan van een irreversibele beschadiging van de huid, namelijk zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het aanbrengen van een teststof gedurende ten hoogste vier uur. Corrosieve reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloederige korsten en aan het eind van de observatie na 14 dagen door verkleuring ten gevolge van het verbleken van de huid, stukken huidoppervlak die kaal geworden zijn en littekens. Om twijfelachtig letsel te evalueren moet histopathologie worden overwogen.

Transcutane elektrische weerstand (TEW): een maat voor de elektrische impedantie van de huid, uitgedrukt als elektrische weerstand in kiloOhm. Dit is een eenvoudige en krachtige methode om de barrièrefunctie te bepalen door de passage van ionen door de huid met behulp van een brug van Wheatstone te registreren.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Tabel 1:

Referentiestoffen

Naam	EINECS-nr.	CAS-nr.	
1,2-Diaminopropaan	201-155-9	78-90-0	Sterk corrosief
Acrylzuur	201-177-9	79-10-7	Sterk corrosief
2-tert. Butylfenol	201-807-2	88-18-6	Corrosief
Kaliumhydroxide (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosief
Zwavelzuur (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosief
Octaanzuur (caprylzuur)	204-677-5	124-07-02	Corrosief
4-Amino-1,2,4-triazool	209-533-5	584-13-4	Niet corrosief
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Niet corrosief
Fenethylbromide	203-130-8	103-63-9	Niet corrosief
Tetrachloorethyleen	204-825-9	27-18-4	Niet corrosief
Isostearinezuur	250-178-0	30399-84-9	Niet corrosief
4-(Methylthio)benzaldeh yd	222-365-7	3446-89-7	Niet corrosief

De meeste vermelde chemische stoffen zijn afkomstig van de lijst van chemische stoffen die voor de internationale valideringsstudie van het ECVAM zijn gekozen (4). Ze zijn aan de hand van de volgende criteria gekozen:

i) een gelijk aantal corrosieve en niet-corrosieve stoffen;

▼B

ii) in de handel verkrijgbare stoffen waarmee de meeste relevante chemische categorieën worden bestreken;

iii) opneming van stoffen die sterk corrosief zijn en stoffen die minder corrosief zijn om onderscheid te kunnen maken op basis van de corrosiepotentie;

iv) keuze van chemische stoffen die in een laboratorium kunnen worden gebruikt zonder andere ernstige gevaren op te leveren dan corrosiviteit.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Het testmateriaal wordt gedurende maximaal 24 uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van huidschijfjes in een testsysteem met twee compartimenten waarin de huidschijfjes als scheiding tussen de compartimenten fungeren. De huidschijfjes worden weggenomen uit de huid van op humane wijze gedode ratten met een leeftijd van 28-30 dagen. Corrosief materiaal wordt gekenmerkt doordat het een verlies van de normale intacte staat en barrièrefunctie van het stratum corneum kan veroorzaken, dat wordt gemeten als een daling van de TEW tot onder een drempelwaarde (12). Voor de TEW bij rattenhuid is een drempelwaarde van 5 kΩ gekozen op basis van uitgebreide gegevens voor een breed scala van chemische stoffen, waarbij de overgrote meerderheid van de waarden duidelijk boven (vaak > 10 kΩ) of duidelijk onder (vaak < 3 kΩ) deze waarde lag (12). In het algemeen verlagen materialen die bij dieren niet corrosief zijn maar wel irriterend of niet-irriterend, de TEW niet tot onder de drempelwaarde. Bovendien kan het gebruik van andere huidpreparaten of andere apparatuur deze drempelwaarde veranderen, zodat een verdere validering nodig is.

In de testprocedure wordt een kleurstofbindende stap opgenomen als bevestigende test voor positieve resultaten bij de TEW, onder andere voor waarden rond de 5 kΩ. Met de kleurstofbindende stap wordt bepaald of de toename van de permeabiliteit voor ionen door een fysieke vernietiging van het stratum corneum wordt veroorzaakt. Er is aangetoond dat met de TEW-methode met rattenhuid een prognose kan worden gegeven voor de *in vivo*-bepaling van de corrosiviteit bij het konijn volgens testmethode B.4 (2). Er dient te worden opgemerkt dat de *in vivo*-test bij het konijn ten aanzien van huidcorrosiviteit en huidirritatie zeer conservatief is in vergelijking met de test met een humane huidpatch (15).

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Dieren**

Omdat de gevoeligheid van de huid van ratten voor chemische stoffen bij deze test al eerder is aangetoond (10), wordt de voorkeur gegeven aan deze species. De leeftijd (wanneer de huid wordt weggenomen) en de stam van de rat zijn heel belangrijk om ervoor te zorgen dat de haarfollikels in de rustfase verkeren voordat de volwassen haargroei begint.

▼B

Het haar op de rug en de flanken van jonge (ongeveer 22 dagen oude) mannetjes- of vrouwtjesratten (Wistar of een vergelijkbare stam) wordt met een kleine schaar zorgvuldig verwijderd. De dieren worden vervolgens gewassen door zorgvuldig te wrijven terwijl het geknipte gebied wordt ondergedompeld in een antibiotica-oplossing (die bijvoorbeeld streptomycine, penicilline, chlooramfenicol en amfotericine bevat in concentraties die werkzaam zijn voor het remmen van de groei van bacteriën). De dieren worden op de derde of vierde dag na de eerste keer wassen opnieuw met antibiotica gewassen en worden binnen drie dagen na de tweede keer wassen, wanneer het stratum corneum zich van de verwijdering van het haar hersteld heeft, gebruikt.

1.5.2. **Het prepareren van de huidschijfjes**

De dieren worden op humane wijze gedood wanneer ze 28-30 dagen oud zijn; deze leeftijd is van cruciaal belang. Vervolgens wordt de huid van de rug en de flanken van elk dier verwijderd en van overtollig onderhuids vet ontdaan door het voorzichtig van de huid los te trekken. Daarna worden er huidschijfjes verwijderd met een diameter van ongeveer 20 mm per stuk. De huid mag worden bewaard voordat de schijfjes worden gebruikt, wanneer wordt aangetoond dat de gegevens van de positieve en negatieve controles gelijkwaardig zijn aan die van verse huid.

Elk huidschijfje wordt over een van de uiteinden van een PTFE-buis (polytetrafluoretheen) gelegd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat het oppervlak van de epidermis in contact met de buis is. Een rubber „O”-ring wordt strak over het uiteinde van de buis geschoven om de huid op zijn plaats te houden en het overtollige weefsel wordt weggeknipt. In figuur 2 worden de afmetingen van de buis en de „O”-ring aangegeven. Vervolgens wordt de rubber „O”-ring zorgvuldig met vaseline aan de PTFE-buis vastgekit. De buis wordt met een klemring vastgezet in een receptorcompartiment dat een $MgSO_4$-oplossing (154 mM) bevat (figuur 1). Het huidschijfje moet volledig in de $MgSO_4$-oplossing worden ondergedompeld. Van één rattenhuid kunnen wel 10-15 huidschijfjes worden gemaakt.

Voordat de test begint, wordt als kwaliteitsborgingsprocedure voor elke rattenhuid de elektrische weerstand van twee huidschijfjes gemeten. Als bij beide schijfjes een weerstand van meer dan 10 kΩ wordt gemeten, mogen de overige schijfjes voor de test worden gebruikt. Als de gemeten weerstand lager dan 10 kΩ is, mogen de overige schijfjes van die huid niet worden gebruikt.

1.5.3. **Aanbrengen van de test- en controlestoffen**

Voor elke studie moeten parallelle positieve en negatieve controles worden gebruikt om na te gaan of het experimentele model afdoende functioneert. Er moeten huidschijfjes van één dier worden gebruikt. Als positieve en negatieve controlestof worden respectievelijk 10 M zoutzuur en gedestilleerd water aanbevolen.

Vloeibare teststoffen (150 µl) worden gelijkmatig op het oppervlak van de epidermis in de buis aangebracht. Wanneer vast materiaal wordt getest, wordt een zodanige hoeveelheid van de vaste stof gelijkmatig op het schijfje aangebracht, dat het hele oppervlak van de epidermis bedekt is. Vervolgens wordt gedeïoniseerd water (150 µl) boven op de vaste stof toegevoegd en wordt de buis voorzichtig geschud. Om voor een maximaal contact met de huid te zorgen kan het nodig zijn dat vaste stoffen tot 30 ^{o}C worden verwarmd om de teststof te laten smelten of zachter te maken of worden fijngemalen om een korrelig materiaal of poeder te verkrijgen.

▼B

Voor elke test- en controlestof worden drie huidschijfjes gebruikt. De teststoffen worden gedurende 24 uur bij 20-23 °C aangebracht. De teststof wordt verwijderd door onder een straal leidingwater van maximaal 30 °C te wassen tot er geen materiaal meer kan worden verwijderd.

1.5.4. **TEW-metingen**

De impedantie van de huid wordt als TEW gemeten met een wisselstroommeetbrug van Wheatstone voor zwakstroom (13). Algemene specificaties van de brug zijn: bedrijfsspanning 1-3 Volt, een sinusvormige of rechthoekige wisselstroom van 50-1 000 Hz en een meetbereik van ten minste 0,1-30 kΩ. Met de bij de valideringsstudie gebruikte meetbrug konden inductantie, capacitantie en weerstand worden gemeten tot waarden van respectievelijk 2 000 H, 2 000μF en 2 MΩ, bij frequenties van 100 Hz of 1 kHz, met seriële of parallelle waarden. Voor de TEW-corrosiviteitsbepaling worden de metingen geregistreerd in weerstand bij een frequentie van 100 Hz en met seriële waarden. Alvorens de elektrische weerstand te meten wordt de oppervlaktespanning van de huid verlaagd door zoveel 70 % ethanol toe te voegen dat de epidermis bedekt is. Na enkele seconden wordt de ethanol uit de buis verwijderd en wordt het weefsel gehydrateerd door 3 ml $MgSO_4$-oplossing (154 mM) toe te voegen. De elektroden van de meetbrug worden aan weerszijden van het huidschijfje geplaatst om de weerstand in kΩ/huidschijfje te meten (zie figuur 1). De afmetingen van de elektrode en de lengte van het stuk elektrode dat onder de krokodillenklem uitkomt, zijn vermeld in figuur 2. De klem van de binnenste elektrode rust tijdens de weerstandsmeting op de bovenkant van de PTFE-buis om ervoor te zorgen dat steeds een even lang stuk van de elektrode in de $MgSO_4$-oplossing steekt. De buitenste elektrode wordt zodanig in het receptorcompartiment geplaatst dat deze op de bodem van het compartiment rust. De afstand tussen de klemring en de onderkant van de PTFE-buis wordt constant gehouden (zie figuur 2), aangezien deze afstand de gemeten weerstand beïnvloedt. Dit houdt in dat de afstand tussen de binnenste elektrode en het huidschijfje constant en minimaal moet zijn (1-2 mm).

Als de gemeten weerstand hoger is dan 20 kΩ, kan dit worden veroorzaakt door de resten van de teststof waarmee het oppervlak van de epidermis van het huidschijfje bedekt is. Deze laag kan men verder trachten te verwijderen door bijvoorbeeld de PTFE-buis met de duim (met handschoen) dicht te houden en gedurende ongeveer 10 seconden te schudden. De $MgSO_4$-oplossing wordt weggegooid en de weerstandsmeting wordt met verse $MgSO_4$-oplossing herhaald.

De eigenschappen en afmetingen van de gebruikte testapparatuur en de testprocedure kunnen de gevonden TEW-waarden beïnvloeden. De drempelwaarde voor corrosie van 5 kΩ is bepaald op grond van gegevens die met de specifieke hier beschreven apparatuur en procedure zijn verkregen. Als de testomstandigheden worden gewijzigd of andere apparatuur wordt gebruikt, zullen de drempel- en controlewaarden dan ook wellicht verschillen. Daarom moeten de methodologie en de drempelwaarden voor de weerstand worden gekalibreerd door een aantal referentiestandaards te testen die worden gekozen uit de chemische stoffen die bij de valideringsstudie zijn gebruikt (4)(5) of uit vergelijkbare chemische categorieën als de chemische stoffen die worden bestudeerd. In tabel 1 is een verzameling geschikte referentiestoffen opgenomen.

▼B

1.5.5. **Kleurstofbindingsmethoden**

Blootstelling aan bepaalde niet-corrosieve materialen kan leiden tot een daling van de weerstand tot onder de drempelwaarde van 5 kΩ, waardoor ionen het stratum corneum kunnen passeren en de elektrische weerstand daalt (5). Neutrale organische stoffen en chemische stoffen met oppervlakteactieve eigenschappen (zoals detergenten, emulgatoren en andere surfactanten) kunnen huidlipiden verwijderen waardoor de permeabiliteit van de barrière voor ionen toeneemt. Dit betekent dat er, als de TEW-waarden van teststoffen lager zijn dan 5 kΩ of rond deze waarde liggen en er geen sprake is van visuele schade, een bepaling van de kleurstofpenetratie bij de controles en de behandelde weefsels dient te worden uitgevoerd om vast te stellen of de gemeten TEW-waarden het gevolg zijn van een toegenomen permeabiliteit van de huid of huidcorrosie (3)(5). Wanneer in het laatste geval het stratum corneum beschadigd is, penetreert de kleurstof sulforhodamine B snel na aanbrengen op het huidoppervlak en kleurt deze het weefsel daaronder. Deze specifieke kleurstof is stabiel voor een breed scala van chemische stoffen en wordt niet beïnvloed door onderstaande extractieprocedure.

1.5.5.1. *Aanbrengen en verwijderen van de kleurstof sulforhodamine B*

Na de TEW-bepaling wordt de magnesiumsulfaatoplossing uit de buis verwijderd en wordt de huid zorgvuldig onderzocht op zichtbare beschadiging. Als er geen zichtbare significante beschadiging is, wordt 150 µl van een 10 %-verdunning (g/v) van de kleurstof sulforhodamine B (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS-nummer 222-529-8; CAS-nummer 3520-42-1) in gedestilleerd water gedurende twee uur op het oppervlak van de epidermis van elk huidschijfje aangebracht. De huidschijfjes worden vervolgens gedurende ongeveer 10 seconden met leidingwater van ten hoogste kamertemperatuur gewassen om een eventuele overmaat of ongebonden kleurstof te verwijderen. Elk huidschijfje wordt voorzichtig van de PTFE-buis verwijderd en in een flesje (bv. een glazen scintillatieflesje van 20 ml) met gedeïoniseerd water (8 ml) gelegd. De flesjes worden gedurende 5 minuten zachtjes geschud om eventueel nog resterende ongebonden kleurstof te verwijderen. Daarna wordt deze wasprocedure herhaald en vervolgens worden de huidschijfjes in flesjes met 5 ml 30 % (g/v) natriumdodecylsulfaat (SDS) in gedestilleerd water gelegd en een nacht bij 60 °C geïncubeerd.

Na incubatie wordt elk huidschijfje verwijderd en weggegooid en wordt de resterende oplossing gedurende 8 minuten bij 21 °C gecentrifugeerd (relatieve centrifugale kracht ~ 175 × g). Vervolgens wordt 1 ml van het supernatans 1:5 (v/v) [d.w.z. 1 ml + 4 ml] verdund met 30 % (g/v) SDS in gedestilleerd water. De optische dichtheid (OD) van de oplossing wordt bij 565 nm gemeten.

1.5.5.2. *Berekening van het kleurstofgehalte*

Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B per schijfje wordt berekend uit de OD-waarden (5) (de molaire extinctiecoëfficiënt van de kleurstof sulforhodamine B bij 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$ en het molecuulgewicht = 580). Het gehalte aan de kleurstof wordt voor elk huidschijfje bepaald door een geschikte kalibratiecurve te gebruiken en vervolgens wordt voor de duplo's een gemiddeld kleurstofgehalte berekend.

2. **GEGEVENS**

De weerstand (in kΩ) en, indien van toepassing, het gemiddelde kleurstofgehalte (in Hg/schijfje) voor het testmateriaal en de positieve en negatieve controles worden in tabelvorm gerapporteerd (gegevens van de experimenten afzonderlijk en gemiddelden ± standaarddeviatie), met vermelding van gegevens voor duplobepalingen, herhaalde bepalingen, gemiddelden en de afzonderlijke waarden.

▼B

2.1. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De gemiddelde TEW-resultaten worden geaccepteerd als de parallelle positieve en negatieve controlewaarden binnen het voor de methode in het testlaboratorium aanvaardbare bereik liggen. Het aanvaardbare weerstandsbereik voor de in het voorgaande beschreven methodologie en apparatuur wordt in onderstaande tabel vermeld:

Controle	Stof	Weerstands-bereik (kΩ)
Positief	10 M zoutzuur	0,5-1,0
Negatief	Gedestilleerd water	10-25

De gemiddelde resultaten voor de kleurstofbinding worden geaccepteerd, mits de parallelle controlewaarden binnen het voor de methode aanvaardbare bereik liggen. Als aanvaardbaar bereik voor het kleurstofgehalte bij de controlestoffen voor de in het voorgaande beschreven methodologie en apparatuur wordt voorgesteld:

Controle	Stof	Bereik kleurstofge-halte (µg/schijf)
Positief	10 M zoutzuur	40-100
Negatief	Gedestilleerd water	15-35

De teststof wordt als niet-corrosief voor de huid beschouwd:

i) als de gemiddelde TEW-waarde voor de teststof hoger dan 5 kΩ is of

ii) als de gemiddelde TEW-waarde niet hoger dan 5 kΩ is en

— het huidschijfje geen duidelijke beschadiging vertoont en

— het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje duidelijk lager is dan het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje van de parallel behandelde positieve controle met 10 M HCl.

De teststof wordt als corrosief voor de huid beschouwd:

i) als de gemiddelde TEW-waarde niet hoger dan 5 kΩ is en het huidschijfje duidelijk beschadigd is of

ii) als de gemiddelde TEW-waarde niet hoger dan 5 kΩ is en

— het huidschijfje geen duidelijke beschadiging vertoont maar

— het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje ten minste gelijk is aan het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje van de parallel behandelde positieve controle met 10 M HCl.

▼B

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTRAPPORT

In het testrapport moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Test- en controlestoffen:

— de chemische naam of namen, zoals de IUPAC- of de CAS-naam, en het CAS-nummer, indien dit bekend is;

— de zuiverheid en de samenstelling van de stof of het preparaat (in gewichtsprocent) en de fysische toestand;

— fysisch-chemische eigenschappen, zoals de fysische toestand, de pH, de stabiliteit, de oplosbaarheid in water, die voor de uitvoering van het onderzoek relevant zijn;

— de behandeling van de test- en controlestoffen vóór de test, indien van toepassing (bv. verwarmen of fijnmalen);

— de stabiliteit, indien bekend.

Proefdieren:

— gebruikte stam en geslacht;

— leeftijd van de dieren wanneer ze als donordieren worden gebruikt;

— bron, huisvestingsomstandigheden, voer enz.;

— gedetailleerde gegevens over het prepareren van de huid

Testomstandigheden:

— kalibratiecurves voor de testapparatuur;

— kalibratiecurves voor de resultaten voor de kleurstofbindingstest;

— gedetailleerde gegevens over de voor de TEW-metingen gebruikte testprocedure;

— gedetailleerde gegevens over de voor de bepaling van de kleurstofbinding gebruikte testprocedure, indien van toepassing;

— een beschrijving van eventuele wijzigingen in de testprocedure;

— een beschrijving van de gebruikte evaluatiecriteria.

Resultaten:

— een tabel met de gegevens van de bepaling van de TEW en de kleurstofbinding (indien van toepassing) voor afzonderlijke dieren en afzonderlijke huidmonsters;

— een beschrijving van waargenomen effecten.

Bespreking van de resultaten.

Conclusie.

4. **REFERENTIES**

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. Testmethode B.4. Acute toxiciteit: Huidirritatie/corrosie.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, DJ., 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., Holzhiitter, 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, 62 pp.

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, 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, 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.mehs.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, 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 inter-laboratory trial. Toxic, *in Vitro* 6, 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: 709-720.

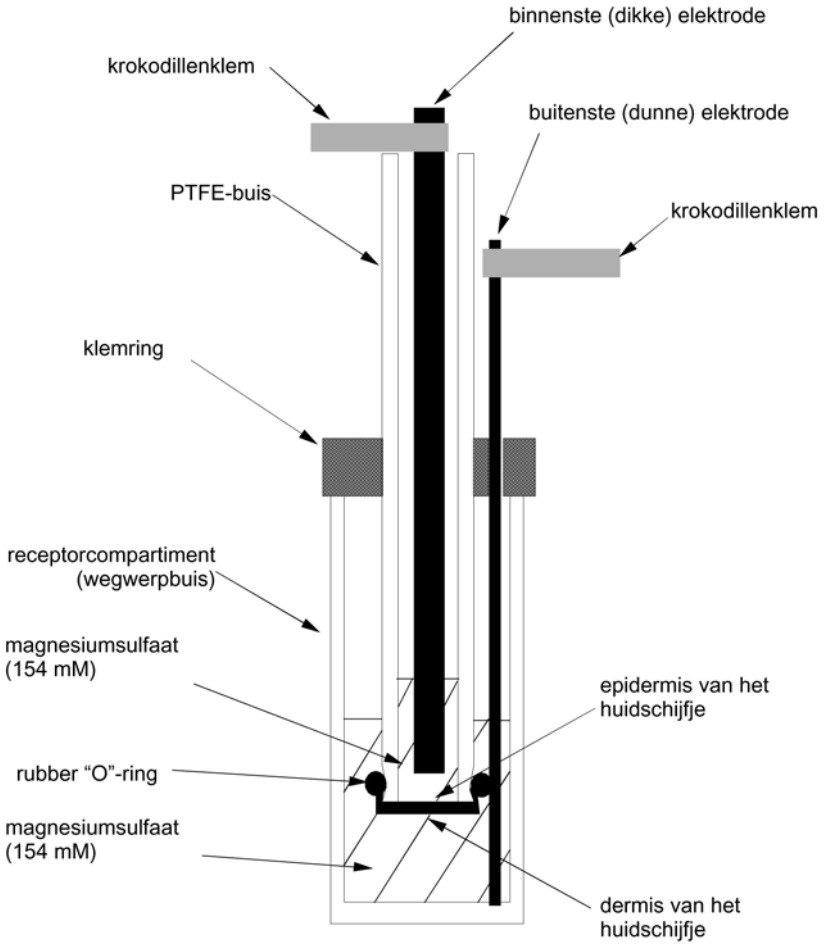
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845- 852.

16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An *In Vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. *in Vitro*. 2, 7-17.

▼B

Figuur 1:

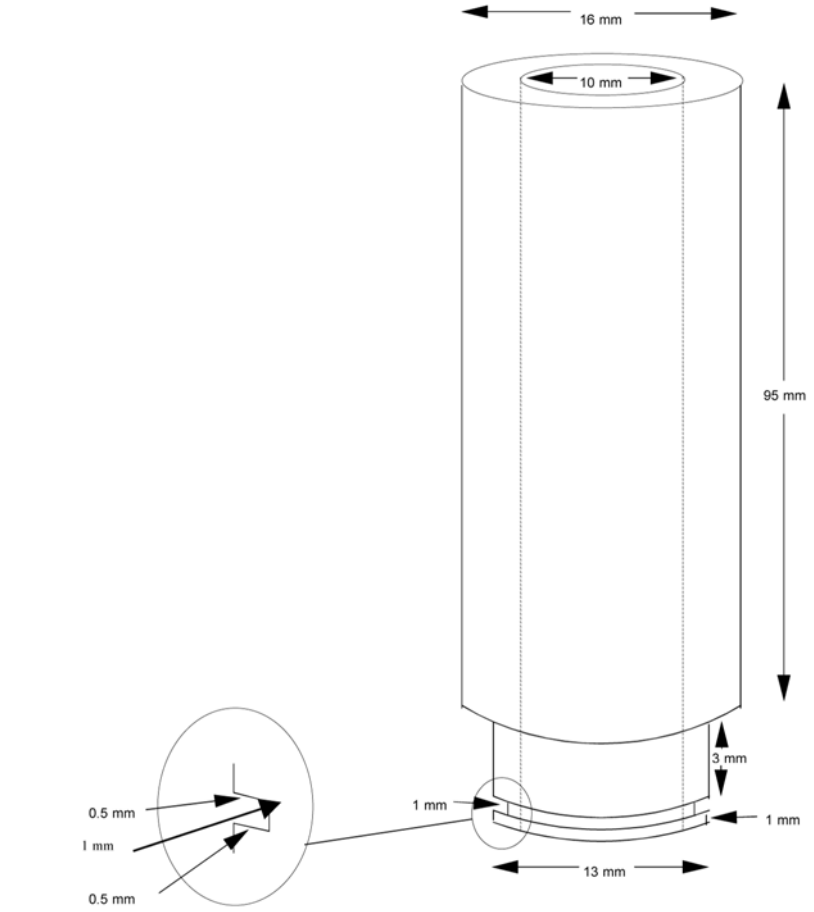
Apparatuur voor de TEW-bepaling bij rattenhuid binnenste (dikke) elektrode

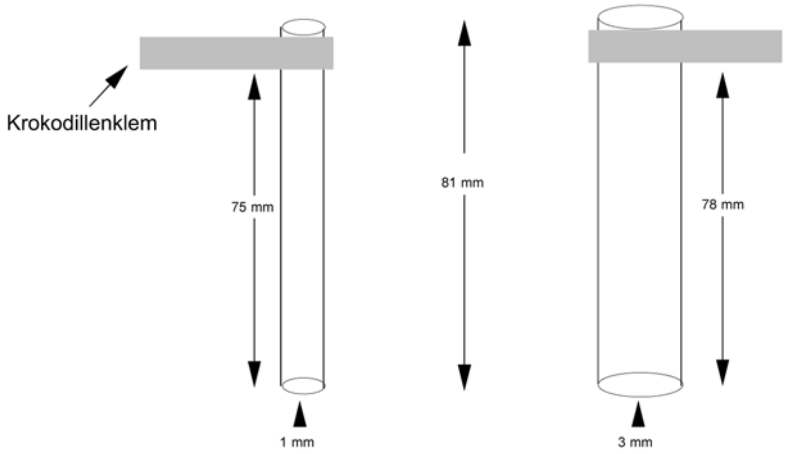


▼B

Figuur 2:

Afmetingen van de PTFE-buis (polytetrafluoretheen) en het receptorcompartiment en de gebruikte elektroden





▼B

Kritische factoren van bovenstaande apparatuur:

— de binnendiameter van de PTFE-buis;

— de lengte van de elektroden in vergelijking met de PTFE-buis en het receptorcompartiment, zodat de elektroden het huidschijfje niet raken en altijd een even lang stuk van de elektrode in contact met de $MgSO_4$-oplossing is;

— de hoeveelheid $MgSO_4$-oplossing in het receptorcompartiment moet zodanig zijn dat het vloeistofniveau lager is dan in de PTFE-buis (zie figuur 1);

— het huidschijfje moet stevig genoeg op de PTFE-buis worden bevestigd, zodat de elektrische weerstand een reële maat voor de eigenschappen van de huid is.

▼B

B.40 BIS. *IN-VITRO* HUIDCORROSIE: TEST MET HUMAAN HUIDMODEL

1. METHODE

Deze testmethode komt overeen met OESO TG 431 (2004).

1.1. INLEIDING

Onder huidcorrosie wordt verstaan: het ontstaan van irreversibele weefselschade in de huid na het opbrengen van een testmateriaal (zoals gedefinieerd in het GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labelling of Chemicals, wereldwijd geharmoniseerd stelsel voor de indeling en etikettering van chemische stoffen) (1). Bij deze testmethode behoeven voor de bepaling van de huidcorrosiviteit geen levende dieren of dierlijk weefsel te worden gebruikt.

De bepaling van de huidcorrosiviteit ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren (2). Vanwege de pijn en het lijden van dieren waarvan bij deze procedure sprake was, is testmethode B.4 zodanig aangepast dat huidcorrosie met behulp van alternatieve in-vitro methoden kan worden bepaald, zodat pijn en lijden bij dieren kunnen worden vermeden.

Als eerste stap op weg naar de vaststelling van alternatieve tests die voor de bepaling van de huidcorrosiviteit met het oog op regelgeving kunnen worden gebruikt, zijn er prevalideringsstudies uitgevoerd (3). Daarna is een formele valideringsstudie van in-vitro methoden voor de bepaling van de huidcorrosie (4)(5) uitgevoerd (6)(7)(8). Het resultaat van deze studies en andere gepubliceerde literatuur (9) hebben geleid tot de aanbeveling dat de volgende tests voor de bepaling van de in-vivo huidcorrosiviteit kunnen worden gebruikt (10)(11)(12)(13): de test met het humane huidmodel (deze methode) en de test op basis van de transcutane elektrische weerstand (zie testmethode B.40).

Op grond van valideringsstudies is gerapporteerd dat met tests waarbij humane huidmodellen worden gebruikt (3)(4)(5)(9), een betrouwbaar onderscheid kan worden gemaakt tussen stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief c.q. niet-corrosief voor de huid zijn. Bovendien kan met het testprotocol wellicht ook een indicatief onderscheid worden gemaakt tussen stoffen met een meer of minder hevige corrosieve werking op de huid.

Met de in deze methode beschreven test kunnen corrosieve chemische stoffen en mengsels worden geïdentificeerd. Daarnaast kunnen ook niet-corrosieve stoffen en mengsels worden geïdentificeerd wanneer ter ondersteuning de bewijskracht wordt bepaald met behulp van andere bestaande informatie (bv. pH, structuur/activiteitrelaties en gegevens over mens en/of dier) (1)(2)(13)(14). Normaal gesproken levert de test niet voldoende informatie over huidirritatie op en is ook een onderverdeling van corrosieve stoffen zoals in het GHS (1) niet mogelijk.

Voor een volledige beoordeling van lokale huideffecten na één blootstelling op de huid wordt aanbevolen de sequentiële teststrategie te volgen die als bijlage bij testmethode B.4 (2) is opgenomen en ook in het GHS (1) wordt beschreven. Deze teststrategie behelst de uitvoering van in-vitrotests op huidcorrosie (zoals in deze methode wordt beschreven) en huidirritatie voordat tests op levende dieren worden overwogen.

▼B

1.2. DEFINITIES

Huidcorrosie *in vivo*: het ontstaan van een irreversibele beschadiging van de huid, namelijk zichtbare necrose door de epidermis heen in de dermis, na het opbrengen van een teststof gedurende ten hoogste vier uur. Corrosieve reacties worden gekenmerkt door zweren, bloedingen, bloederige korsten en aan het eind van de observatie na 14 dagen door verkleuring ten gevolge van het verbleken van de huid, stukken huidoppervlak die kaal geworden zijn en littekens. Om twijfelachtig letsel te evalueren moet histopathologie worden overwogen.

Levensvatbaarheid van cellen: een parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt gemeten (bv. het vermogen van cellulaire mitochondriale dehydrogenases om de vitale kleurstof MTT te reduceren) die, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal en/of de vitaliteit van de cellen.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Tabel 1:

Referentiestoffen

Naam	EINECS-nr.	CAS-nr.	
1,2-Diaminopropaan	201-155-9	78-90-0	Sterk corrosief
Acrylzuur	201-177-9	79-10-7	Sterk corrosief
2-tert.-Butylfenol	201-807-2	88-18-6	Corrosief
Kaliumhydroxide (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosief
Zwavelzuur (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosief
Octaanzuur (caprylzuur)	204-677-5	124-07-02	Corrosief
4-Amino-1,2,4-triazool	209-533-5	584-13-4	Niet-corrosief
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Niet-corrosief
Fenethylbromide	203-130-8	103-63-9	Niet-corrosief
Tetrachloorethyleen	204-825-9	27-18-4	Niet-corrosief
Isostearinezuur	250-178-0	30399-84-9	Niet-corrosief
4- (Methylthio)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	Niet-corrosief

De meeste vermelde chemische stoffen zijn afkomstig van de lijst van chemische stoffen die voor de internationale valideringsstudie van het ECVAM zijn gekozen (4). Ze zijn aan de hand van de volgende criteria gekozen:

i) een gelijk aantal corrosieve en niet-corrosieve stoffen;

ii) in de handel verkrijgbare stoffen waarmee de meeste relevante chemische categorieën worden bestreken;

iii) opneming van stoffen die sterk corrosief zijn en stoffen die minder corrosief zijn om onderscheid te kunnen maken op basis van de corrosiepotentie;

▼B

iv) keuze van chemische stoffen die in een laboratorium kunnen worden gebruikt zonder andere ernstige gevaren op te leveren dan corrosiviteit.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Het testmateriaal wordt plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal humaan huidmodel, bestaande uit ten minste een gereconstrueerde epidermis met een functioneel stratum corneum. Corrosieve materialen worden geïdentificeerd doordat zij bij gespecificeerde blootstellingsperioden een daling van de levensvatbaarheid van de cellen [die bijvoorbeeld wordt bepaald door de reductie van MTT te meten (15)] tot onder gedefinieerde drempelwaarden kunnen veroorzaken. Het principe van de bepaling met het humane huidmodel is gebaseerd op de hypothese dat corrosieve chemische stoffen door diffusie of erosie het stratum corneum kunnen penetreren en cytotoxisch zijn voor de daaronder liggende cellagen.

1.4.1. **Procedure**

1.4.1.1. *Humane huidmodellen*

Humane huidmodellen kunnen op commerciële basis worden vervaardigd of verkregen (bv. de modellen EpiDerm™ en EPISKIN™) (16)(17)(18)(19) of in het testlaboratorium worden ontwikkeld of vervaardigd (20)(21). Voor het gebruik van menselijke huid gelden nationale en internationale ethische overwegingen en voorwaarden. Elk nieuw model moet worden gevalideerd (ten minste overeenkomstig de beschrijving onder 1.4.1.1.2). De voor deze test gebruikte humane huidmodellen moeten aan de volgende voorwaarden voldoen:

1.4.1.1.1. Algemene modelvoorwaarden:

Om het epitheel op te bouwen moeten humane keratocyten worden gebruikt. Er moeten verschillende lagen levende epitheelcellen aanwezig zijn onder een functioneel stratum corneum. Het huidmodel kan ook een laag met een stromale component hebben. Het stratum corneum moet uit verschillende lagen bestaan met het benodigde lipidenprofiel om te zorgen voor een functionele barrière die krachtig genoeg is om een snelle penetratie van cytotoxische markers tegen te gaan. De insluitingseigenschappen van het model moeten voorkomen dat materiaal om het stratum corneum heen in het levende weefsel terechtkomt. Als teststoffen om het stratum corneum heen kunnen komen, levert dit een slecht model voor blootstelling van de huid op. Het huidmodel mag niet verontreinigd zijn met bacteriën (met inbegrip van mycoplasma) of fungi.

1.4.1.1.2 Functionele modelvoorwaarden:

De levensvatbaarheid wordt meestal gekwantificeerd met behulp van MTT of de andere metabool omgezette vitale kleurstoffen. In deze gevallen moet de optische dichtheid (OD) van de geëxtraheerde (opgeloste) kleurstof uit het negatieve controleweefsel ten minste 20 keer zo hoog zijn als de OD van het extractieoplosmiddel alleen [zie voor een overzicht (22)]. Het negatieve controleweefsel moet gedurende de volledige blootstellingsperiode van de test in cultuur stabiel zijn (een vergelijkbare gemeten levensvatbaarheid opleveren). Het stratum corneum moet krachtig genoeg zijn om de snelle penetratie van bepaalde cytotoxische markers (bv. 1 % Triton X-100) tegen te gaan. Deze eigenschap kan worden bepaald aan de hand van de blootstellingstijd die nodig is om de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % te verlagen (ET_{50}) (voor de modellen EpiDerm™ en EPISKIN™ is dit bv. > 2 uur). Er moet worden aangetoond dat het weefsel in de loop van de tijd en bij voorkeur van laboratorium tot laboratorium reproduceerbaar is. Bovendien moet daarmee een prognose kunnen worden gegeven van de corrosiepotentie van de referentiechemicaliën (zie tabel 1) wanneer deze volgens het gekozen testprotocol worden gebruikt.

▼B

1.4.1.2. *Opbrengen van de teststof en de controlestoffen*

Voor elke behandeling (blootstellingstijd), ook voor de controles, worden twee duploweefsels gebruikt. Voor vloeibaar materiaal moet er zo veel teststof worden opgebracht dat het huidoppervlak uniform bedekt is: er moet ten minste 25 µl/cm^2 worden gebruikt. Voor vast materiaal moet er zo veel teststof worden opgebracht dat het huidoppervlak gelijkmatig bedekt is en dit moet vervolgens met gedeïoniseerd of gedestilleerd water worden bevochtigd om voor een goed contact met de huid te zorgen. Indien nodig moeten vaste stoffen tot een poeder worden vermalen voordat ze worden opgebracht. De wijze van opbrengen moet geschikt zijn voor de teststof (zie bijvoorbeeld referentie 5). Aan het eind van de blootstellingsperiode moet het testmateriaal zorgvuldig van het huidoppervlak worden gewassen met een geschikte buffer of 0,9 % NaCl.

Voor elke studie moeten parallelle positieve en negatieve controles worden gebruikt om na te gaan of het experimentele model afdoende functioneert. Als positieve controlestoffen worden ijsazijn of 8 N KOH aanbevolen. Als negatieve controles worden 0,9 % NaCl of water aanbevolen.

1.4.1.3. *Meting van de levensvatbaarheid van de cellen*

Voor de meting van de levensvatbaarheid van de cellen kunnen alleen kwantitatieve gevalideerde methoden worden gebruikt. Bovendien moet de meting van de levensvatbaarheid compatibel zijn met gebruik in een driedimensionaal weefselpreparaat. De meting van de levensvatbaarheid mag niet worden gestoord door niet-specifieke kleurstofbinding. Eiwitbindende kleurstoffen en kleurstoffen die geen metabole omzetting ondergaan (bijvoorbeeld neutraalrood), zijn derhalve niet geschikt. De meest gebruikte bepaling is de reductie van MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide, thiazolylblauw: EINECS-nummer 206-069-5, CAS-nummer 298-93-1)], waarvan is aangetoond dat deze nauwkeurige en reproduceerbare resultaten oplevert (5), maar ook andere bepalingen kunnen worden gebruikt. Het huidmonster wordt gedurende 3 uur bij een geschikte incubatietemperatuur in een MTT-oplossing met een geschikte concentratie (bv. 0,3-1 mg/ml) gelegd. Er ontstaat een blauw formazanneerslag dat vervolgens wordt geëxtraheerd met een oplosmiddel (isopropanol) en de formazanconcentratie wordt gemeten door de OD bij een golflengte tussen 540 en 595 nm te bepalen.

De chemische effecten van het testmateriaal op de vitale kleurstof kunnen de effecten van het cellulaire metabolisme nabootsen, hetgeen tot een onjuiste bepaling van de levensvatbaarheid leidt. Er is aangetoond dat dit gebeurt wanneer dit testmateriaal niet volledig door wassen van de huid wordt verwijderd (9). Als het testmateriaal rechtstreekse effecten op de vitale kleurstof heeft, moeten er aanvullende controles worden gebruikt om storing van de meting van de levensvatbaarheid door de teststoffen te detecteren en daarvoor te corrigeren (9)(23).

2. **GEGEVENS**

Voor elk weefsel moeten de OD-waarden en de berekende procentuele levensvatbaarheid van de cellen voor het testmateriaal en de positieve en negatieve controles in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, eventueel herhaalde bepalingen, gemiddelden en de afzonderlijke waarden.

▼B

2.1. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De voor elk testmonster verkregen OD-waarden kunnen worden gebruikt voor de berekening van een procentuele levensvatbaarheid in vergelijking met de negatieve controle, die a priori op 100 % wordt gesteld. De drempelwaarde van de procentuele levensvatbaarheid van de cellen die als scheiding tussen corrosieve en niet-corrosieve testmaterialen (of tussen verschillende klassen van corrosiviteit) fungeert, of de statistische procedure die wordt gebruikt om de resultaten te evalueren en corrosieve materialen te identificeren, moet duidelijk worden gespecificeerd en gedocumenteerd en de juistheid daarvan moet worden aangetoond. In het algemeen worden deze drempelwaarden tijdens het optimaliseren van de test bepaald, tijdens de prevalideringsfase getest en bij een valideringsstudie bevestigd. De voorspelling van corrosiviteit bij het model EpiDerm™ is bijvoorbeeld (9):

De teststof wordt als corrosief voor de huid beschouwd:

i) als de levensvatbaarheid na 3 minuten blootstelling minder dan 50 % is of

ii) als de levensvatbaarheid na 3 minuten blootstelling 50 % of hoger is en de levensvatbaarheid na 1 uur blootstelling minder dan 15 % is.

De teststof wordt als niet-corrosief voor de huid beschouwd:

i) als de levensvatbaarheid na 3 minuten blootstelling 50 % of hoger is en de levensvatbaarheid na 1 uur blootstelling 15 % of hoger is.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTRAPPORT

In het testrapport moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Test- en controlestof:

— de chemische naam of namen, zoals de IUPAC- of de CAS-naam, en het CAS- nummer, indien dit bekend is;

— de zuiverheid en de samenstelling van de stof of het preparaat (in gewichtsprocent);

— fysisch-chemische eigenschappen, zoals de fysische toestand, de pH, de stabiliteit, de oplosbaarheid in water, die voor de uitvoering van het onderzoek relevant zijn;

— de behandeling van de test- en controlestoffen vóór de test, indien van toepassing (bv. verwarmen of fijnmalen);

— de stabiliteit, indien bekend.

Een motivering voor het gebruikte huidmodel en protocol.

Testomstandigheden:

— het gebruikte celsysteem;

— kalibratie-informatie voor de meetapparatuur die voor het meten van de levensvatbaarheid van de cellen is gebruikt (bijvoorbeeld een spectrofotometer);

▼B

— volledige ondersteunende informatie voor het specifieke gebruikte huidmodel, met inbegrip van de deugdelijkheid daarvan;

— gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;

— de gebruikte testdoses;

— een beschrijving van eventuele wijzigingen in de testprocedure;

— een referentie naar historische gegevens over het model;

— een beschrijving van de gebruikte evaluatiecriteria.

Resultaten:

— een tabel met de gegevens van de afzonderlijke testmonsters;

— een beschrijving van andere waargenomen effecten.

Bespreking van de resultaten.

Conclusie.

4. **REFERENTIES**

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. Testmethode B.4. Acute toxiciteit: Huidirritatie/corrosie.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, DJ., 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 23,219— 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. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 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 Holzhütter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371-401.

10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKTN™ (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, 55-63.

16. Cannon, CL., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. *In Vitro* 8, 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. 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: 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, 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, 747-756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, SJ. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 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. *In Vitro* 15, 57-93.

▼B

B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOXICITEITSTEST

1. METHODE

Deze methode komt overeen met OESO TG 432 (2004).

1.1. INLEIDING

Fototoxiciteit wordt gedefinieerd als een toxische respons ten gevolge van een op het lichaam opgebrachte stof die wordt opgewekt of toeneemt (zichtbaar bij lagere doses) na een daaropvolgende blootstelling aan licht of die wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.

De *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest wordt gebruikt om na te gaan in hoeverre een teststof fototoxische effecten kan hebben, die na de blootstelling aan licht door de geëxciteerde chemische stof worden geïnduceerd. De test evalueert de fotocytotoxiciteit aan de hand van de relatieve verlaging van de levensvatbaarheid van cellen die in aanwezigheid van licht aan de chemische stof worden blootgesteld ten opzichte van blootstelling zonder licht. Stoffen die positief op deze test reageren, zullen *in vivo* na systemische toediening en distributie naar de huid of na lokale toediening waarschijnlijk fototoxisch zijn.

Van veel soorten chemische stoffen is gerapporteerd dat ze fototoxische effecten induceren (1)(2)(3)(4). Deze hebben als gemeenschappelijk kenmerk dat ze lichtenergie binnen het zonlichtspectrum kunnen absorberen. Volgens de eerste wet van de fotochemie (wet van Grotthaus-Draper) is voor een fotoreactie de absorptie van voldoende lichtquanta nodig. Voordat een biologische test wordt overwogen, moet dan ook een absorptiespectrum van de teststof in UV/zichtbaar licht worden bepaald volgens OESO-testrichtsnoer 101. Er is wel gesuggereerd dat het onwaarschijnlijk is dat een stof waarvan de molaire extinctie/absorptiecoëfficiënt lager is dan 10 liter × mol^{-1} × cm^{-1}, fotoreactief is. Een dergelijke chemische stof hoeft wellicht niet volgens de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest of een andere biologische test op schadelijke fotochemische effecten te worden getest (1)(5). Zie ook bijlage 1.

De betrouwbaarheid en relevantie van de *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest is onlangs geëvalueerd (6)(7)(8)(9). Daarbij is aangetoond dat de *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest acute fototoxische effecten *in vivo* bij mens en dier voorspelt. De test is niet bedoeld om andere schadelijke effecten te voorspellen die zich door een gecombineerde werking van een chemische stof en licht kunnen voordoen, zoals fotogenotoxische, fotoallergische of fotocarcinogene effecten, en ook een bepaling van de fototoxische potentie is niet mogelijk. Bovendien is de test niet bedoeld voor de bestudering van indirecte mechanismen van fototoxiciteit, effecten van metabolieten van de teststof of effecten van mengsels.

Terwijl het gebruik van metaboliserende systemen een algemene voorwaarde is voor alle *in-vitro* tests voor de voorspelling van mogelijke genotoxische en carcinogene effecten, zijn er in het geval van de fototoxicologie tot op heden slechts enkele voorbeelden waarbij metabole omzetting nodig is om een chemische stof *in vivo* of *in vitro* als fototoxine te laten werken. Het wordt dan ook niet nodig of vanuit wetenschappelijk oogpunt wenselijk geacht om deze test met een metabool activerings systeem uit te voeren.

▼B

1.2. DEFINITIES

Bestralingssterke: de intensiteit van het ultraviolette (UV) of zichtbare licht dat op een oppervlak valt, uitgedrukt in W/m^3 of mW/cm^2.

Lichtdosis: de hoeveelheid (= intensiteit × tijd) ultraviolette (UV) of zichtbare straling die op een oppervlak valt, uitgedrukt in Joules (= W × s) per oppervlakte-eenheid, d.w.z. J/m^3 of J/cm^2.

UV-golflengtebanden: de door de CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) aanbevolen indeling is: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) en UVC (100-280 nm). Er worden ook andere indelingen gehanteerd: de grens tussen UVB en UVA wordt vaak op 320 nm gelegd en UVA wordt soms onderverdeeld in UV-A1 en UV-A2, waarbij de grens op ongeveer 340 nm ligt.

Levensvatbaarheid van cellen: een parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt gemeten (bv. opname van de vitale kleurstof neutraalrood in cellulaire lysosomen) die, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal en/of de vitaliteit van de cellen.

Relatieve levensvatbaarheid van cellen: de levensvatbaarheid van cellen, uitgedrukt in verhouding tot (negatieve) oplosmiddelcontrolecellen die de gehele testprocedure doorlopen hebben (+Irr of -Irr) maar niet met de teststof zijn behandeld.

PIF (foto-irritatiefactor): een factor die wordt verkregen door twee even effectieve cytotoxische concentraties (IC_{50}) van de teststof te vergelijken die zijn verkregen zonder (-Irr) en met (+Irr) een niet-cytotoxische bestraling met UVA/zichtbaar licht.

IC_{50}: de concentratie van de teststof waarbij de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % daalt.

MPE (gemiddeld foto-effect): een parameter die wordt bepaald aan de hand van een mathematische analyse van de concentratie/responscurves die zijn verkregen zonder (-Irr) en met (+Irr) een niet-cytotoxische bestraling met UV A/zichtbaar licht.

Fototoxiciteit: een acute toxische respons die wordt opgewekt na de eerste blootstelling van de huid aan bepaalde chemische stoffen, gevolgd door de blootstelling aan licht, of op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een chemische stof.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest is gebaseerd op een vergelijking van de cytotoxiciteit van een chemische stof met en zonder blootstelling aan een niet-cytotoxische dosis gesimuleerd zonlicht. De cytotoxiciteit wordt in deze test uitgedrukt als een concentratieafhankelijke verlaging van de opname van de vitale kleurstof neutraalrood, die 24 uur na de behandeling met de teststof en de bestraling wordt gemeten (10). Neutraalrood is een zwakke kationische kleurstof die celmembranen gemakkelijk via andere processen dan diffusie penetreert en intracellulair in lysosomen accumuleert. Veranderingen in het oppervlak van het gevoelige lysosoom-membraan leiden tot kwetsbaarheid van de lysosomen en andere veranderingen die geleidelijk irreversibel worden. Dergelijke door xenobiotica veroorzaakte veranderingen leiden tot een daling van de opname en binding van neutraalrood. Het is derhalve mogelijk onderscheid te maken tussen levensvatbare, beschadigde en dode cellen en dat is de basis van deze test.

▼B

Balb/c 3T3 cellen worden gedurende 24 uur in cultuur gehouden zodat zich een monolaag vormt. Vervolgens worden voor elke teststof twee 96-wells-platen gedurende één uur gepreïncubeerd met 8 verschillende concentraties van de teststof. Daarna wordt een van de twee platen blootgesteld aan de hoogste niet-cytotoxische stralingsdosis, terwijl de andere plaat in het donker wordt bewaard. In beide platen wordt het behandelingsmedium vervolgens vervangen door cultuurmedium en na nog eens 24 uur incubatie wordt de levensvatbaarheid van de cellen bepaald aan de hand van de opname van neutraalrood. De levensvatbaarheid van de cellen wordt uitgedrukt als percentage van de levensvatbaarheid van onbehandelde oplosmiddelcontroles en wordt voor elke testconcentratie berekend. Om een uitspraak te doen over het fototoxische potentieel wordt de concentratie-afhankelijke respons met en zonder bestraling vergeleken, gewoonlijk op het niveau van de IC_{50}, d.w.z. de concentratie die de levensvatbaarheid van de cellen in vergelijking met de onbehandelde controles met 50 % vermindert.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. **Voorbereidingen**

1.4.1.1. *Cellen*

In de valideringsstudie is een permanente fibroblastcellijn van muizen — Balb/c 3T3, kloon 31 — van de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA (VS) of van de European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire (VK) gebruikt en daarom wordt aanbevolen deze van een goed gekwalificeerde celbank te betrekken. Andere cellen of cellijnen kunnen met dezelfde testprocedure worden gebruikt als de cultuuromstandigheden aan de specifieke behoeften van de cellen worden aangepast, maar de gelijkwaardigheid moet worden aangetoond.

De cellen moeten periodiek worden gecontroleerd op de afwezigheid van mycoplasmabesmetting en mogen alleen worden gebruikt als deze niet wordt geconstateerd (11).

Het is belangrijk dat de UV-gevoeligheid van de cellen periodiek wordt gecontroleerd volgens de kwaliteitscontroleprocedure die in deze methode wordt beschreven. Aangezien de UVA-gevoeligheid van cellen met het aantal passages kan toenemen, moeten Balb/c 3T3 cellen met het laagst verkrijgbare aantal passages worden gebruikt, bij voorkeur lager dan 100 (zie punt 1.4.2.2.2 en bijlage 2).

1.4.1.2. *Media en cultuuromstandigheden*

Voor routinematige passage van de cellen en tijdens de testprocedure moeten geschikte cultuurmedia en incubatieomstandigheden worden gebruikt, voor Balb/c 3T3 cellen bijvoorbeeld DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), aangevuld met 10 % serum van pasgeboren kalveren, 4 mM glutamine, penicilline (100 IE) en streptomycine (100 µg/ml), en incubatie onder vochtige omstandigheden bij 37 °C en 5-7,5 % CO_2, afhankelijk van de buffer (zie punt 1.4.1.4, tweede alinea). Het is vooral belangrijk dat de celcultuuromstandigheden zo zijn dat de celcyclustijd binnen het normale gedocumenteerde bereik van de gebruikte cellen of cellijn ligt.

1.4.1.3. *Prepareren van de culturen*

Cellen uit ingevroren stamculturen worden met een geschikte dichtheid overgeënt in cultuurmedium en ten minste één maal in subcultuur gebracht voordat zij bij de *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest worden gebruikt.

▼B

Voor de fototoxiciteitstest gebruikte cellen worden overgeënt in cultuurmedium, waarbij de dichtheid zo is dat de culturen niet samenvloeien vóór het einde van de test, d.w.z. wanneer 48 uur na het overenten van de cellen de levensvatbaarheid van de cellen wordt bepaald. Voor Balb/c 3T3 cellen die worden gekweekt in 96-wells-platen, wordt bij het overenten een celdichtheid van 1×10^4 cellen per well aanbevolen

Voor elke teststof worden cellen op identieke wijze overgeënt op twee afzonderlijke 96-wells-platen die vervolgens parallel onder identieke cultuuromstandigheden de gehele testprocedure doorlopen, met uitzondering van de periode waarin een van de platen wordt bestraald (+Irr) en de andere in het donker wordt bewaard (-Irr).

1.4.1.4. *Voorbereiding van de teststof*

Teststoffen moeten vlak voor het gebruik vers worden bereid, tenzij er gegevens zijn waaruit blijkt dat ze tijdens opslag stabiel zijn. Aanbevolen wordt elke chemische bewerking en de eerste behandeling van de cellen onder zodanige lichtomstandigheden uit te voeren dat fotoactivering of afbraak van de teststof vóór de bestraling wordt voorkomen.

De teststoffen moeten worden opgelost in gebufferde zoutoplossingen, bijvoorbeeld Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) of andere fysiologisch uitgebalanceerde bufferoplossingen, die vrij moeten zijn van eiwitcomponenten en licht absorberende componenten (bv. pH-indicatorkleurstoffen en vitaminen) om storing tijdens de bestraling te voorkomen. Aangezien de cellen tijdens de bestraling gedurende ongeveer 50 minuten buiten de CC_2-incubator verblijven, moet er op worden gelet dat alkalisering wordt voorkomen. Als er zwakke buffers zoals EBSS worden gebruikt, kan dit gebeuren door de cellen bij 7,5 % CO_2 te incuberen. Als de cellen bij slechts 5 % CO_2 worden geïncubeerd, moet er een sterkere buffer worden gekozen.

Teststoffen met een beperkte oplosbaarheid in water moeten in een geschikt oplosmiddel worden opgelost. Als er een oplosmiddel wordt gebruikt, moet hiervan in alle culturen een constant volume aanwezig zijn, d.w.z. zowel in de negatieve (oplosmiddel)controles als in alle concentraties van de teststof, en mag het bij die concentratie niet cytotoxisch zijn. De concentraties van de teststof moeten zo worden gekozen dat neerslagen of troebele oplossingen worden voorkomen.

De aanbevolen oplosmiddelen zijn dimethylsulfoxide (DMSO) en ethanol (EtOH). Andere oplosmiddelen met een lage cytotoxiciteit kunnen in aanmerking komen. Voor het gebruik moeten alle oplosmiddelen worden onderzocht op specifieke eigenschappen, bijvoorbeeld reactie met de teststof, onderdrukking van het fototoxische effect, het vermogen om radicalen weg te vangen en/of chemische stabiliteit in het oplosmiddel.

Om het oplossen te bevorderen kan gebruik worden gemaakt van vortex-menging en/of sonificatie en/of verwarming tot geschikte temperaturen, tenzij dit nadelige gevolgen zou hebben voor de stabiliteit van de teststof.

▼B

1.4.1.5. *Bestralingsomstandigheden*

1.4.1.5.1. Lichtbron

De keuze van een geschikte lichtbron en filters is een cruciale factor bij fototoxiciteitstests. UVA en zichtbaar licht worden gewoonlijk geassocieerd met fototoxische reactie *in vivo* (3)(12), terwijl UVB in het algemeen minder relevant is maar sterk cytotoxisch is; de cytotoxiciteit neemt van 313 nm tot 280 nm met een factor 1 000 toe (13). Een van de criteria bij de keuze van een geschikte lichtbron is de eis dat de lichtbron golflengtes uitzendt die door de teststof worden geabsorbeerd (absorptiespectrum) en dat de lichtdosis (die binnen een redelijke blootstellingstijd haalbaar is) voldoende is om bekende fototoxische stoffen te detecteren. Bovendien mogen de gebruikte golflengtes en doses niet te veel schade aan het testsysteem toebrengen, bijvoorbeeld door de emissie van warmte (infraroodspectrum).

Simulatie van zonlicht met zonnesimulatoren wordt als de optimale kunstlichtbron beschouwd. De spectrale verdeling van de gefilterde zonnesimulator moet in de buurt liggen van die van daglicht, zoals vermeld in (14). In zonnesimulatoren worden xenonbooglampen en (gedoteerde) kwik-metaalhalideboogla mpen gebruikt (15). Laatstgenoemde hebben het voordeel dat zij minder warmte afgeven en goedkoper zijn, maar de overeenstemming met zonlicht is minder volmaakt dan bij xenonbooglampen. Aangezien alle zonnesimulatoren significante hoeveelheden UVB uitstralen, moeten deze afdoende worden gefilterd om de sterk cytotoxische UVB-golflengtes te verzwakken. Omdat de kunststof materialen voor celculturen UV-stabilisatoren bevatten, moet het spectrum worden gemeten door hetzelfde type deksel van 96-wells-platen als bij de bepaling wordt gebruikt. Ongeacht de maatregelen die worden genomen om delen van het spectrum te verzwakken door filtering of onvermijdelijke filtereffecten van de apparatuur mag het spectrum dat onder deze filters wordt geregistreerd, niet afwijken van gestandaardiseerd daglicht (14). Een voorbeeld van de spectrale verdeling van de gefilterde zonnesimulator die bij de valideringsstudie van de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest is gebruikt, wordt vermeld in (8)(16). Zie ook figuur 1 van bijlage 2.

1.4.1.5.2. Dosimetrie

De intensiteit van het licht (bestralingssterkte) moet periodiek vóór elke fototoxiciteitstest worden gecontroleerd met een geschikte breedband-UV-meter. De intensiteit moet worden gemeten door hetzelfde type deksel van 96-wells-platen als bij de bepaling wordt gebruikt. De UV-meter moet op de bron zijn gekalibreerd. De werking van de UV-meter moet worden gecontroleerd en daarvoor wordt het gebruik van een tweede referentie-UV-meter van hetzelfde type en met dezelfde kalibratie aanbevolen. In het ideale geval moet met grotere intervallen een spectroradiometer worden gebruikt om de spectrale bestralingssterkte van de gefilterde lichtbron te meten en de kalibratie van de breedband-UV-meter te controleren.

Er is vastgesteld dat een dosis van 5 J/cm^2 (gemeten in het UVA-spectrum) niet cytotoxisch is voor Balb/c 3T3 cellen en voldoende sterk om chemische stoffen te exciteren en zo tot foto toxische reacties te leiden (6) (17); om in 50 minuten een bestralingsdosis van 5 J/cm^2 te bereiken, werd de bestralingssterkte bijvoorbeeld afgesteld op 1,7 mW/cm^2. Zie figuur 2 van bijlage 2. Als een andere cellijn of een andere lichtbron wordt gebruikt, kan het nodig zijn de bestralingsdosis te kalibreren, zodat de dosering zodanig kan worden gekozen dat deze niet schadelijk is voor de cellen maar wel voldoende om standaard-fototoxines te exciteren. De duur van de blootstelling aan het licht wordt als volgt berekend:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestralingsdosis } (\text{ J } /cm^2) \times 1000}{\text{bestralingssterkte } (\text{ mW } /cm^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2. **Testomstandigheden**

1.4.2.1. *Concentraties van de teststof*

Het bereik waarbinnen de concentraties van een met (+Irr) en zonder (-Irr) licht geteste stof moeten liggen, moet op correcte wijze worden bepaald in oriënterende experimenten. Het kan nuttig zijn eerst de aanvankelijke oplosbaarheid en de oplosbaarheid na 60 min (of een andere behandelingstijd, als daarvoor wordt gekozen) te bepalen, aangezien de oplosbaarheid in de loop van de tijd en tijdens de blootstelling kan veranderen. Om toxiciteit door onjuiste cultuuromstandigheden of door sterk zure of alkalische chemische stoffen te voorkomen, moet de pH van de celculturen met toegevoegde teststof tussen 6,5 en 7,8 liggen.

De hoogste concentratie van de teststof moet binnen fysiologische testomstandigheden vallen, hetgeen wil zeggen dat osmotische en pH-stress moeten worden vermeden. Afhankelijk van de teststof kan het nodig zijn rekening te houden met andere fysisch-chemische eigenschappen als factoren die de hoogste testconcentratie beperken. Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen die bij concentraties tot het verzadigingspunt niet toxisch zijn, moet de hoogst haalbare concentratie worden getest. In het algemeen moet neerslaan van de teststof ongeacht de concentratie worden voorkomen. De maximale concentratie van een teststof mag niet hoger zijn dan 1 000 µg/ml; de osmolariteit mag niet hoger zijn dan 10 mmol/l. Er moet een meetkundige verdunningsreeks van 8 teststof-concentraties met een constante verdunningsfactor worden gebruikt (zie de tweede alinea van punt 2.1).

Als er informatie (uit een oriënterend experiment) is dat de teststof bij het experiment in het donker (-Irr) tot de hoogste concentratie niet cytotoxisch is, maar bij bestraling (+Irr) sterk cytotoxisch, kan het nodig zijn voor het (+Irr)-experiment een ander concentratiebereik te kiezen dan voor het (-Irr)-experiment om aan de eis van afdoende gegevenskwaliteit te voldoen.

1.4.2.2. *Controles*

1.4.2.2.1. Stralingsgevoeligheid van de cellen, vaststelling van historische gegevens:

De cellen moeten periodiek (ongeveer elke vijfde passage) op gevoeligheid voor de lichtbron worden gecontroleerd door hun levensvatbaarheid na blootstelling aan oplopende bestralingsdoses te bepalen. Bij deze bepaling moeten verschillende bestralingsdoses worden gebruikt, waaronder doses die aanzienlijk hoger zijn dan voor de *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest worden gebruikt. Deze doses worden het gemakkelijkst kwantitatief bepaald door de UV-delen van de lichtbron te meten. De cellen worden overgeënt met de dichtheid die wordt gebruikt bij de *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest en de volgende dag bestraald. Vervolgens wordt één dag later door middel van de opname van neutraalrood de levensvatbaarheid van de cellen bepaald. Er moet worden aangetoond dat de resulterende hoogste niet-cytotoxische dosis (bijvoorbeeld bij de valideringsstudie 5 J/cm^2 [UVA]) voldoende is om de referentiechemicaliën (tabel 1) op de juiste wijze in te delen.

▼B

1.4.2.2.2. Stralingsgevoeligheid, controle van de lopende test:

De test voldoet aan de kwaliteitscriteria als de bestraalde negatieve/oplosmiddelcontroles een levensvatbaarheid vertonen van ten minste 80 % van die van niet-bestraalde negatieve/oplosmiddelcontroles.

1.4.2.2.3. Levensvatbaarheid van oplosmiddelcontroles:

Uit de absolute optische dichtheid (OD540 NRU) van het uit de oplosmiddelcontroles geëxtraheerde neutraalrood blijkt of de 1×10^4 cellen die per well zijn overgeënt tijdens de twee dagen van de test met een normale verdubbelingstijd zijn gegroeid. Een test voldoet aan de aanvaardbaarheidscriteria als de gemiddelde OD_{540}NRU van de onbehandelde controles $\geq$ 0,4 is (d.w.z. ongeveer twintig keer zo hoog als de achtergrondextinctie van het oplosmiddel).

1.4.2.2.4. Positieve controle:

Parallel aan elke *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest moet een chemische stof worden getest waarvan bekend is dat deze fototoxisch is. Chloorpromazine (CPZ) wordt aanbevolen. Voor CPZ dat wordt getest volgens het standaardprotocol in de *in-vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest, zijn de volgende aanvaardbaarheidscriteria gedefinieerd: CPZ bestraald (+Irr): IC_{50} = 0,1 tot 2,0 µg/ml, CPZ niet-bestraald (-Irr): IC_{50} = 7,0 tot 90,0 Dg/ml. De foto-irritatiefactor (PIF) moet > 6 zijn. De resultaten van de positieve controle moeten in de loop der tijd worden gevolgd.

Ook andere fototoxische stoffen die met het oog op de chemische categorie of oplosbaarheidskenmerken van de onderzochte chemische stof geschikt zijn, kunnen in plaats van chloorpromazine als parallelle positieve controle worden gebruikt.

1.4.3. **Testprocedure (6)(7)(8)(16)(17):**

1.4.3.1. *Eerste dag:*

Breng in de buitenste wells van een 96-wells microtiterplaat voor weefselculturen 100 µl cultuurmedium (= blanco's). Breng in de overige wells 100 µl celsuspensie met 1×10^5 cellen/ml in cultuurmedium (= 1×10^4 cellen/well). Er worden twee platen gemaakt voor elke reeks teststofconcentraties en voor de positieve en oplosmiddelcontroles.

Incubeer de cellen gedurende 24 uur (zie punt 1.4.1.2) tot ze een half samenvloeiende monolaag vormen. Deze incubatieperiode is lang genoeg voor het herstel, de hechting en de exponentiële groei van de cellen.

1.4.3.2. *Tweede dag:*

Na incubatie wordt het cultuurmedium van de cellen gedecanteerd en worden ze zorgvuldig gewassen met 150 µl van de voor de incubatie gebruikte gebufferde oplossing. Voeg 100 µl buffer met de gewenste concentratie teststof of oplosmiddel (oplosmiddelcontrole) toe. Gebruik acht verschillende concentraties teststof. Incubeer de cellen met de teststof in het donker gedurende 60 minuten (zie punt 1.4.1.2 en punt 1.4.1.4, tweede alinea).

Van de twee voor elke reeks teststofconcentraties en de controles gemaakte platen wordt er één gekozen (meestal aselect) voor de bepaling van de cytotoxiciteit (-Irr) (d.w.z. de controleplaat) en één (de behandelde plaat) voor de bepaling van de fotocytotoxiciteit (+Irr).

▼B

Voor de +Irr-blootstelling worden de cellen gedurende 50 minuten bij kamertemperatuur door het deksel van de 96-wells-plaat bestraald met de hoogste stralingsdosis die niet cytotoxisch is (zie ook bijlage 2). De niet-bestraalde platen (-Irr) worden gedurende 50 minuten (= lichtblootstellingstijd) bij kamertemperatuur in een donkere kast bewaard.

Decanteer de testoplossing en was zorgvuldig tweemaal met 150 µl van de voor de incubatie gebruikte gebufferde oplossing zonder testmateriaal. Vervang de buffer door cultuurmedium en incubeer (zie punt 1.4.1.2) tot de volgende dag (18-22 uur).

1.4.3.3. *Derde dag:*

1.4.3.3.1. Microscopisch onderzoek

De cellen worden met een fasecontrastmicroscoop onderzocht op groei, morfologie en integriteit van de monolaag. Veranderingen in de morfologie van de cellen en effecten op de celgroei worden geregistreerd.

1.4.3.3.2. Opname van neutraalrood

Was de cellen met 150 µl voorverwarmde buffer. Verwijder de wasvloeistof door voorzichtig te tikken. Voeg 100 µl van een oplossing van 50 µg/ml neutraalrood (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenazine hydrochloride, EINECS-nummer 209-035-8; CAS-nummer 553-24-2; C.I. 50040) in medium zonder serum (16) toe en incubeer gedurende 3 uur volgens de beschrijving onder punt 1.4.1.2. Na incubatie wordt het NR-medium verwijderd en worden de cellen gewassen met 150 µl buffer. Decanteer en verwijder de overmaat buffer door afvloeien of centrifugeren.

Voeg precies 150 µl NR-desorptieoplossing (vers bereid: 49 delen water + 50 delen ethanol + 1 deel azijnzuur) toe.

Schud de microtiterplaat gedurende 10 minuten zachtjes op een microtiterplaatschudder totdat het NR uit de cellen is geëxtraheerd en zich een homogene oplossing heeft gevormd.

Meet de optische dichtheid van het NR-extract bij 540 nm in een spectrofotometer, waarbij de blanco's als referentie worden gebruikt. Sla de gegevens in een geschikt elektronisch bestandsformaat op voor latere analyse.

2. GEGEVENS

2.1. KWALITEIT EN HOEVEELHEID VAN DE GEGEVENS

De testgegevens moeten een zinvolle analyse mogelijk maken van de met en zonder bestraling verkregen concentratie-afhankelijke respons en indien mogelijk de concentratie van de teststof waardoor de levensvatbaarheid van de cellen tot 50 % daalt (IC50). Als er cytotoxiciteit wordt geconstateerd, moeten zowel het concentratiebereik als de intervallen tussen de verschillende concentraties zo worden gekozen dat er een curve aan de experimentele gegevens kan worden gefit.

Zowel bij duidelijk positieve resultaten als bij duidelijk negatieve resultaten (zie punt 2.3, eerste alinea) zal het hoofdexperiment, voorafgegaan door een of meer oriënterende experimenten om het concentratiebereik te bepalen, wellicht volstaan.

▼B

Twijfelachtige resultaten, grensgevallen of onduidelijke resultaten moeten door verdere tests worden verduidelijkt (zie punt 2.4, tweede alinea). In deze gevallen moet een wijziging van de experimentele omstandigheden worden overwogen. Experimentele omstandigheden die voor wijziging in aanmerking komen, zijn bijvoorbeeld: het concentratiebereik of de intervallen, de preïncubatietijd en de bestralings/blootstellingstijd. Een kortere blootstellingstijd kan zinvol zijn voor chemische stoffen die in water instabiel zijn.

2.2. EVALUATIE VAN DE RESULTATEN

Om evaluatie van de gegevens mogelijk te maken kan een foto-irritatiefactor (PIF) of gemiddeld foto-effect worden berekend.

Voor de berekening van de mate van fotocytotoxiciteit (zie hieronder) moet de verzameling discrete concentratie/responswaarden worden benaderd met een passende continue concentratie/responscurve (model). Voor het fitten van de curve aan de gegevens wordt meestal een niet-lineaire regressiemethode gebruikt (18). Om de invloed van de variabiliteit van de gegevens op de gefitte curve te bepalen wordt een bootstrapprocedure aanbevolen.

Met behulp van de volgende formule wordt een foto-irritatiefactor (PIF) berekend:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Als een IC_{50} met of zonder licht niet kan worden berekend, kan er voor het testmateriaal geen PIF worden bepaald.

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Het foto-effect PE_C bij een concentratie C wordt gedefinieerd als het product van het responseffect RE_C en het dosiseffect DE_C, d.w.z. $PE_C = RE_C \times DE_C$. Het responseffect RE_C is het verschil tussen de waargenomen respons met en zonder licht, d.w.z. $RE_C = R_c$ (-Irr) − R_c (+Irr). Het dosiseffect wordt als volgt berekend:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

Het gemiddelde foto-effect (MPE) wordt gebaseerd op een vergelijking van de volledige concentratie/responscurves (19). Het wordt gedefinieerd als het gewogen gemiddelde van een representatieve verzameling foto-effectwaarden:

waarbij C* de equivalentieconcentratie is, d.w.z. de concentratie waarbij de +Irr-respons gelijk is aan de -Irr-respons bij concentratie C. Als C* niet kan worden bepaald omdat de responswaarden van de +Irr-curve systematisch hoger of lager zijn dan R_c(-Irr), wordt het dosiseffect gelijk aan 1 gesteld. De weegfactoren w_i worden gegeven door de hoogste responswaarde, d.w.z. w_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (-Irr)}. Het concentratieraster C_i wordt zodanig gekozen dat in elk van de concentratieintervallen die worden bepaald door de bij het experiment gebruikte concentratiewaarden, hetzelfde aantal punten valt. De berekening van het MPE blijft beperkt tot de maximale concentratiewaarde waarbij ten minste een van de twee curves nog een responswaarde van ten minste 10 % vertegenwoordigt. Als deze maximale concentratie hoger is dan de hoogste concentratie die bij het +Irr-experiment is gebruikt, wordt het resterende gedeelte van de +Irr-curve op responswaarde „0” gesteld. Aan de hand van het antwoord op de vraag of de MPE-waarde al dan niet hoger is dan een op correcte wijze gekozen drempelwaarde (MPE_C = 0,15), wordt de chemische stof al dan niet als fototoxisch ingedeeld.

▼B

Een softwarepakket voor de berekening van de PIF en het MPE is verkrijgbaar bij (20).

2.3. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Op basis van de valideringsstudie (8) geldt voor een teststof met PIF < 2 of een MPE < 0,1 de prognose: „geen fototoxiciteit". Bij een PIF > 2 en < 5 of een MPE > 0,1 en < 0,15 geldt de prognose: „waarschijnlijk fototoxiciteit"; en bij een PIF > 5 of een MPE > 0,15 geldt de prognose: „fototoxiciteit".

Wanneer deze bepaling voor het eerst in een laboratorium wordt uitgevoerd, moeten de in tabel 1 vermelde referentiematerialen worden getest voordat teststoffen voor een bepaling van de fototoxiciteit worden getest. De PIF- of MPE-waarden moeten in de buurt van de in tabel 1 vermelde waarden liggen.

Tabel 1

Chemische naam	EINECS-nr.	CAS-nr.	PIF	MPE	Absorptiepiek	Oplosmidde (1)
Amiodaron HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (schouder)	ethanol
Chloorpromazine HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	ethanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitril
Antraceen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfyrine IX, dinatrium	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	ethanol
L-Histidine		[7006-35-1]	geen PIF	0,05-0,10	211 nm	water
Hexachlorofeen	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (schouder)	ethanol
Natriumlaurylsulfaat	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	geen absorptie	water

(1) Het voor het meten van de absorptie gebruikte oplosmiddel.

2.4. INTERPRETATIE VAN DE GEGEVENS

Als er alleen bij de hoogste testconcentratie fototoxische effecten worden waargenomen (met name voor in water oplosbare teststoffen), kunnen er aanvullende gegevens nodig zijn om de gevaren te bepalen. Hierbij kan het gaan om gegevens over de absorptie door de huid en accumulatie van de chemische stof in de huid en/of gegevens uit andere tests waarbij de chemische stof bijvoorbeeld *in vitro* is getest op dierlijke of menselijke huid of huidmodellen.

▼B

Als er geen toxiciteit wordt aangetoond (+Irr en -Irr) en als een slechte oplosbaarheid beperkingen oplegt aan de concentraties die kunnen worden getest, kan men zich afvragen of de teststof wel compatibel is met de bepaling en moet een bevestigende test worden overwogen, bijvoorbeeld met een ander model.

3. **RAPPORTAGE**

TESTRAPPORT

Het testrapport moet ten minste de volgende informatie bevatten:

Teststof:

— identificatiegegevens, gangbare algemene naam en IUPAC- en CAS-nummer, indien bekend;

— fysische toestand en zuiverheid;

— fysisch-chemische eigenschappen die voor de uitvoering van de studie relevant zijn;

— UV/VIS-absorptiespectrum;

— stabiliteit en foto stabiliteit, indien bekend.

Oplosmiddel:

— motivering van de keuze van het oplosmiddel;

— oplosbaarheid van de teststof in het oplosmiddel;

— percentage oplosmiddel in het behandelingsmedium.

Cellen:

— type en bron van de cellen;

— afwezigheid van mycoplasma's;

— aantal celpassages indien bekend;

— stralingsgevoeligheid van de cellen, bepaald met de bestralingsapparatuur die bij de *in vitro* 3T3 NRU fototoxiciteitstest wordt gebruikt.

Testomstandigheden (1); incubatie vóór en na behandeling:

— type en samenstelling van het cultuurmedium;

— incubatieomstandigheden (CC_2-concentratie, temperatuur, vochtigheid);

— incubatieduur (voorbehandeling, nabehandeling).

Testomstandigheden (2); behandeling met de chemische stof:

— motivering van de keuze van de concentraties van de teststof die met en zonder bestraling zijn gebruikt;

— in geval van beperkte oplosbaarheid van de teststof en afwezigheid van cytotoxiciteit: motivering voor de hoogste geteste concentratie;

— type en samenstelling van het behandelingsmedium (gebufferde zoutoplossing);

— duur van de chemische behandeling.

Testomstandigheden (3); bestraling:

— motivering voor de keuze van de gebruikte lichtbron;

▼B

— fabrikant en aard van de lichtbron en de radiometer;

— spectrale bestralingskarakteristieken van de lichtbron;

— transmissie- en absorptiekarakteristieken van de gebruikte filters;

— karakteristieken van de radiometer en gedetailleerde gegevens over de kalibratie ervan;

— afstand van de lichtbron tot het testsysteem;

— UVA-bestralingssterkte op deze afstand, uitgedrukt in mW/cm^2;

— duur van de blootstelling aan UV/zichtbaar licht;

— UVA-dosis (bestralingssterkte x tijd), uitgedrukt in J/cm^2;

— temperatuur van de celculturen tijdens bestraling en de celculturen die gelijktijdig in het donker worden bewaard.

Testomstandigheden (4); neutraalrood-levensvatbaarheidstest:

— samenstelling van het neutraalrood-behandelingsmedium;

— duur van de neutraalrood-incubatie;

— incubatieomstandigheden (CO_2-concentratie, temperatuur, vochtigheid);

— neutraalrood-extractieomstandigheden (extractiemiddel, duur);

— golflengte voor de spectrofotometrische bepaling van de optische dichtheid van neutraalrood;

— tweede golflengte (referentie) indien gebruikt;

— inhoud van de blanco-cuvetten van de spectrofotometer, indien gebruikt.

Resultaten:

— levensvatbaarheid van de cellen, bepaald bij elke concentratie van de teststof, uitgedrukt in procentuele levensvatbaarheid ten opzichte van het gemiddelde van de parallelle oplosmiddelcontroles;

— concentratie/responscurves (concentratie van de teststof tegen de relatieve levensvatbaarheid van de cellen), verkregen bij de parallelle +Irr en -Irr-experimenten;

— analyse van de concentratie/responscurves: zo mogelijk berekening van de IC_{50} (+Irr) en de IC_{50} (-Irr);

— vergelijking van de twee concentratie/responscurves die met en zonder bestraling zijn verkregen, door berekening van de fotoirritatiefactor (PIF) of door berekening van het gemiddelde foto-effect (MPE);

— aanvaardbaarheidscriteria voor de test; parallelle oplosmiddelcontrole:

— absolute levensvatbaarheid (optische dichtheid van het neutraalrood-extract) van bestraalde en niet-bestraalde cellen;

— historische gegevens over negatieve en oplosmiddelcontrole; gemiddelden en standaarddeviaties;

— aanvaardbaarheidscriteria voor de test; parallelle positieve controle:

▼B

— IC_{50} (+Irr) en IC_{50} (-Irr) en PIF/MPE van de als positieve controle gebruikte chemische stof;

— historische gegevens van de als positieve controle gebruikte chemische stof: IC_{50} (+Irr) en IC_{50} (-Irr) en PIF/MPE; gemiddelden en standaarddeviaties.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

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) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

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.

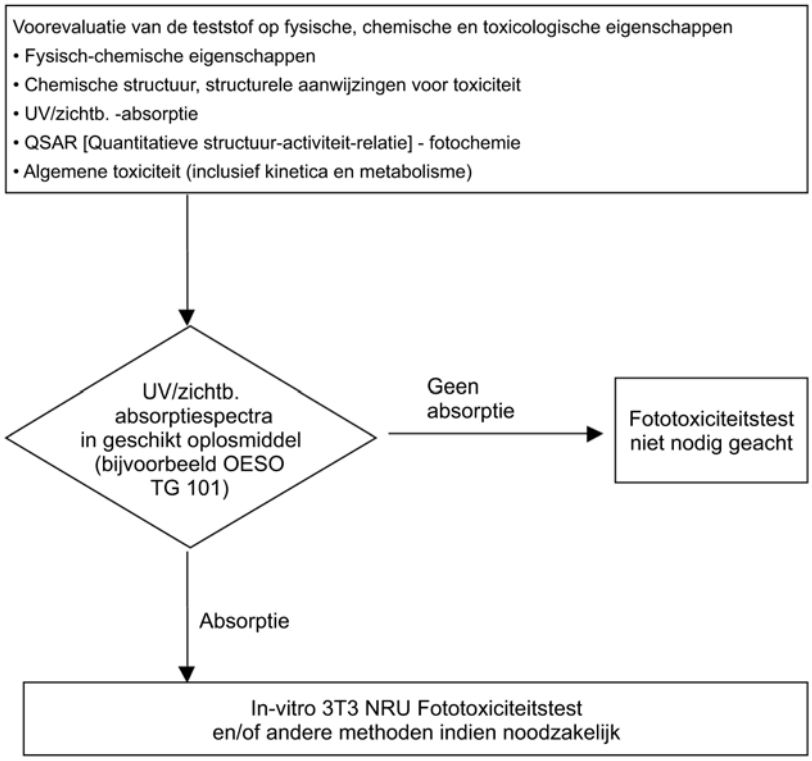
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/
0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1, 00. html

▼B

BIJLAGE 1

Rol van de 3T3 NRU fototoxiciteitstest in een sequentiële aanpak van het testen van de fototoxiciteit van chemische stoffen

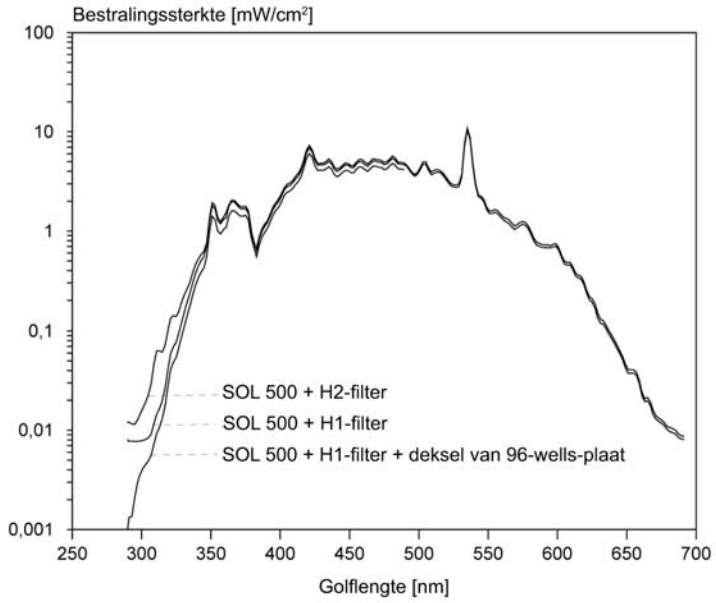


▼B

BIJLAGE 2

Figuur 1

Spectrale verdeling van een gefilterde zonnesimulator



(zie punt 1.4.1.5, tweede alinea)

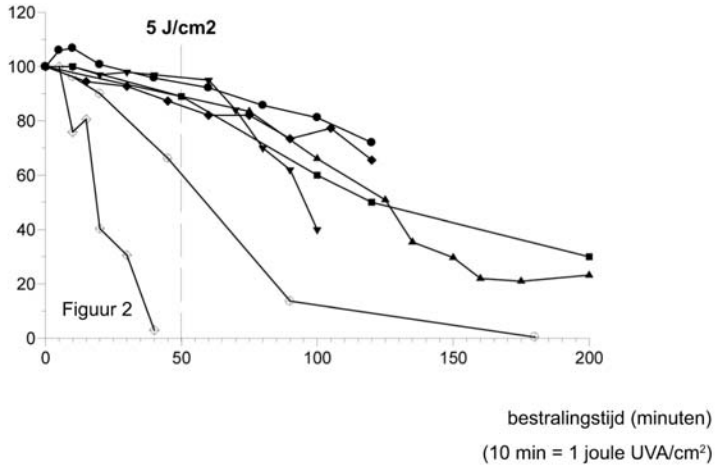
Figuur 1 geeft een voorbeeld van een aanvaardbare spectrale verdeling van de bestralingssterkte van een gefilterde zonnesimulator. Deze is afkomstig van de gedoteerde metaalhalide-bron die is gebruikt bij de valideringsstudie van de 3T3 NRU fototoxiciteitstest (6)(8)(17). In de figuur worden de effecten van twee verschillende filters en de extra filterende werking van het deksel van een 96-wells-celcultuurplaat aangegeven. Het H2-filter is alleen gebruikt bij testsystemen die een grotere hoeveelheid UVB kunnen verdragen (de huidmodeltest en de fotohemolysetest met rode bloedcellen). Bij de 3T3 NRU fototoxiciteitstest is het Hl-filter gebruikt. Uit de figuur blijkt dat de extra filterende werking van het deksel van de plaat vooral in het UVB-spectrum wordt waargenomen, maar nog genoeg UVB in het stralingsspectrum doorlaat voor de excitatie van chemische stoffen die een karakteristieke absorptie in het UVB-spectrum vertonen, zoals amiodaron (zie tabel 1).

▼B

Figuur 2

Bestralingsgevoeligheid van Balb/c 3T3-cellen (zoals gemeten in het UVA-spectrum)

Levensvatbaarheid van de cellen (% opname van neutraal rood van onbestraalde controle)



bestralingstijd (minuten) (10 min = 1 joule UVA/cm^2) (zie punt 1.4.1.5.2, tweede alinea, en de punten 1.4.2.2.1 en 1.4.2.2.2)

De gevoeligheid van Balb/c 3T3-cellen voor bestraling met de in de valideringsstudie van de 3T3 NRU fototoxiciteitstest gebruikte zonnesimulator, zoals gemeten in het UVA-spectrum. In de figuur zijn de resultaten weergegeven die in de pre-valideringsstudie in zeven verschillende laboratoria zijn verkregen (1). De twee curves met open symbolen zijn verkregen met oudere cellen (groot aantal passages), die door nieuwe celstammen moesten worden vervangen, terwijl de curves met dichte symbolen afkomstig zijn van cellen met een aanvaardbare bestralingstolerantie.

Uit deze gegevens is de hoogste niet-cytotoxische bestralingsdosis van 5 J/cm^2 afgeleid (verticale stippellijn). Daarnaast geeft de horizontale stippellijn het in punt 1.4.2.2 vermelde maximaal aanvaardbare bestralingseffect aan.

▼M3

B.42. **HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST**

INLEIDING

1. De OESO-richtlijnen inzake het testen van chemische stoffen (Guidelines for the Testing of Chemicals) en de daarop gebaseerde EU-testmethoden worden regelmatig herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, zich wijzigende behoeften aan regelgeving en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. De oorspronkelijke testmethode (TM) voor het bepalen van de huidsensibilisatie bij muizen, de lokale lymfkliertest (LLKT; OESO-testrichtlijn 429; hoofdstuk B.42 van deze bijlage) werd eerder goedgekeurd (1). Er zijn publicaties verschenen met de gegevens over de validering van de LLKT en een overzicht van gerelateerd onderzoek (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). De bijgewerkte LLKT is gebaseerd op de evaluatie van ervaringen en wetenschappelijke gegevens (12). Dit is de tweede TM die is ontworpen om de potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen (stoffen en mengsels) bij dieren te bepalen. Bij de andere TM (d.w.z. OESO-testrichtlijn 406; hoofdstuk B.6 van deze bijlage) worden cavia's gebruikt: de maximalisatietest en de Buehlertest (13). De LLKT biedt ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (13) voordelen op het gebied van dierenwelzijn. Deze bijgewerkte LLKT-testmethode omvat een reeks prestatienormen (aanhangsel 1) die gebruikt kunnen worden om de valideringsstatus te evalueren van de nieuwe en/of gewijzigde testmethoden die in functioneel en mechanistisch opzicht vergelijkbaar zijn met de LLKT, overeenkomstig de beginselen van OESO-leidraad nr. 34 (14).

2. De LLKT bestudeert de inductiefase van huidsensibilisatie en levert kwantitatieve gegevens op die voor een dosis/responsbepaling kunnen worden gebruikt. Opgemerkt dient te worden dat de milde/gematigde sensibilisatoren die worden aanbevolen als geschikte chemische stoffen voor positieve controle bij tests met cavia's (d.w.z. B. 6; OESO-testrichtlijn 406) (13) ook geschikt zijn om bij de LLKT te worden gebruikt (6) (8) (15). Een benadering gericht op vermindering van het proefdiergebruik (verminderde LLKT (vLLKT)), die kan leiden tot een vermindering van het proefdiergebruik met wel 40 %, wordt in deze TM tevens als een optie beschreven (16) (17) (18). De vLLKT kan worden gebruikt indien op grond van regelgeving een noodzaak bestaat om een negatieve prognose van het huidsensibilisatiepotentieel te bevestigen, op voorwaarde dat aan alle andere specificaties van het LLKT-protocol wordt voldaan, zoals beschreven in deze TM. De prognose van een negatief resultaat moet gebaseerd zijn op alle beschikbare informatie als bedoeld in punt 4. Voordat de vLLKT-benadering wordt toegepast, moeten een duidelijke rechtvaardiging en een wetenschappelijke motivering voor de toepassing ervan worden overgelegd. Indien in de vLLKT, tegen de verwachtingen in, een positief of moeilijk te interpreteren resultaat wordt verkregen, kunnen aanvullende tests nodig zijn om de bevinding te interpreteren of te verduidelijken. De vLLKT mag niet worden gebruikt om gevaren van stoffen die worden gebruikt in huidsensibilisatietests te signaleren indien dosis/responsinformatie nodig is, zoals in het geval van de onderverdeling voor Verordening (EG) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels en het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties.

DEFINITIES

3. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 2.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

4. De LLKT is een alternatieve methode die kan worden gebruikt om potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen te signaleren. Dit houdt niet noodzakelijkerwijs in dat de LLKT in alle gevallen in plaats van de proef met cavia's moet worden gebruikt (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13), maar veeleer dat de test gelijkwaardig is en als alternatief kan worden gebruikt, waarbij positieve en negatieve resultaten niet langer behoeven te worden bevestigd. Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het

▼M3

onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Dergelijke informatie omvat tevens de identiteit en chemische structuur van de teststof; de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de uitkomsten van eventuele andere met de teststof in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests; en toxicologische gegevens betreffende structureel verwante chemische stoffen. Deze informatie moet in overweging worden genomen om te bepalen of de LLKT geschikt is voor de stof (gezien de incompatibiliteit van sommige soorten chemische stoffen met de LLKT, zie punt 5) en om de dosis beter te kunnen vaststellen.

5. De LLKT is een in-vivomethode en leidt er derhalve niet toe dat er bij de bepaling van allergische contactsensibilisatie geen dieren meer worden gebruikt. Het is echter wel mogelijk dat het aantal daarvoor gebruikte dieren wordt beperkt. Bovendien zorgt de LLKT voor een aanzienlijke verfijning (minder pijn en leed) van de manier waarop dieren voor het testen op allergische contactsensibilisatie worden gebruikt. De LLKT is gebaseerd op het onderzoek van immunologische gebeurtenissen die tijdens de inductiefase van sensibilisatie door chemische stoffen worden gestimuleerd. In tegenstelling tot de proeven met cavia's (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13) behoeven bij de LLKT geen door provocatie geïnduceerde overgevoeligheidsreacties van de huid te worden opgewekt. Bovendien behoeft bij de LLKT geen adjuvans te worden gebruikt, hetgeen bij de maximalisatietest bij cavia's wel nodig is (13). Dit betekent dat de pijn en het ongerief voor dieren bij de LLKT geringer zijn. Ondanks de voordelen van de LLKT ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 moet worden gesteld dat er bepaalde beperkingen zijn waardoor het gebruik van B.6 of OESO-testrichtlijn 406 (13) nodig kan zijn (bijvoorbeeld valsnegatieve resultaten bij de LLKT met bepaalde metalen of valspositieve resultaten met bepaalde stoffen die de huid irriteren [zoals bepaalde soorten oppervlakteactieve chemische stoffen] (19) (20), of de oplosbaarheid van de teststof). Daarnaast kan in het geval van chemische klassen of stoffen die functionele groepen bevatten waarvan is aangetoond dat ze als potentiële stoorfactoren (21) werken, het gebruik van proeven met *cavia's* (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13) nodig zijn. Ook bestaat er bij de LLKT, op basis van de databank van stoffen met beperkte validering, die hoofdzakelijk uit pesticideformuleringen bestond, een hogere kans op een positieve uitkomst voor deze soorten teststoffen dan bij proeven met cavia's (22). Echter, het is het overwegen waard om soortgelijke stoffen met bekende uitkomsten als referentiestoffen te gebruiken, teneinde aan te tonen dat de LLKT correct functioneert (zie punt 16). Afgezien van dergelijke bekende beperkingen zou de LLKT toepasbaar moeten zijn voor het testen van alle stoffen, tenzij deze stoffen eigenschappen hebben die de nauwkeurigheid van de LLKT negatief kunnen beïnvloeden.

PRINCIPE VAN DE TEST

6. Het beginsel dat aan de LLKT ten grondslag ligt, is dat sensibilisatoren de proliferatie induceren van lymfocyten in de lymfklieren die de afvoer verzorgen van de plaats waar de teststof wordt aangebracht. Deze proliferatie is evenredig met de dosis en de potentie van het aangebrachte allergeen en biedt een eenvoudige mogelijkheid om een kwantitatieve meting van de sensibilisatie uit te voeren. De proliferatie wordt gemeten door de gemiddelde proliferatie in iedere testgroep te vergelijken met de gemiddelde proliferatie in de met medium behandelde controlegroepen. De verhouding tussen de gemiddelde proliferatie bij iedere behandelde groep en bij de gelijktijdige medium-controlegroep wordt bepaald en deze zogenaamde stimuleringsindex moet minimaal drie zijn, voordat het gerechtvaardigd is om de teststof in te delen als potentiële huidsensibilisator. De hier beschreven procedures zijn gebaseerd op het gebruik van in vivo radioactieve markering om een toegenomen aantal delende cellen in de afvoerende lymfklieren te meten. Echter, ook andere eindpunten voor de bepaling van het aantal delende cellen kunnen worden gebruikt, mits volledig wordt voldaan aan de prestatienormvereisten (aanhangsel 1).

▼M3

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Keuze van de diersoort

7. Voor deze test worden bij voorkeur muizen gebruikt. Er worden jonge volwassen vrouwtjesmuizen van de CBA/Ca- of CBA/J-stam gebruikt, die nog geen jongen hebben gehad en niet drachtig zijn. Bij het begin van het onderzoek moeten de dieren 8-twaalf weken oud zijn; het gewichtsverschil tussen de dieren moet minimaal zijn en de afwijking mag niet groter zijn dan 20 % van het gemiddelde gewicht. Er mogen ook andere stammen of mannetjes worden gebruikt, wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn om aan te tonen dat er geen significante stam- en/of geslachtsspecifieke verschillen in de LLKT-respons zijn.

Huisvesting en voeding

8. De muizen moeten in groepjes worden ondergebracht (23), tenzij een individuele behuizing van de muizen naar behoren wetenschappelijk wordt gemotiveerd. De temperatuur van de proefdierruimte dient 22 ± 3 °C te zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

Voorbereiding van de dieren

9. De dieren worden aselect ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren (maar niet door enigerlei vorm van oormerking) en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen. Vóór het begin van de behandeling worden alle dieren onderzocht om vast te stellen dat ze geen waarneembaar huidletsel hebben.

Bereiding van de doseeroplossingen

10. Vaste chemische stoffen moeten in oplosmiddelen/media worden opgelost of gesuspendeerd en, indien nodig, verdund vóór aanbrenging op een oor van de muis. Vloeibare chemische stoffen kunnen onverdund worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Onoplosbare chemische stoffen, zoals die gewoonlijk voorkomen in medische apparaten, moeten worden onderworpen aan een maximale extractie in een geschikt oplosmiddel om alle extraheerbare bestanddelen voor het testen vrij te maken vóór aanbrenging op een oor van de muis. Teststoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

Betrouwbaarheidscontrole

11. Voor positieve controle gebruikte stoffen (PC's) worden gebruikt om aan te tonen dat de test correct werkt in de zin dat de test leidt tot een respons met voldoende en reproduceerbare gevoeligheid, waarbij de omvang van de respons goed gedocumenteerd is. Gelijktijdig gebruik van een PC wordt aanbevolen, omdat hiermee wordt aangetoond dat het laboratorium de competentie bezit om iedere test succesvol uit te voeren en omdat de intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en -overdraagbaarheid hiermee kan worden beoordeeld. Een PC voor iedere studie wordt ook vereist door sommige regelgevende autoriteiten en derhalve worden gebruikers aangemoedigd de relevante autoriteiten te raadplegen alvorens de LLKT uit te voeren. Derhalve wordt het routinematige gelijktijdige gebruik van een PC aangemoedigd, zodat geen noodzaak bestaat om aanvullende dierproeven uit te voeren om te voldoen aan dergelijke vereisten die kunnen voortkomen uit het gebruik van een periodieke PC (zie punt 12). De PC moet een positieve LLKT-respons opleveren bij een blootstellingsniveau waarbij in vergelijking met de negatieve controlegroep een stijging van de SI met > 3 wordt verwacht. De dosis van de PC moet zo worden gekozen dat de stof geen overmatige huidirritatie of systemische toxiciteit veroorzaakt en de inductie

▼M3

reproduceerbaar is, maar niet buitensporig (d.w.z. een SI > 20 zou buitensporig zijn). Bij voorkeur moeten 25 % hexylcinnamaldehyde (Chemical Abstracts Service [CAS] nr. 101-86-0) in aceton: olijfolie (4:1, v/v) en 5 % mercaptobenzothiazool (CAS-nr. 149-30-4) in *N,N*-dimethylformamide worden gebruikt (zie aanhangsel 1, tabel 1). Onder bepaalde omstandigheden kunnen andere PC's worden gebruikt die aan bovengenoemde criteria voldoen, mits een afdoende motivering wordt gegeven.

12. Hoewel het gelijktijdige gebruik van een PC-groep aanbevolen wordt, kunnen er situaties zijn waarin periodiek testen (d.w.z. met intervallen ≤ zes maanden) van de PC toereikend kan zijn voor laboratoria die de LLKT regelmatig uitvoeren (d.w.z. de LLKT uitvoeren met een frequentie van niet minder dan eenmaal per maand) en die een historische PC-databank hebben die aantoont dat het laboratorium in staat is om reproduceerbare en nauwkeurige uitkomsten met PC's te verkrijgen. Toereikende ervaring met de LLKT kan worden aangetoond door consequent positieve uitkomsten te genereren in ten minste tien onafhankelijke tests die binnen een redelijke tijdspanne (d.w.z. binnen één jaar) worden uitgevoerd.

13. Gelijktijdig gebruik van een PC-groep is verplicht in geval van een procedurewijziging in de LLKT (bv. wijziging van gekwalificeerd personeel, wijziging in de materialen en/of reagentia van de testmethode, wijziging van de testapparatuur, wijziging van de bron van proefdieren), en dergelijke wijzigingen moeten in laboratoriumverslagen worden gedocumenteerd. Het effect van dergelijke wijzigingen op de nauwkeurigheid van de eerder opgerichte historische databank moet in overweging worden genomen om te bepalen of het nodig is een nieuwe historische databank op te richten, teneinde consistentie in de documentatie van de PC-uitkomsten te waarborgen.

14. Onderzoekers dienen zich ervan bewust te zijn dat de beslissing om een PC-onderzoek op periodieke basis uit te voeren in plaats van gelijktijdig, consequenties heeft voor de nauwkeurigheid en aanvaardbaarheid van negatieve onderzoeksuitkomsten die zijn gegenereerd zonder gelijktijdig gebruik van een PC tijdens het interval tussen opeenvolgende periodieke PC-onderzoeken. Indien bijvoorbeeld een valsnegatieve uitkomst is verkregen in het periodieke PC-onderzoek, kunnen negatieve resultaten voor teststoffen die zijn verkregen in het interval tussen het laatste aanvaardbare periodieke PC-onderzoek en het onaanvaardbare PC-onderzoek in twijfel worden getrokken. De implicaties van deze uitkomsten moeten zorgvuldig in overweging worden genomen om te bepalen of PC's gelijktijdig moeten worden gebruikt of dat alleen periodieke PC-onderzoeken moeten worden uitgevoerd. Tevens moet overwogen worden om minder dieren te gebruiken in de gelijktijdige PC-groep, indien dit wetenschappelijk gerechtvaardigd is en indien het laboratorium aantoont, op basis van laboratoriumspecifieke historische gegevens, dat minder muizen gebruikt kunnen worden (12).

15. Hoewel de PC moet worden getest in een medium waarvan bekend is dat het een consequente respons oplevert (bv. aceton: olijfolie; 4:1, v/v), kan de regelgeving in bepaalde gevallen vereisen dat de tests ook in een ongebruikelijk medium (een klinisch/chemisch relevante formulering) worden uitgevoerd (24). Indien de gelijktijdig gebruikte PC in een ander medium wordt getest dan de teststof, moet een afzonderlijke met medium behandelde groep voor de gelijktijdig gebruikte PC worden gebruikt.

16. In gevallen waarin teststoffen van een specifieke chemische klasse of bereik van responsen worden geëvalueerd, kunnen referentiestoffen ook nuttig zijn om aan te tonen dat de testmethode correct functioneert voor het signaleren van het huidsensibilisatiepotentieel van deze soorten stoffen. Geschikte referentiestoffen moeten de volgende eigenschappen hebben:

— ze moeten structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de klasse van de teststof die wordt getest;

— hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn;

— uit de LLKT afkomstige gegevens ondersteunen;

— uit andere diermodellen en/of van mensen afkomstige gegevens ondersteunen.

▼M3

UITVOERING VAN DE PROEF

Aantal dieren en hoogte van de doses

17. Er worden minimaal vier dieren per dosisgroep gebruikt en ten minste drie concentraties van de teststof plus een negatieve controlegroep (NC-groep), die alleen met het medium voor de teststof wordt behandeld, en een PC (gelijktijdig of recentelijk uitgevoerd, op basis van het laboratoriumbeleid zoals beschreven in de punten 11-15). Het testen van meerdere doses van de PC moet overwogen worden, in het bijzonder wanneer de PC op periodieke basis wordt getest. Behalve dat de dieren in de controlegroepen niet met de teststof worden behandeld, worden ze verder op identieke wijze behandeld als de dieren in de behandelde groepen.

18. De keuze van de doses en het medium wordt gebaseerd op de aanbevelingen in de referenties (3) en (5), Opeenvolgende doses worden doorgaans gekozen uit een geschikte concentratiereeks, zoals 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % enz. Aan de keuze van de gebruikte concentratiereeks moet een toereikende wetenschappelijke motivering ten grondslag liggen. Bij de keuze van de drie opeenvolgende concentraties moet rekening worden gehouden met alle bestaande toxicologische gegevens (bv. met betrekking tot acute toxiciteit en huidirritatie), wanneer die beschikbaar zijn, zodat bij de hoogste concentratie de blootstelling maximaal is zonder dat dit tot systemische toxiciteit en bovenmatige lokale huidirritatie leidt (3) (25). Wanneer dergelijke informatie niet beschikbaar is, kan een initiële voorafgaande screeningtest nodig zijn (zie punten 21-24).

19. Het medium mag het testresultaat niet verstoren of er invloed op uitoefenen en moet worden gekozen met het oog op de hoogste mate van oplosbaarheid, zodat de hoogst mogelijke concentratie wordt verkregen, terwijl de oplossing/suspensie geschikt moet zijn om de teststof mee aan te brengen. Aanbevolen media zijn aceton: olijfolie (4:1, v/v), *N,N*-dimethylformamide, methylethylketon, propyleenglycol en dimethylsulfoxide (19), maar ook een ander medium mag worden gebruikt als daarvoor een afdoende wetenschappelijke motivering wordt gegeven. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn als extra controle een klinisch relevant oplosmiddel te gebruiken of de commerciële formulering waarin de teststof in de handel wordt gebracht. Er moet vooral voor worden gezorgd dat hydrofiele teststoffen worden opgenomen in een medium dat de huid vochtig maakt en niet onmiddellijk wegloopt. Dit kan worden bereikt door geschikte oplosbaar makende stoffen (bv. 1 % Pluronic® L92) toe te voegen. Een volledig waterig medium moet derhalve worden vermeden.

20. Door de verwerking van lymfklieren van individuele muizen kan de spreiding over de dieren worden beoordeeld en kan een statistische vergelijking tussen de teststofmetingen en de metingen voor de met medium behandelde controlegroep worden uitgevoerd (zie punt 35). Daarnaast kan door het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren de mogelijkheid onderzocht worden om het aantal muizen in de PC-groep te verminderen (12). Verder vereisen sommige regelgevende autoriteiten het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren. Niettemin kunnen gepoolde diergegevens aanvaardbaar zijn voor bepaalde regelgevende autoriteiten en in dergelijke situaties kunnen gebruikers mogelijk kiezen of ze individuele of gepoolde diergegevens verzamelen.

Voorafgaande screeningtest

21. Wanneer er geen gegevens beschikbaar zijn om de hoogste te testen dosis te bepalen (zie punt 18), moet een voorafgaande screeningtest worden uitgevoerd om de juiste dosis te bepalen die in de LLKT getest moet worden. Het doel van de voorafgaande screeningtest is om richtsnoeren te bieden voor het kiezen van de maximale dosis in het hoofdonderzoek van de LLKT, indien informatie over de concentratie die systemische toxiciteit induceert (zie punt 24) en/of bovenmatige huidirritatie (zie punt 23) niet beschikbaar is. De maximale dosis die wordt getest, moet 100 % zijn van de teststof voor vloeibare stoffen of de hoogst mogelijke concentratie voor vaste stoffen of suspensies.

▼M3

22. De voorafgaande screeningtest wordt uitgevoerd onder omstandigheden die identiek zijn aan die van het hoofdonderzoek van de LLKT, behalve dat er geen beoordeling is van de lymfklierproliferatie en er minder dieren per dosisgroep kunnen worden gebruikt. Aanbevolen wordt per dosisgroep een of twee dieren te gebruiken. Alle muizen worden dagelijks geobserveerd op klinische verschijnselen van systemische toxiciteit of op lokale irritatie op de plaats van aanbrengen. Het lichaamsgewicht van de dieren wordt geregistreerd voorafgaand aan de test en vóór de beëindiging van de test (dag 6). Beide oren van iedere muis worden onderzocht op erytheem en de responsen worden ingeschaald met behulp van tabel 1 (25). De dikte van de oren wordt gemeten met behulp van een diktemeter (bv. een digitale micrometer of een Peacock Dial-diktemeter) op dag 1 (vóór aanbrenging van de dosis), dag 3 (ongeveer 48 uur na de eerste dosis) en dag 6. Daarnaast kan op dag 6 de dikte worden bepaald door oorperforatiemetingen, die uitgevoerd moeten worden nadat de dieren op humane wijze zijn gedood. Bovenmatige huidirritatie wordt aangegeven door een erytheemscore ≥ 3 en/of een toename van de oordikte $\geq 25\,\%$ op een of meer van de meetdagen (26) (27). De hoogste dosis die voor het hoofdonderzoek van de LLKT wordt gekozen, is de volgende lagere dosis in de concentratiereeks van de voorafgaande screeningtest (zie punt 18) die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie veroorzaakt.

Tabel 1

Erytheemscores

Waarneming	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

23. Naast een toename van de oordikte met 25 % (26) (27), is een statistisch significante toename van de oordikte bij de behandelde muizen in vergelijking met de controlemuizen ook gebruikt om irriterende stoffen in de LLKT te signaleren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Echter, hoewel statistisch significante toenamen kunnen voorkomen bij een toename van de oordikte met minder dan 25 %, worden ze niet specifiek met bovenmatige huidirritatie in verband gebracht (30) (32) (33) (34).

24. De volgende klinische waarnemingen kunnen duiden op systemische toxiciteit (35) (36) wanneer gebruikt als onderdeel van een geïntegreerde beoordeling en kunnen derhalve de maximale dosis aangeven die in het hoofdonderzoek van de LLKT moet worden gebruikt: veranderingen in de werking van het zenuwstelsel (bv. pilo-erectie, ataxie, tremors en convulsies); veranderingen in gedrag (bv. agressiviteit, verandering in lichaamsverzorging, duidelijke verandering in het activiteitsniveau); veranderingen in ademhalingspatronen (bv. veranderingen in de frequentie en intensiteit van het ademhalen, zoals kortademigheid, benauwdheid en gereutel) en veranderingen in de voedsel- en waterconsumptie. Daarnaast moet in de evaluatie rekening worden gehouden met tekenen van lethargie en/of gebrek aan reactiviteit alsmede klinische tekenen van meer dan lichte of voorbijgaande pijn en leed of een vermindering van het lichaamsgewicht van meer dan 5 % tussen dag 1 en dag 6, evenals het sterftecijfer. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, moeten op humane wijze worden gedood (37)

▼M3

Proefopzet hoofdonderzoek

25. De proefopzet van het onderzoek is als volgt:

— *Dag 1:* Van elk dier apart wordt het gewicht en iedere klinische waarneming bepaald en vastgelegd. Vervolgens wordt 25 µl van de verdunning van de teststof, het medium zonder teststof of de positieve controle (gelijktijdig of recent, op basis van het in de punten 11-15 beschreven beleid), open aangebracht op het dorsum van elk oor.

— *Dagen 2 en 3:* Herhaal de aanbrengprocedure van dag 1.

— *Dagen 4 en 5:* Geen behandeling.

— *Dag 6:* Van elk dier wordt het gewicht vastgelegd. Injecteer bij de muizen van alle test- en controlegroepen 250 µl PBS (phosphate-buffered saline) die 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritiumhoudende (^{3}H)-methylthymidine bevat in de staartader. Een andere mogelijkheid is injectie van 250 µl PBS die 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jooddeoxyuridine en 10^{-5}M fluordeoxyuridine bevat bij alle muizen in de staartader. Vijf uur (5 u) later worden de dieren op humane wijze gedood. De afvoerende auriculaire lymfklieren van elk oor worden uitgeprepareerd en voor ieder dier afzonderlijk gepoold in PBS (individuele aanpak); het is ook mogelijk de lymfklieren van elk oor uit te prepareren en in PBS te poolen voor iedere behandelgroep (groepsgewijze aanpak). Referentie (12) bevat gedetailleerde informatie en diagrammen voor de identificatie en het uitprepareren van de lymfklieren. Om de lokale huidreacties in het hoofdonderzoek nader te onderzoeken, kunnen aanvullende parameters in het onderzoeksprotocol worden opgenomen, zoals de inschaling van oorerytheem of oordiktemetingen (verkregen door gebruik van een diktemeter of door oorperforatiemetingen bij de necropsie).

Bereiding van de celsuspensies

26. Er wordt een eencellige suspensie gemaakt met lymfkliercellen van aparte dieren of van gepoolde groepen door het weefsel voorzichtig door een roestvrij stalen gaas met een maaswijdte van 200 µm te persen of met behulp van een andere acceptabele techniek voor het genereren van een eencellige suspensie. De lymfkliercellen worden tweemaal gewassen met een overmaat PBS en het DNA wordt neergeslagen met 5 % trichloorazijnzuur (TCA) bij 4 °C gedurende 18 uur (3). Het neerslag wordt geresuspendeerd in 1 ml TCA en voor ^{3}H-telling overgebracht in scintillatie-telflesjes die 10 ml scintillatievloeistof bevatten, of direct overgebracht in gammatelbuizen voor ^{125}I-telling.

Bepaling van celproliferatie (opgenomen radioactiviteit)

27. De opname van ^{3}H-methylthymidine wordt gemeten door β-scintillatietelling als desintegraties per minuut (DPM). De opname van ^{125}I-jooddeoxyuridine wordt gemeten door ^{125}I-telling en ook als DPM uitgedrukt. Afhankelijk van de gevolgde werkwijze wordt de opname uitgedrukt als DPM/muis (individuele aanpak) of DPM/behandelingsgroep (groepsgewijze aanpak).

Verminderde LLKT

28. In bepaalde situaties, wanneer er op grond van regelgeving een noodzaak bestaat om een negatieve voorspelling van het huidsensibilisatiepotentieel te bevestigen, kan een optioneel protocol voor verminderde LLKT (vLLKT) (16) (17) (18) met gebruikmaking van minder dieren worden gebruikt, op voorwaarde dat aan alle andere LLKT-protocolspecificaties in deze TM wordt voldaan. Voordat de vLLKT-benadering wordt toegepast, moeten een duidelijke rechtvaardiging en een wetenschappelijke motivering voor de toepassing ervan worden overgelegd. Als een positief of moeilijk te interpreteren uitkomst wordt verkregen, kan het nodig zijn om aanvullende tests uit te voeren om de bevinding te interpreteren of te verduidelijken.

▼M3

29. De vermindering van het aantal dosisgroepen is het enige verschil tussen de LLKT- en de vLLKT-testmethodeprotocollen en derhalve levert de vLLKT geen dosis/responsgegevens op. Dit betekent dat de vLLKT niet mag worden gebruikt indien dosis-responsgegevens benodigd zijn. Zoals bij de LLKT met meerdere doses, moet de teststofconcentratie die bij de vLLKT wordt beoordeeld de maximale concentratie zijn die geen duidelijke systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie bij de muis veroorzaakt (zie punt 18).

WAARNEMINGEN

Klinische waarnemingen

30. Iedere muis wordt ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd op klinische verschijnselen van lokale irritatie op de plaats van aanbrengen of systemische toxiciteit. Alle waarnemingen worden systematisch geregistreerd en van elke muis wordt een apart overzicht bijgehouden. Waarnemingsschema's dienen criteria te omvatten om muizen die tekenen vertonen van systemische toxiciteit, overmatige lokale huidirritatie of huidcorrosie onmiddellijk aan te wijzen voor euthanasie (37).

Lichaamsgewicht

31. Zoals in punt 25 is vermeld, wordt aan het begin van de test en wanneer de dieren volgens schema op humane wijze worden gedood, van elk dier het lichaamsgewicht bepaald.

BEREKENING VAN RESULTATEN

32. De resultaten voor iedere behandelingsgroep worden uitgedrukt als de stimuleringsindex (SI). Bij de individuele aanpak wordt de SI berekend door de gemiddelde DPM/muis van elke groep behandeld met teststof en de positieve cont rolegroep, te delen door de gemiddelde DPM/muis voor de medium-controlegroep. De gemiddelde SI voor de met medium behandelde controles is dan 1. Bij de groepsgewijze aanpak wordt de SI berekend door de totale opname van radioactiviteit voor elke behandelde groep te delen door de totale opname van radioactiviteit voor de medium-controlegroep; dit levert een gemiddelde SI op.

33. Binnen het beslissingsproces wordt een resultaat als positief beschouwd, indien SI $\geq$ 3. Echter, de sterkte van de dosis/respons, de statistische significantie en de consistentie van de medium-controlegroep- en PC-responsen kunnen ook worden gebruikt om te bepalen of een resultaat dat een grensgeval is, positief wordt verklaard (4) (5) (6).

34. Als de verkregen resultaten onduidelijk zijn, moet worden gekeken naar verschillende eigenschappen van de teststof, bijvoorbeeld of deze qua structuur verwant is met bekende huidsensibilisatoren, of de stof overmatige huidirritatie veroorzaakt en wat de aard van de waargenomen dosis/responsverhouding is. Deze en andere overwegingen worden elders gedetailleerd besproken (7).

35. Door radioactiviteitsgegevens te verzamelen op het niveau van de individuele muis, kan een statistische analyse worden uitgevoerd voor het bestaan van een dosis/responsverhouding binnen de gegevens en de mate waarin deze verhouding voorkomt. Iedere statistische beoordeling kan een evaluatie omvatten van de dosis/responsverhouding evenals afdoende aangepaste vergelijkingen van testgroepen (bv. paarsgewijs gedoseerde groep tegenover vergelijkingen van een gelijktijdig met medium behandelde controlegroep). Statistische analyses kunnen *bijvoorbeeld* lineaire regressie omvatten of de test van William voor het beoordelen van dosis/responstrends, alsmede de test van Dunnett voor paarsgewijze vergelijkingen. Bij het kiezen van een geschikte statistische analysemethode moet de onderzoeker zich bewust blijven van mogelijke variantie-heterogeniteit en andere soortgelijke problemen, die een gegevenstransformatie of een niet-parametrische statistische analyse noodzakelijk kunnen maken. In ieder geval kan het nodig zijn dat de onderzoeker SI-berekeningen en statistische analyses uitvoert met en zonder bepaalde gegevenspunten (soms „uitbijters” genoemd).

▼M3

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

36. Gegevens moeten in tabelvorm worden samengevat. Bij de individuele aanpak moeten de DPM-waarden voor individuele dieren worden weergegeven, alsmede de gemiddelde DPM/dier per groep, het bijbehorende residu (bv. SD, SEM), en de gemiddelde SI voor iedere dosisgroep in vergelijking met de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep. Bij gebruik van de benadering voor gepoolde behandelingsgroepen moet de gemiddelde/mediane DPM en de gemiddelde SI voor iedere dosisgroep in vergelijking met de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep worden weergegeven.

Testverslag

37. In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Test- en controlestoffen:

— identificatiegegevens (bv. CAS- en EG-nummers, indien beschikbaar; bron; zuiverheid; bekende onzuiverheden; partijnummer);

— de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de vluchtigheid, de stabiliteit en de oplosbaarheid);

— bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte;

Oplosmiddel/medium:

— identificatiegegevens (zuiverheid; concentratie, indien van toepassing; gebruikt volume);

— motivering van de keuze van het medium;

Proefdieren:

— bron van CBA-muizen;

— microbiologische status van de dieren, indien bekend;

— aantal en leeftijd van de dieren;

— de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.;

Testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over de formulering en het aanbrengen van de teststof;

— motivering voor dosiskeuze (met inbegrip van resultaten van voorafgaande screeningtest, indien uitgevoerd);

— gebruikte concentraties van medium en teststof en totale hoeveelheid teststof die is aangebracht;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water (waaronder de aard en de herkomst van het voer en de herkomst van het water);

— gedetailleerde gegevens met betrekking tot het behandelings- en bemonsteringsschema;

— methoden voor de meting van de toxiciteit;

— criteria om te bepalen of het resultaat positief of negatief is;

— gedetailleerde gegevens met betrekking tot protocolafwijkingen en een uitleg van hoe de afwijking van invloed is op de opzet en resultaten van het onderzoek;

Betrouwbaarheidscontrole:

— overzicht van de resultaten van de meest recente betrouwbaarheidscontrole met informatie over de teststof, de concentratie en het gebruikte medium;

— tegelijkertijd en/of in het verleden bepaalde positieve en negatieve controlegegevens voor het testlaboratorium;

▼M3

— indien geen gelijktijdige PC is uitgevoerd, de datum en het laboratoriumverslag voor de meest recente periodieke PC en een verslag met de historische PC-gegevens voor het laboratorium waarin de beslissing om geen gelijktijdige PC uit te voeren, wordt gemotiveerd;

Resultaten:

— het gewicht van elke muis aan het begin van de test en wanneer deze volgens schema wordt gedood; evenals het gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor iedere behandelingsgroep;

— voor elk dier het tijdstip waarop de eventuele toxiciteitsverschijnselen zich voordoen, met inbegrip van huidirritatie op de toedieningsplaats, en het verloop daarvan;

— een tabel met de DPM-waarden van individuele muizen (individuele aanpak per dier) of de gemiddelde/mediane DPM-waarden (groepsgewijze aanpak) en de SI-waarden voor iedere behandelingsgroep;

— gemiddeld bijbehorend residu (bv. SD, SEM) voor de DPM/muis voor elke behandelingsgroep en de resultaten van uitbijteranalyses voor elke behandelingsgroep bij toepassing van de individuele aanpak per dier;

— berekende SI en een geschikte meting van de variabiliteit die rekening houdt met de spreiding over de dieren in zowel de teststof- als de controlegroepen bij toepassing van de individuele benadering per dier;

— dosis/responsverhouding;

— statistische analyses, indien van toepassing;

Bespreking van de resultaten:

— een korte bespreking van de resultaten, de dosis/respons-analyse en de statistische analyses, indien van toepassing, met een conclusie ten aanzien van de vraag of de teststof als huidsensibilisator moet worden beschouwd.

LITERATUUR

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼**M3**

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Aanhangsel 1

Prestatienormen voor beoordeling van voorgestelde soortgelijke of gewijzigde LLKT-testmethoden voor huidsensibilisatie

INLEIDING

1. Prestatienormen zijn bedoeld om mee te delen op welke grondslag kan worden vastgesteld dat nieuwe testmethoden, zowel niet-generieke methoden (d.w.z. methoden die beschermd zijn door het auteursrecht, die een handelsmerk hebben en die geregistreerd zijn) als generieke methoden, bepaald kunnen worden teneinde voldoende nauwkeurigheid en betrouwbaarheid te bieden voor specifieke testdoeleinden. Deze prestatienormen, die gebaseerd zijn op gevalideerde en geaccepteerde testmethoden, kunnen worden gebruikt om de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid te beoordelen van andere soortgelijke methoden (informeel „me too"-tests genoemd) die gebaseerd zijn op soortgelijke wetenschappelijke principes en die hetzelfde biologische of toxische effect meten of voorspellen (14).

2. Voordat gewijzigde methoden (d.w.z. voorgestelde potentiële verbeteringen van een goedgekeurde testmethode) gebruikt kunnen worden, moet een evaluatie worden uitgevoerd ter bepaling van het effect van de voorgestelde wijzigingen op de prestaties van de test en de mate waarin dergelijke wijzigingen de informatie beïnvloeden die beschikbaar is voor de andere componenten van het valideringsproces. Afhankelijk van de aard van de voorgestelde wijzigingen en hun aantal, de gegenereerde gegevens en ondersteunende documentatie voor deze wijzigingen, moeten ze onderworpen worden aan hetzelfde valideringsproces als het voor een nieuwe test beschreven proces of, indien van toepassing, aan een beperkte beoordeling van betrouwbaarheid en relevantie met gebruikmaking van geaccepteerde prestatienormen (14).

3. Soortgelijke of gewijzigde methoden die worden voorgesteld voor gebruik binnen deze TM moeten worden geëvalueerd om hun betrouwbaarheid en nauwkeurigheid te bepalen met gebruikmaking van chemische stoffen die het volledige bereik van de LLKT-scores vertegenwoordigen. Teneinde onnodig gebruik van dieren te voorkomen, wordt ten stelligste aanbevolen dat modelontwikkelaars de relevante autoriteiten raadplegen, voordat zij valideringsonderzoeken starten overeenkomstig de prestatienormen en richtsnoeren die deze TM bevat.

4. Deze prestatienormen zijn gebaseerd op de geharmoniseerde prestatienorm op basis van ICCVAM (Verenigde Staten), ECVAM (EU) en JaCVAM (Japan) (12), voor de evaluatie van de validiteit van soortgelijke of gewijzigde versies van de LLKT. De prestatienorm bestaat uit essentiële componenten van de testmethode, aanbevolen referentiestoffen en nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsnormen waaraan de voorgestelde methode moet voldoen of die de voorgestelde methode moet overtreffen.

I. **Essentiële componenten van de testmethode**

5. Om te waarborgen dat een soortgelijke of gewijzigde LLKT-methode in functioneel en mechanistisch opzicht vergelijkbaar is met de LLKT en hetzelfde biologische effect meet, moeten de volgende componenten in het protocol van de testmethode worden opgenomen:

— De teststof moet plaatselijk worden aangebracht op beide oren van de muis;

— De proliferatie van lymfocyten moet worden gemeten in de lymfklieren die de afvoer verzorgen van de plaats waar de teststof wordt aangebracht;

— De proliferatie van lymfocyten moet worden gemeten tijdens de inductiefase van huidsensibilisatie;

▼M3

— Voor teststoffen moet de hoogste gekozen dosis de maximale concentratie zijn die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige lokale huidirritatie bij de muis veroorzaakt. Voor positieve referentiestoffen moet de hoogste dosis minimaal zo hoog zijn als de LLKT EC3-waarden van de overeenkomstige referentiestoffen (zie tabel 1) zonder systemische toxiciteit en/of bovenmatige lokale huidirritatie bij de muis te veroorzaken;

— Een gelijktijdige controlegroep moet in elk onderzoek worden opgenomen en er moet, indien van toepassing, tevens een gelijktijdige PC worden gebruikt;

— Per dosisgroep moeten minimaal vier dieren worden gebruikt;

— De gegevens kunnen worden verzameld van elk dier apart of van gepoolde groepen.

Indien aan een van deze criteria niet wordt voldaan, kunnen deze prestatienormen niet worden gebruikt om de soortgelijke of gewijzigde methode te valideren.

II. **Minimumlijst van referentiestoffen**

6. De geharmoniseerde prestatienorm op basis van ICCVAM, ECVAM en JaCVAM (12) bevat een minimumlijst van 18 referentiestoffen die gebruikt moeten worden en vier optionele referentiestoffen (d.w.z. stoffen die valspositieve of valsnegatieve uitkomsten gaven in de LLKT in vergelijking met de resultaten van tests met mensen en cavia's (B.6 of OESO-testrichtlijn 406) (13) en die derhalve de mogelijkheid bieden om gelijkwaardige of betere prestaties dan de LLKT aan te tonen) die zijn opgenomen in de prestatienormen voor de LLKT. De selectiecriteria voor de aanwijzing van deze chemische stoffen waren:

— de lijst van referentiestoffen kwam overeen met de soorten stoffen die doorgaans getest worden op huidsensibilisatiepotentieel en met het bereik van de responsen dat de LLKT kan meten of voorspellen;

— de stoffen hadden goed gedefinieerde chemische structuren;

— LLNA-gegevens van tests met cavia's (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13) en, zo mogelijk, gegevens van tests met mensen waren voor iedere stof beschikbaar; en

— de stoffen waren gemakkelijk verkrijgbaar via een commerciële bron.

De aanbevolen referentiestoffen worden vermeld in tabel 1. Onderzoeken die gebruikmaken van de aanbevolen referentiestoffen moeten geëvalueerd worden in het medium waarmee ze worden vermeld in tabel 1. In situaties waarin een stof op de lijst niet verkrijgbaar is, mogen andere stoffen die aan de selectiecriteria voldoen, worden gebruikt, mits met een afdoende motivering.

▼M3

Tabel 1

Aanbevolen referentiestoffen voor de prestatienormen van de LLKT

Nummer	Chemische stoffen (1)	CAS-nr.	Toestand	Med (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Werkelijk EC3-bereik	LLKT vs. CT	LLKT vs. test bij mensen
1	5-chloor-2-methyl-4-isothiazoline-3-on (CMI)/ 2-methyl-4-isothiazoline-3-on (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Vlb	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NB	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Vast	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenyleendiamine	106-50-3	Vast	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Kobaltchloride	7646-79-9	Vast	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Iso-eugenol	97-54-1	Vlb	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzothiazool	149-30-4	Vast	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NB	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Vlb	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Vlb	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Vlb	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenylbenzoaat	93-99-2	Vast	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Cinnamylalcohol	104-54-1	Vast	AOO	21	1	10,5-42	NB	+/+	+/+
12	Imidazolidinylureum	39236-46-9	Vast	DMF	24	1	12-48	NB	+/+	+/+
13	Methylmethacrylaat	80-62-6	Vlb	AOO	90	1	45-100	NB	+/+	+/+
14	Chloorbenzeen	108-90-7	Vlb	AOO	25	1	n.v.t.	n.v.t.	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Vlb	AOO	50	1	n.v.t.	n.v.t.	–/–	–/+

▼M3

Nummer	Chemische stoffen (1)	CAS-nr.	Toestand	Med (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x - 2,0x EC3	Werkelijk EC3-bereik	LLKT vs. CT	LLKT vs. test bij mensen
16	Melkzuur	50-21-5	Vlb	DMSO	25	1	n.v.t.	n.v.t.	–/–	–/ (*)
17	Methylsalicylaat	119-36-8	Vlb	AOO	20	9	n.v.t.	n.v.t.	–/–	–/–
18	Salicylzuur	69-72-7	Vast	AOO	25	1	n.v.t.	n.v.t.	–/–	–/–
Optionele stoffen om betere prestaties ten opzichte van de LLKT aan te tonen										
19	Natriumlaurylsulfaat	151-21-3	Vast	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Ethyleenglycoldimethacrylaat	97-90-5	Vlb	MEK	28	1	14-56	NB	+/–	+/+
21	Xyleen	1330-20-7	Vlb	AOO	95,8	1	47,9-100	NB	+/ (**)	+/–
22	Nikkel(II)chloride	7718-54-9	Vast	DMSO	5	2	n.v.t.	n.v.t.	–/+	–/+

Afkortingen: AOO = aceton: olijfolie (4:1, v/v); CAS-nr. = nummer bij de Chemical Abstracts Service (CAS); DMF = *N,N*-dimethylformamide; DMSO = dimethylsulfoxide; DNCB = 2,4-dinitrochloorbenzeen; EC3 = geschatte concentratie die nodig is om een stimuleringsindex van 3 te genereren; CT = resultaat van caviatest (d.w.z. B.6 of OESO-testrichtlijn 406) (13) HCA = hexylcinnamaldehyde; Vlb = vloeibaar; LLNA = resultaat van lokale lymfkliertest (d.w.z. B.42 of OESO-testrichtlijn 429) (1); MEK = methylethylketon; N.v.t. = niet van toepassing, omdat stimuleringsindex < 3; NB = niet berekend, omdat gegevens werden verkregen uit één onderzoek; Med = medium.

(*) aangezien deze stof wordt verondersteld niet sensibiliserend te werken bij mensen vanwege het feit dat er geen resultaten van tests met provocatiepleisters beschikbaar zijn, is de stof niet opgenomen als een stof die geschikt is voor tests met provocatiepleisters; daarnaast zijn er geen gevallen van sensibilisatie bij mensen bekend.

(**) geen gegevens van caviatests beschikbaar.

(1) Chemische stoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

(2) Vanwege het potentiële effect van verschillende media op de prestaties van de LLKT, moet voor iedere referentiestof het aanbevolen medium worden gebruikt (24) (32).

(3) Gemiddelde waarde, indien meer dan één EC3-waarde beschikbaar was. Voor negatieve stoffen (d.w.z. met stimuleringsindex < 3) wordt de hoogste concentratie die getest is, gegeven.

(4) Aantal LLKT-onderzoeken waaruit gegevens werden verkregen.

(5) In de handel verkrijgbaar als Kathon CG (CAS-nr. 55965-84-9), dat een mengsel van CMI en MI is in de verhouding 3:1. De relatieve concentraties van elke component gaan van 1,1 % tot 1,25 % (CMI) en van 0,3 % tot 0,45 % (MI). De inactieve componenten zijn magnesiumzouten (21,5 % tot 24 %) en kopernitraat (0,15 % tot 0,17 %), waarbij de resterende formulering bestaat uit 74 % tot 77 % water. Kathon CG is gemakkelijk verkrijgbaar via Sigma-Aldrich en Rohm and Haas (nu Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Gedefinieerde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidsnormen**

7. De nauwkeurigheid van een soortgelijke of gewijzigde LLKT-methode moet gelijk zijn aan of beter zijn dan die van de prestatienorm voor de LLKT, wanneer de test beoordeeld wordt met gebruikmaking van de 18 referentiestoffen die gebruikt moeten worden. De nieuwe of gewijzigde methode moeten resulteren in de correcte indeling op basis van een „ja/nee"-beslissing. Het kan echter voorkomen dat de nieuwe of gewijzigde methode niet alle stoffen op de minimumlijst van referentiestoffen correct indeelt. Indien bijvoorbeeld een van de zwakke sensibilisatoren onjuist wordt ingedeeld, kunnen een motivering voor de onjuiste indeling en relevante aanvullende gegevens (d.w.z. testresultaten die tot correcte indelingen leiden voor andere stoffen met fysieke, chemische en sensibilisatie-eigenschappen die vergelijkbaar zijn met die van de onjuist ingedeelde stof) geacht worden gelijkwaardige prestaties aan te tonen. In dergelijke omstandigheden zou de valideringsstatus van de nieuwe of gewijzigde LLKT-testmethode van geval tot geval worden beoordeeld.

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid

8. Om de intralaboratoriumreproduceerbaarheid te bepalen, moet een nieuwe of gewijzigde LLKT-methode worden beoordeeld met gebruikmaking van een sensibiliserende stof waarvan de eigenschappen bekend zijn binnen de LLKT. Derhalve zijn de prestatienormen voor de LLKT gebaseerd op de variabiliteit van de resultaten van herhaalde tests met hexylcinnamaldehyde (HCA). Om de intralaboratoriumbetrouwbaarheid te beoordelen, moeten de grenswaarden voor de geschatte concentratie voor HCA verkregen worden op vier afzonderlijke tijdstippen met ten minste een week tussen de tests. Aanvaardbare intralaboratoriumreproduceerbaarheid wordt aangetoond door het vermogen van een laboratorium om in iedere HCA-test grenswaarden voor de geschatte concentratie te verkrijgen van 5 % tot 20 %, hetgeen staat voor het bereik van 0,5 tot 2,0 maal de gemiddelde EC3 die voor HCA (10 %) wordt gespecificeerd in de LLKT (zie tabel 1).

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid

9. Interlaboratoriumreproduceerbaarheid van een nieuwe of gewijzigde LLKT-testmethode moet worden beoordeeld met behulp van twee sensibilisatoren waarvan de eigenschappen voldoende bekend zijn binnen de LLKT. De prestatienormen voor de LLKT zijn gebaseerd op de variabiliteit van de resultaten van tests met HCA en 2,4-dinitrochloorbenzeen (DNCB) in verschillende laboratoria. De grenswaarden voor de geschatte concentratie moeten onafhankelijk verkregen worden uit één onderzoek dat in ten minste drie afzonderlijke laboratoria wordt uitgevoerd. Om aanvaardbare interlaboratoriumreproduceerbaarheid aan te tonen, moet ieder laboratorium grenswaarden voor de geschatte concentratie (EC) verkrijgen van 5 % tot 20 % voor HCA en van 0,025 % tot 0,1 % voor DNCB, wat overeenkomt met het bereik van 0,5 tot 2,0 maal de gemiddelde EC3-concentraties die zijn gespecificeerd voor respectievelijk HCA (10 %) en DNCB (0,05 %) in de LLKT (zie tabel 1).

▼M3

Aanhangsel 2

Definities

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (14).

IJkstof: een sensibiliserende of niet-sensibiliserende stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: i) consistente en betrouwbare bron(nen); ii) in structureel en functioneel opzicht soortgelijk aan de geteste klasse stoffen; iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten, en v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

Drempelwaarde voor de geschatte concentratie: geschatte concentratie van een teststof die nodig is om een stimuleringsindex te genereren die duidt op een positieve respons.

Geschatte concentratie drie (EC3): Geschatte concentratie van een teststof die nodig is om een stimuleringsindex van drie te genereren.

Valsnegatief: een teststof die door een testmethode ten onrechte als negatief of niet-actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof feitelijk positief of actief is.

Valspositief: een teststof die ten onrechte als positief of actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof in feite negatief of niet-actief is.

Gevaar: het risico van een nadelig effect op de gezondheid of het milieu. Het nadelige effect doet zich alleen voor indien er voldoende blootstelling is.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde teststoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een test met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (14).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook reproduceerbaarheid binnen laboratoria genoemd (14).

„Me too"-test: een informele uitdrukking voor een testmethode die in structureel en functioneel opzicht vergelijkbaar is met een gevalideerde en geaccepteerde testmethode. Een dergelijke testmethode zou geschikt zijn voor inhaalvalidering. Dit is een alternatieve benaming voor gelijksoortige testmethode (14).

Uitbijter: een uitbijter is een waarneming die duidelijk afwijkt van andere waarden binnen een willekeurige steekproef uit een populatie.

Prestatienormen: normen, gebaseerd op een gevalideerde referentiemethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde referentiemethode aan te tonen; en iii) de nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (14).

Niet-generieke testmethode: een testmethode waarvan de productie en distributie beperkt worden door octrooien, auteursrechten, handelsmerken enz.

▼**M3**

Kwaliteitsborging: een beheerproces waarbij de naleving van de testnormen, eisen en boekhoudingsprocedures voor laboratoria alsmede de nauwkeurigheid van de gegevensoverdracht worden beoordeeld door personen die onafhankelijk zijn van degenen die de tests uitvoeren.

Referentiestoffen: chemische stoffen die gebruikt worden in het valideringsproces, waarvan de responsen in het in-vitro- of in-vivoreferentietestsysteem of de doelsoort reeds bekend zijn. Deze chemische stoffen moeten representatief zijn voor de klassen van chemische stoffen waarvoor de testmethode zal worden gebruikt en moeten het volledige bereik van responses bestrijken dat verwacht kan worden van de chemische stoffen waarvoor de test gebruikt zal worden, van sterk tot zwak, tot negatief. Het kan nodig zijn om verschillende reeksen referentiestoffen te gebruiken voor de verschillende fasen van het valideringsproces en voor verschillende testmethoden en -doeleinden (14).

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (14).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (14).

Huidsensibilisatie: een immunologisch proces dat ontstaat wanneer een vatbare persoon of proefdier plaatselijk wordt blootgesteld aan een inducerend chemisch allergeen, dat een immunologische huidreactie veroorzaakt die kan leiden tot de ontwikkeling van contactsensibilisatie.

Stimuleringsindex (SI): een waarde die wordt berekend om het huidsensibilisatiepotentieel van een teststof te beoordelen en die gelijk is aan de verhouding van de proliferatie bij behandelde groepen ten opzichte van de proliferatie bij de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep.

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

Gevalideerde testmethode: een testmethode waarvoor valideringsonderzoeken werden gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er dient te worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (14).

▼B

B.43. **NEUROTOXICITEITSONDERZOEK BIJ KNAAGDIEREN**

1 **METHODE**

Deze methode is gelijkwaardig aan TG 424 (1997) van de OESO.

Deze testmethode is bedoeld om de nodige informatie te krijgen om de mogelijke neurotoxiciteit van chemische stoffen bij volwassen dieren te bevestigen of nader te karakteriseren. Hij kan in combinatie met bestaande testmethoden voor onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening worden gebruikt of als zelfstandig onderzoek worden uitgevoerd. Raadpleging van de OESO-leidraad voor strategieën en methoden voor neurotoxiciteitsonderzoek (1) als ondersteuning bij de opzet van onderzoek op basis van deze testmethode wordt aanbevolen. Dit is vooral belangrijk wanneer wordt overwogen de voor het standaardgebruik van deze methode aanbevolen observaties en testprocedures te wijzigen. De leidraad is opgesteld om de keuze van andere testprocedures voor specifieke omstandigheden te vergemakkelijken.

Deze methode is niet geschikt voor de beoordeling van ontwikkelingsneurotoxiciteit.

1.1 INLEIDING

Bij de beoordeling en evaluatie van de toxische karakteristieken van chemische stoffen is het belangrijk de mogelijkheid van neurotoxische effecten te bezien. In de testmethode voor systemische toxiciteit bij herhaalde toediening zijn al observaties opgenomen om op mogelijke neurotoxiciteit te screenen. Deze testmethode kan worden gebruikt voor de opzet van een onderzoek om nadere informatie te verkrijgen over de neurotoxische effecten die bij het onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening zijn gesignaleerd of om deze effecten te bevestigen. Ook zonder dat onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening aanwijzingen voor een mogelijke neurotoxiciteit heeft opgeleverd, kunnen er voor sommige categorieën chemische stoffen echter aanwijzingen zijn dat ze beter met behulp van deze methode kunnen worden beoordeeld. Voorbeelden van dergelijke aanwijzingen zijn:

— waarneming van neurologische verschijnselen of neuropathologisch letsel bij ander toxiciteitsonderzoek dan onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening of

— een structurele verwantschap met stoffen waarvan bekend is dat ze neurotoxisch zijn of andere informatie die een verband met dergelijke stoffen legt.

Daarnaast kan het gebruik van deze testmethode ook in andere gevallen nuttig zijn; zie voor nadere bijzonderheden (1).

Deze methode is zodanig opgezet dat hij op maat kan worden aangepast aan bepaalde behoeften om de specifieke histopathologische en gedragsmatige neurotoxiciteit van een chemische stof te bevestigen en voor een karakterisering en kwantificering van de neurotoxische reacties te zorgen.

▼B

In het verleden werd neurotoxiciteit gelijkgesteld met neuropathie met neuropathologisch letsel of neurologische stoornissen zoals een epileptische aanval, verlamming of tremor. Hoewel neuropathie een belangrijke uiting van neurotoxiciteit is, is het nu duidelijk dat er vele andere verschijnselen van toxiciteit voor het zenuwstelsel zijn (bv. het verlies van motorische coördinatie, sensorische afwijkingen en leer- en geheugenstoornissen) die bij een onderzoek naar neuropathie of ander onderzoek niet altijd naar voren komen.

Deze testmethode voor neurotoxiciteit is bedoeld om ernstige neuropathologische en neurogedragseffecten bij volwassen knaagdieren te detecteren. Gedragseffecten kunnen weliswaar ook zonder morfologische veranderingen nadelige gevolgen voor het organisme inhouden, maar niet alle gedragsveranderingen zijn specifiek voor het zenuwstelsel. Daarom moeten waargenomen veranderingen worden geëvalueerd in samenhang met gerelateerde histopathologische, hematologische of biochemische gegevens en gegevens over andere vormen van systemische toxiciteit. De in deze methode opgenomen tests met het oog op een karakterisering en kwantificering van de neurotoxische reacties omvatten specifieke histopathologische en gedragsprocedures die nader kunnen worden ondersteund met elektrofysiologisch en/of biochemisch onderzoek (1)(2)(3)(4).

Neurotoxica kunnen optreden via een aantal aangrijpingspunten binnen het zenuwstelsel en een scala van mechanismen. Aangezien er niet één pakket tests is waarmee de neurotoxische potentie van alle stoffen volledig kan worden beoordeeld, kan het nodig zijn andere *in vivo* of *in vitro* tests te gebruiken die specifiek zijn voor de waargenomen of verwachte soorten neurotoxiciteit.

Deze testmethode kan ook in combinatie met de richtsnoeren van de OESO-leidraad voor strategieën en methoden voor neurotoxiciteitsonderzoek (1) worden gebruikt om onderzoek op te zetten waarmee de dosis/respons-kwantificering nader kan worden gekarakteriseerd of de gevoeligheid kan worden verhoogd teneinde een betere bepaling van de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten mogelijk te maken of bekende of vermoede gevaren van de chemische stof te staven. Er kan bijvoorbeeld onderzoek worden opgezet om de neurotoxische mechanismen te bepalen en te evalueren of om de gegevens aan te vullen die al beschikbaar zijn door het gebruik van basisprocedures voor neuropathologische en neurogedragsobservatie. Als gegevens die door het gebruik van de in deze methode aanbevolen standaardprocedures worden verkregen, al beschikbaar zijn en niet nodig worden geacht voor de interpretatie van de resultaten van het onderzoek, behoeven ze niet met dit onderzoek opnieuw te worden vergaard.

Dit onderzoek naar neurotoxiciteit levert, zelfstandig of in combinatie gebruikt, informatie op die:

— kan aangeven of het zenuwstelsel door de geteste chemische stof permanent of reversibel wordt aangetast;

— kan bijdragen tot de karakterisering van de wijzigingen in het zenuwstelsel ten gevolge van de blootstelling aan de chemische stof en tot inzicht in het mechanisme daarvan;

▼B

— het verband tussen dosis en respons en tussen tijd en respons kan bepalen teneinde een dosis zonder waargenomen schadelijke effecten te kunnen bepalen (die kan worden gebruikt om veiligheidscriteria voor de chemische stof vast testellen).

Bij deze testmethode wordt de teststof oraal toegediend. Andere toedieningswegen (bv. dermaal of inhalatie) kunnen geschikter zijn en hiervoor kan het nodig zijn de aanbevolen procedures te wijzigen. De keuze van de toedieningsweg wordt bepaald door het blootstellingsprofiel bij de mens en de beschikbare toxicologische of kinetische informatie.

1.2 DEFINITIES

Schadelijk effect: een met de behandeling samenhangende afwijking van de normale situatie waardoor het organisme minder goed in staat is tot overleven, reproductie of aanpassing aan de omgeving.

Dosis: de toegediende hoeveelheid teststof. De dosis wordt uitgedrukt als gewicht (g, mg), als gewicht van de teststof per gewichtseenheid van het proefdier (bijvoorbeeld mg/kg) of als constante concentratie in het voer (ppm).

Dosering: een algemene term die de dosis en de frequentie en de duur van de toediening omvat.

Neurotoxiciteit: een schadelijke verandering in de structuur of de functie van het zenuwstelsel die een gevolg is van blootstelling aan een chemisch, biologisch of fysisch agens.

Neurotoxicum: een chemisch, biologisch of fysisch agens dat in staat is neurotoxiciteit te veroorzaken.

NOAEL: de afkorting van „no-observed-adverse effect level” (dosis zonder waargenomen schadelijke effecten), d.w.z. de hoogste dosis waarbij er geen met de behandeling samenhangende schadelijke gevolgen worden waargenomen.

1.3 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in een aantal doses oraal toegediend aan verschillende groepen knaagdieren. Meestal is herhaalde toediening nodig gedurende 28 dagen of in de vorm van subchronisch (90 dagen) of chronisch (een jaar of langer) onderzoek. De in deze testmethode beschreven procedures kunnen ook worden gebruikt voor een onderzoek naar acute neurotoxiciteit. De dieren worden getest om afwijkend gedrag en/of neurologische afwijkingen te kunnen detecteren of karakteriseren. Gedurende elke observatieperiode wordt een scala van gedragsuitingen beoordeeld dat door neurotoxica kan worden beïnvloed. Aan het eind van de test wordt een deel van de dieren van elk geslacht van elke groep in situ geperfundeerd en worden er secties van de hersenen, het ruggenmerg en de perifere zenuwen geprepareerd en onderzocht.

Wanneer het onderzoek zelfstandig als screening voor neurotoxiciteit of voor de karakterisering van neurotoxische effecten wordt uitgevoerd, kunnen de dieren van elke groep die niet voor perfusie en vervolgens histopathologie worden gebruikt (zie tabel 1), voor specifieke neuropathologische, neurochemische, elektrofysiologische of neurogedragsprocedures worden gebruikt waarmee de gegevens kunnen worden aangevuld die worden verkregen uit het verplichte standaardonderzoek van deze methode (1). Deze aanvullende procedures kunnen bijzonder nuttig zijn wanneer empirische observaties of verwachte effecten wijzen op een specifiek type of aangrijpingspunt voor de neurotoxiciteit van een chemische stof. Anderzijds is het ook mogelijk de resterende dieren te gebruiken voor evaluaties zoals die zijn opgenomen in testmethoden voor onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening bij knaagdieren.

▼B

Wanneer de procedures van deze testmethode in combinatie met die van andere testmethoden worden gebruikt, is er een voldoende aantal dieren nodig om aan de observatievereisten voor beide onderzoeken te voldoen.

1.4 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1 **Keuze van de diersoort**

Bij voorkeur wordt de rat gebruikt, maar ook andere knaagdiersoorten kunnen worden gebruikt wanneer hiervoor een motivering wordt gegeven. Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. De toediening begint zo spoedig mogelijk na het spenen, bij voorkeur uiterlijk wanneer de dieren zes weken oud zijn en in elk geval voordat de dieren negen weken oud zijn. Wanneer dit onderzoek met andere onderzoeken wordt gecombineerd, kan het echter nodig zijn deze leeftijdseis aan te passen. Aan het begin van het onderzoek mag het lichaamsgewicht van de dieren niet meer dan ± 20 % afwijken van het gemiddelde gewicht voor elk geslacht. Wanneer een onderzoek met herhaalde toediening van korte duur als voorbereiding op een langdurig onderzoek wordt uitgevoerd, moeten bij beide onderzoeken dieren van dezelfde stam en dezelfde herkomst worden gebruikt.

1.4.2 **Huisvesting en voeding**

De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 ^{o}C (± 3 ^{o}C) te zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid minimaal 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Verlichting gebeurt met kunstlicht met een ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Harde onregelmatige geluiden moeten tot een minimum worden beperkt. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof in het voer wordt toegediend. De dieren mogen apart of in kleine groepen met hetzelfde geslacht worden gehuisvest.

1.4.3 **Voorbereiding van de dieren**

De gezonde jonge dieren worden aselect ingedeeld in de behandelings- en controlegroepen. De kooien worden zodanig opgesteld dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooien tot een minimum worden beperkt. De dieren worden op unieke wijze gemerkt en vóór het begin van het onderzoek gedurende minimaal 5 dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen.

1.4.4 **Toedieningsweg en bereiding van de dosis**

Deze testmethode behandelt specifiek de orale toediening van de teststof. De orale toediening kan met een maagsonde, in het voer, in het drinkwater of met capsules gebeuren. Ook andere toedieningswegen (bv. dermaal of inhalatie) kunnen worden gebruikt, maar hiervoor moeten de aanbevolen procedures wellicht worden gewijzigd. De keuze van de toedieningsweg wordt bepaald door het blootstellingsprofiel bij de mens en de beschikbare toxicologische of kinetische informatie. De motivering voor de keuze van de toedieningsweg en hieruit voortvloeiende wijzigingen in de procedures van deze testmethode moeten worden vermeld.

▼B

Waar nodig kan de teststof in een geschikt medium worden opgelost of gesuspendeerd. In eerste instantie wordt het gebruik van een waterige oplossing/suspensie aanbevolen, als tweede keuze een oplossing/suspensie in olie (bijvoorbeeld maïsolie) en uiteindelijk eventueel een oplossing/suspensie in een ander medium. De toxicologische kenmerken van het medium moeten bekend zijn. Daarnaast moet aandacht worden besteed aan de volgende kenmerken van het medium: effecten van het medium op de resorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof die wellicht gevolgen kunnen hebben voor de toxicologische kenmerken, en effecten op de consumptie van voer of water of de voedingsstatus van de dieren.

1.5 PROCEDURE

1.5.1 **Aantal en geslacht van de dieren**

Wanneer het onderzoek zelfstandig wordt uitgevoerd, moeten er in elke dosis- en controlegroep ten minste 20 dieren (10 vrouwtjes en 10 mannetjes) worden gebruikt voor de evaluatie van gedetailleerde klinische en functionele observaties. Van deze 10 vrouwtjes en 10 mannetjes moeten ten minste 5 vrouwtjes en 5 mannetjes aan het eind van het onderzoek in situ worden geperfundeerd en voor gedetailleerde neurohistopathologie worden gebruikt. Wanneer in een bepaalde dosisgroep slechts bij een beperkt aantal dieren verschijnselen van neurotoxische effecten worden geobserveerd, moet worden overwogen onder andere deze dieren voor perfusie te selecteren. Wanneer het onderzoek in combinatie met een onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening wordt uitgevoerd, moeten er voldoende dieren worden gebruikt om aan de doelstellingen van beide onderzoeken te voldoen. Tabel 1 bevat een overzicht van de minimale aantallen dieren per groep voor verschillende onderzoekcombinaties. Als het de bedoeling is tussentijds dieren te doden of bij bepaalde groepen na de behandeling te observeren of de toxische effecten reversibel zijn, blijven bestaan of vertraagd optreden of wanneer aanvullende observaties worden overwogen, moet het aantal dieren worden opgevoerd om ervoor te zorgen dat er voldoende dieren beschikbaar zijn voor observatie en histopathologie.

1.5.2 **Behandelings- en controlegroepen**

In het algemeen moeten er ten minste drie dosisgroepen en één controlegroep worden gebruikt, maar als er op grond van de beoordeling van andere gegevens bij herhaalde toediening van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag geen effecten worden verwacht, kan er een limiettest worden uitgevoerd. Als er geen geschikte gegevens beschikbaar zijn, kan er een verkennend onderzoek worden uitgevoerd om de te gebruiken doses te helpen bepalen. Afgezien van de toediening van de teststof worden de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld als de dieren in de dosisgroepen. Als er bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, moet het hoogste gebruikte volume van het medium aan de controlegroep worden toegediend.

1.5.3 **Betrouwbaarheidscontrole**

Het laboratorium dat het onderzoek uitvoert, moet gegevens verstrekken waaruit blijkt dat het in staat is het onderzoek uit te voeren en wat de gevoeligheid van de gebruikte procedures is. Uit deze gegevens moet blijken dat het veranderingen in de verschillende voor observatie aanbevolen eindpunten, zoals autonome verschijnselen, sensorische reactiviteit, grijpkracht van de ledematen en motorische activiteit, kan detecteren en eventueel kwantificeren. Voor informatie over chemische stoffen die verschillende soorten neurotoxische reacties veroorzaken en als positieve controle kunnen worden gebruikt, wordt verwezen naar de referenties (2) tot en met (9). Als de procedures in grote lijnen gelijk blijven, kunnen gegevens uit het verleden worden gebruikt. Periodieke bijwerking van gegevens uit het verleden wordt aanbevolen. Wanneer de uitvoering van de test of de procedures door het laboratorium op een essentieel punt wordt gewijzigd, moet met nieuwe gegevens worden aangetoond dat de gevoeligheid van de procedures op peil blijft.

▼B

1.5.4 **Keuze van de doses**

Bij de keuze van de dosisniveaus wordt rekening gehouden met eerder waargenomen toxiciteit en kinetische gegevens die voor de teststof of verwante materialen beschikbaar zijn. De hoogste dosis wordt zodanig gekozen dat er neurotoxische effecten of duidelijke systemische toxische effecten optreden. Vervolgens wordt er een zodanige dalende reeks dosisniveaus gekozen dat er een verband tussen dosis en respons kan worden gelegd en er bij de laagste dosis geen schadelijke effecten worden waargenomen (NOAEU). In beginsel worden de dosisniveaus zodanig gekozen dat primaire toxische effecten op het zenuwstelsel kunnen worden onderscheiden van effecten die samenhangen met systemische toxiciteit. Twee of drie intervals is vaak optimaal en in plaats van een zeer groot interval tussen de doses (bv. meer dan een factor 10) verdient toevoeging van een vierde testgroep vaak de voorkeur. Wanneer er een redelijke raming van de blootstelling van de mens is, moet hier ook rekening mee worden gehouden.

1.5.5 **Limiettest**

Als een onderzoek met één dosis van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag volgens de beschreven procedures geen waarneembare neurotoxische effecten oplevert en als toxiciteit op grond van gegevens van qua structuur verwante verbindingen niet te verwachten valt, zal een volledig onderzoek met drie dosisniveaus wellicht niet nodig worden geacht. Op grond van de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hogere orale dosis bij de limiettest nodig worden geacht. Bij andere toedieningswegen, bijvoorbeeld dermaal of inhalatie, wordt het maximaal haalbare blootstellingsniveau vaak bepaald door de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof. Bij de uitvoering van een oraal acuut onderzoek moet de dosis voor een limiettest ten minste 2 000 mg/kg zijn.

1.5.6 **Toediening van de dosis**

De teststof wordt dagelijks, zeven dagen per week, gedurende ten minste 28 dagen aan de dieren toegediend; voor een toedieningsschema van vijf dagen per week of een kortere blootstellingsperiode moet een motivering worden gegeven. Wanneer de teststof met een sonde wordt toegediend, moet dit in één keer met een maagsonde of een geschikte katheter gebeuren. Het maximale volume van een vloeistof dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van de proefdieren. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht. Bij waterige oplossingen kan echter het gebruik van maximaal 2 ml/100 mg lichaamsgewicht worden overwogen. Behalve bij irriterende of bijtende stoffen, die normaal gesproken bij hogere concentraties hevigere effecten hebben, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er op alle dosisniveaus hetzelfde volume wordt toegediend.

Het is belangrijk dat er bij stoffen die via het voer of het drinkwater worden toegediend, voor wordt gezorgd dat de hoeveelheden teststof de normale voer- of waterbalans niet verstoren. Wanneer de teststof in het voer wordt toegediend, kan een constante concentratie in het voer (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Wanneer een stof met een sonde wordt toegediend, moet de dosis elke dag op een vergelijkbaar tijdstip worden toegediend en indien nodig worden aangepast om een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier te houden. Wanneer een onderzoek met herhaalde toediening als voorbereiding op een langdurig onderzoek wordt gebruikt, moet bij beide onderzoeken een vergelijkbare voeding worden gebruikt. Bij acuut onderzoek kan de dosis, als toediening in één keer niet mogelijk is, in kleinere porties worden verdeeld die in de loop van maximaal 24 uur worden toegediend.

▼B

1.6 OBSERVATIE

1.6.1 **Frequentie van de observaties en tests**

Bij onderzoek met herhaalde toediening bestrijkt de observatieperiode de toedieningsperiode. Bij acuut onderzoek vindt de observatie gedurende 14 dagen na de toediening plaats. Bij dieren in satellietgroepen die gedurende een periode na de behandeling zonder blootstelling worden gehouden, moeten de observaties ook deze periode bestrijken.

De frequentie van de observaties moet voldoende zijn voor een maximale kans op detectie van eventuele neurologische en/of gedragsafwijkingen. De observatie moet bij voorkeur elke dag op hetzelfde tijdstip plaatsvinden en hierbij moet rekening worden gehouden met de piekperiode voor de verwachte effecten na de toediening. Tabel 2 bevat een overzicht van de frequentie van de klinische observaties en functionele tests. Als kinetische of andere gegevens uit eerder onderzoek erop wijzen dat verschillende tijdstippen voor observaties, tests of periodes na observaties nodig zijn, moet er een ander schema worden opgesteld om zo veel mogelijk informatie te verkrijgen. Voor veranderingen in het schema moet een motivering worden gegeven.

1.6.1.1 *Observatie van de algemene gezondheidstoestand en de mortaliteit/morbiditeit*

Alle dieren worden ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd om hun gezondheidstoestand te beoordelen en ten minste twee keer per dag op morbiditeit en mortaliteit.

1.6.1.2 *Gedetailleerde klinische observatie*

Bij alle hiervoor geselecteerde dieren (zie tabel 1) wordt één keer vóór de eerste blootstelling (om vergelijking per dier mogelijk te maken) en daarna met verschillende tussenpozen afhankelijk van de duur van het onderzoek (zie tabel 2) een gedetailleerde klinische observatie uitgevoerd. Bij satelliethestelgroepen dienen aan het eind van de herstelperiode gedetailleerde klinische observaties te worden uitgevoerd. Gedetailleerde klinische observaties dienen buiten het eigen hok in een standaardloopruimte te gebeuren. Ze moeten zorgvuldig worden geregistreerd met behulp van scoresystemen met criteria of schalen voor elke meting bij de observatie. De gebruikte criteria of schalen moeten expliciet door het laboratorium worden gedefinieerd. Er moet worden getracht ervoor te zorgen dat de variaties in de testomstandigheden minimaal zijn (niet systematisch gerelateerd aan de behandeling) en dat de observaties worden uitgevoerd door geschoolde waarnemers die niet op de hoogte zijn van de gegeven behandeling.

Het verdient aanbeveling de observaties gestructureerd uit te voeren, waarbij voor elk dier op elk observatietijdstip systematisch goed gedefinieerde criteria worden gehanteerd (met inbegrip van een definitie van het „normale bereik”). Het „normale bereik” moet afdoende worden gedocumenteerd. Alle waargenomen verschijnselen moeten worden geregistreerd. Waar mogelijk moet ook de omvang van de waargenomen verschijnselen worden geregistreerd. Klinische observatie moet ten minste maar niet uitsluitend omvatten: veranderingen in huid, vacht, ogen en slijmvliezen, secretie en excretie van stoffen en autonome activiteit (bv. tranen, pilo-erectie, verandering in pupilgrootte, een ongebruikelijk ademhalingspatroon en/of ademen door de mond, ongebruikelijke urineer- of ontlastingsverschijnselen en verkleuring van de urine).

▼B

Ook ongebruikelijke reacties ten aanzien van de lichaamshouding, de mate van activiteit (bv. meer of minder exploratie van de standaardloopruimte) en de coördinatie van de bewegingen dienen te worden geregistreerd. Verandering in gang (bv. waggelen of ataxie), houding (bv. gebocheld) en reactiviteit op vastpakken, neerzetten of andere omgevingsprikkels, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, convulsies of tremors, stereotiep gedrag (bv. overmatige lichaamsverzorging, ongebruikelijke hoofdbewegingen, herhaaldelijk ronddraaien) of bizar gedrag (bv. bijten of overmatig likken, zelfverminking, achteruitlopen, stemgeluiden) of agressie moeten worden geregistreerd.

1.6.1.3 *Functionele tests*

Net als bij de gedetailleerde klinische observatie moeten ook de functionele tests bij alle hiervoor geselecteerde dieren (zie tabel 1) één keer vóór de eerste blootstelling en daarna geregeld worden uitgevoerd. Ook de frequentie van de functionele tests is afhankelijk van de duur van het onderzoek (zie tabel 2). Afgezien van de in tabel 2 vermelde observatieperioden moeten ook zo kort mogelijk voordat de dieren worden gedood, functionele observaties bij satellietherstelgroepen worden uitgevoerd. Bij de functionele tests moet worden gekeken naar de sensorische reactiviteit op verschillende soorten prikkels [bv. auditieve, visuele en proprioceptieve prikkels (5)(6)(7), een beoordeling van de grijpkracht van ledematen (8) en een beoordeling van de motorische activiteit (9). De motorische activiteit moet worden gemeten met een geautomatiseerd apparaat dat zowel een afname als een toename van de activiteit kan detecteren. Als er een ander gedefinieerd systeem wordt gebruikt, moet dit kwantitatief zijn en moeten de gevoeligheid en de betrouwbaarheid worden aangetoond. Elk apparaat moet worden getest om de betrouwbaarheid in de loop der tijd en de consistentie van apparaat tot apparaat te waarborgen. Voor een gedetailleerdere beschrijving van de te volgen procedures wordt verwezen naar de respectieve referenties. Als er geen gegevens zijn (bv. structuur/activiteit-relaties, epidemiologische gegevens of ander toxicologisch onderzoek) die aanwijzingen geven omtrent de mogelijke neurotoxische effecten, moet worden overwogen gespecialiseerdere tests op de sensorische en motorische functie of leren en geheugen uit te voeren om deze mogelijke effecten meer in detail te onderzoeken. Voor meer informatie over gespecialiseerdere tests en het gebruik daarvan wordt verwezen naar (1).

Bij wijze van uitzondering kunnen dieren die zodanige toxiciteitsverschijnselen vertonen dat deze de functionele test significant zouden storen, van deze test worden uitgesloten. Voor het uitsluiten van dieren van een functionele test moet een motivering worden gegeven.

1.6.2 **Lichaamsgewicht en consumptie van voer en water**

Bij onderzoek met een duur tot 90 dagen moeten alle dieren ten minste één keer per week worden gewogen en moet de voerconsumptie (de waterconsumptie als de teststof in het water wordt toegediend) ten minste wekelijks worden gemeten. Bij langdurig onderzoek moeten alle dieren de eerste 13 weken ten minste één keer per week worden gewogen en daarna ten minste één keer per vier weken. De eerste 13 weken wordt de voerconsumptie (de waterconsumptie als de teststof in het water wordt toegediend) ten minste wekelijks gemeten en daarna ongeveer één keer per drie maanden, tenzij met het oog op de gezondheidstoestand of de veranderingen in het lichaamsgewicht een ander ritme nodig is.

▼B

1.6.3 **Oogheelkundig onderzoek**

Bij een onderzoek dat langer dan 28 dagen duurt, moet vóór de toediening van de teststof en aan het einde van het onderzoek bij voorkeur bij alle dieren maar ten minste bij de dieren in de hoge dosis- en controlegroepen een oogheelkundig onderzoek worden uitgevoerd met een oftalmoscoop of een gelijkwaardig geschikt instrument. Als er veranderingen in de ogen worden waargenomen of als dit met het oog op klinische verschijnselen nodig is, moeten alle dieren worden onderzocht. Bij een langdurig onderzoek moet er ook na 13 weken een oogheelkundig onderzoek worden uitgevoerd. Het oogheelkundig onderzoek behoeft niet te worden uitgevoerd als deze gegevens al beschikbaar zijn uit ander onderzoek met een vergelijkbare duur en vergelijkbare dosisniveaus.

1.6.4 **Hematologisch en klinisch-biochemisch onderzoek**

Wanneer het onderzoek naar neurotoxiciteit in combinatie met een onderzoek naar systemische toxiciteit bij herhaalde toediening wordt uitgevoerd, moeten er hematologisch onderzoek en klinisch-biochemische bepalingen worden uitgevoerd zoals dit in de desbetreffende methode voor het onderzoek naar systemische toxiciteit is beschreven. De monsterneming moet zodanig gebeuren dat mogelijke neurogedragseffecten tot een minimum worden beperkt.

1.6.5 **Histopathologie**

Het neuropathologisch onderzoek moet worden opgezet als aanvulling op en uitbreiding van de observaties tijdens de *in vivo* fase van het onderzoek. Weefsels van ten minste 5 dieren/geslacht/groep (zie tabel 1 en volgende pragraaf) worden in situ gefixeerd met behulp van algemeen erkende perfusie- en fixatietechnieken (zie referentie 3, hoofdstuk 5, en referentie 4, hoofdstuk 50). Waarneembare macroscopische veranderingen worden geregistreerd. Wanneer het onderzoek zelfstandig als screening voor neurotoxiciteit of voor de karakterisering van neurotoxische effecten wordt uitgevoerd, kunnen de overige dieren worden gebruikt voor specifieke neurogedragsprocedures (10)(ll), neuropathologische procedures (10)(11)(12)(13), neurochemische procedures (1())(11)(14)(15) of elektrofysiologische procedures (1())(11)(16)(17) waarmee de hier beschreven procedures en onderzoeken kunnen worden aangevuld, of om meer dieren beschikbaar te hebben voor histopathologisch onderzoek. Deze aanvullende procedures zijn vooral nuttig wanneer empirische observaties of verwachte effecten wijzen op een specifiek type of aangrijpingspunt van de neurotoxiciteit (2)(3). Anderzijds is het ook mogelijk de resterende dieren te gebruiken voor standaardpathologisch onderzoek zoals dat in de testmethode voor onderzoek naar toxiciteit bij herhaalde toediening wordt beschreven.

Bij elk weefselspecimen in paraffine wordt een algemene kleurprocedure uitgevoerd, zoals hematoxyline en eosine (H&E), en wordt een microscopisch onderzoek uitgevoerd. Als er verschijnselen van perifere neuropathie worden waargenomen of vermoed, worden er monsters van perifeer zenuwweefsel in kunststof onderzocht. Klinische verschijnselen kunnen ook aanwijzingen opleveren voor andere onderzoekplaatsen of het gebruik van speciale kleurprocedures. Richtsnoeren voor andere plaatsen die kunnen worden onderzocht, zijn te vinden in (3)(4). Ook geschikte speciale kleurstoffen om specifieke soorten pathologische veranderingen aan te tonen, kunnen nuttig zijn (18).

▼B

Representatieve secties van het centrale en perifere zenuwstelsel worden histologisch onderzocht (zie referentie 3, hoofdstuk 5, en referentie 4, hoofdstuk 50). Normaal gesproken moeten onder andere de volgende gebieden worden onderzocht: de voorhersenen, het centrum van het cerebrum met een sectie door de hippocampus, de middenhersenen, het cerebellum, de pons, de medulla oblongata, het oog met oogzenuw en netvlies, het ruggenmerg bij de cervicale en lumbale verdikkingen, de ganglia van de dorsale wortel, de vezels van de dorsale en ventrale wortel, de proximale nervus ischiadicus, de proximale nervus tibialis (bij de knie) en de kuitspiervertakkingen van de nervus tibialis. Van het ruggenmerg en de perifere zenuwen moeten zowel dwarse of transversale als longitudinale secties worden gemaakt. Er moet worden gelet op het vaatstelsel van het zenuwstelsel. Tevens moet er een monster van een skeletspier, met name de kuitspier, worden onderzocht. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan plaatsen met een cellulaire en vezelstructuur en -patroon in het CZS en het PZS waarvan bekend is dat ze bijzonder gevoelig zijn voor neurotoxica.

Voor een leidraad voor neuropathologische veranderingen die vaak een gevolg zijn van blootstelling aan een toxische stof, wordt verwezen naar de referenties (3) en (4). Een stapsgewijs onderzoek van de weefselmonsters wordt aanbevolen, waarbij secties van de hoogste dosisgroep eerst worden vergeleken met die van de controlegroep. Als er in de monsters van deze groepen geen neuropathologische veranderingen worden waargenomen, is een verdere analyse niet nodig. Als er in de hoogste dosisgroep neuropathologische veranderingen worden waargenomen, worden er van elk van de mogelijk aangetaste weefsels van de tussengroepen en de laagste groep monsters genomen en sequentieel onderzocht.

Als er bij het kwalitatieve onderzoek bewijzen van neuropathologische veranderingen worden gevonden, moet er een tweede onderzoek worden uitgevoerd bij alle gebieden van het zenuwstelsel die deze veranderingen vertonen. Bij alle dosisgroepen worden er van elk van de mogelijkerwijs aangetaste gebieden secties gecodeerd en aselect zonder de code te kennen onderzocht. De frequentie en de ernst van elk letsel worden geregistreerd. Nadat van alle gebieden van alle dosisgroepen de score is bepaald, kan de code worden verbroken en kan er een statistische analyse worden uitgevoerd om het verband tussen dosis en respons te bepalen. Van elk letsel moeten er voorbeelden van uiteenlopende ernst worden beschreven.

De neuropathologische bevindingen moeten in de context van de gedragsobservaties en metingen alsmede andere gegevens uit eerder en tegelijkertijd uitgevoerd onderzoek naar de systemische toxiciteit van de teststof worden geëvalueerd.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Er worden voor elk dier apart gegevens verstrekt. Daarnaast worden alle gegevens in tabelvorm samengevat met voor alle test- en controlegroepen vermelding van het aantal dieren aan het begin van het onderzoek, het aantal dieren dat tijdens het onderzoek dood is aangetroffen of op humane wijze is gedood met het tijdstip waarop ze zijn gestorven of gedood, het aantal dieren dat toxiciteitsverschijnselen vertoonde, een beschrijving van de waargenomen toxiciteitsverschijnselen, met inbegrip van de aanvang, de duur, de aard en de ernst van eventuele toxische effecten, en het aantal dieren met letsel, met vermelding van de aard en de ernst van het letsel of de letsels.

▼B

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten van het onderzoek moeten worden geëvalueerd, waarbij wordt gekeken naar de incidentie, de ernst en de correlatie van neurogedragseffecten en neuropathologische effecten (en ook neurochemische en elektrofysiologische effecten als dit aanvullende onderzoek is uitgevoerd) en andere waargenomen schadelijke effecten. Waar mogelijk moeten getalsmatige resultaten met behulp van een geschikte en algemeen erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden moeten gedurende de opzet van het onderzoek worden gekozen.

3 **RAPPORTAGE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— de fysische aard (met inbegrip van isomerie, de zuiverheid en de fysisch-chemische eigenschappen);

— identificatiegegevens.

Medium (indien van toepassing):

— een motivering voor de keuze van het medium.

Proefdieren:

— de gebruikte soort/stam;

— het aantal dieren, hun leeftijd en hun geslacht;

— de herkomst, de huisvesting, de acclimatisering, de voeding enz;

— het gewicht van elk dier aan het begin van het onderzoek.

Testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof, de bereiding van het voer en de concentratie, de stabiliteit en de homogeniteit van het preparaat;

— een specificatie van de toegediende doses met gedetailleerde gegevens over het medium, het volume en de fysische vorm van het toegediende materiaal;

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;

— een motivering voor de gekozen dosisniveaus;

— een motivering voor de blootstellingsroute en -duur;

— een omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;

— gedetailleerde gegevens over het voer en het water.

Observatie en testprocedures:

— gedetailleerde gegevens over de keuze van dieren uit elke groep voor de perfusiesubgroepen;

— gedetailleerde gegevens over de scoresystemen met vermelding van de criteria en schaalindeling voor elke meting bij de gedetailleerde klinische observaties;

▼B

— gedetailleerde gegevens over de functionele tests voor de sensorische reactiviteit op verschillende soorten prikkels (bv. auditieve, visuele en proprioceptieve prikkels), voor de beoordeling van de grijpkracht van ledematen, voor de beoordeling van de motorische activiteit (met een beschrijving van geautomatiseerde apparaten voor de detectie van de activiteit) en andere gebruikte procedures;

— gedetailleerde gegevens over het oogheelkundige onderzoek en eventueel het hematologische onderzoek en de klinisch-biochemische tests met de desbetreffende referentiewaarden;

— gedetailleerde gegevens over specifieke neuropathologische, neurochemische, elektrofysiologische of neurogedragsprocedures.

Resultaten:

— het lichaamsgewicht/veranderingen in het lichaamsgewicht en het lichaamsgewicht bij de dood van het dier;

— de consumptie van voer en de consumptie van water, indien van toepassing;

— gegevens over de toxische respons per geslacht en dosisgroep, met vermelding van toxiciteitsverschijnselen of mortaliteit;

— de aard, de ernst en de duur (aanvangstijdstip en verloop) van de gedetailleerde klinische observaties (al dan niet reversibel);

— een gedetailleerde beschrijving van alle resultaten van de functionele tests;

— de obductiebevindingen;

— een gedetailleerde beschrijving van alle resultaten van neuropathologische, neurochemische, elektrofysiologische of neurogedragsprocedures, indien beschikbaar;

— gegevens over de resorptie en het metabolisme, indien beschikbaar;

— een statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten:

— informatie over de dosis/respons-relatie;

— het verband tussen eventuele andere toxische effecten en een conclusie over het neurotoxische vermogen van de teststof;

— de dosis zonder waargenomen schadelijke effecten.

Conclusies:

— een specifieke vermelding van de algehele neurotoxiciteit van de teststof is wenselijk.

4. **REFERENTIES**

1. OECD Giudance Document on Neorutoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

2. Test Guidline for a Developmental Neurotoxicitu Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., I, 233-236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., _10, 689-695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2- Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., H), 445-452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p 299-335.

17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, p. 726- 742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Table 1

Minimum numbers of animals needed per group when the neurotoxicity study is conducted separately or in combination whit studies

	NEUROTOXICITY STUDY CONDUCTED AS:			
	Separate study	Combined study with the 28-day study	Combined study with the 90-day study	Combined study with the chronic toxicity study
Total number of animals per group	10 males and 10 females	10 males and 10 females	15 males and 15 females	25 males and 25 females
Number of animals selected for functional testing including detailed clinical observations	10 males and 10 females	10 males and 10 females	10 males and 10 females	10 males and 10 females
Number of animals selected per perfusion *in situ* and neurohistopathology	5 males and 5 females	5 males and 5 females	5 males and 5 females	5 males and 5 females
Number of animals selected for repeated dose/subchronic/chronic toxicity observations, haematology, clinical biochemistry, histopathology, etc. as indicate in the respective *Guidelines*		5 males and 5 females	10 males † and 10 females †	20 males † and 20 females †
Supplemental observations, as appropriate	5 males and 5 females			

† Includes five animals selected for functional testing and detailed clinical observations as part of the neurotoxicity study

▼B

Tabel 2

Frequentie van de klinische observatie en functionele tests

Aard van de observaties		Duur van het onderzoek			
		Acuut	28 dagen	90 dagen	Chronisch
Bij alle dieren	Algemene gezondheidstoestand	dagelijks	dagelijks	dagelijks	dagelijks
	Mortaliteit/morbiditeit	Twee keer per dag	Twee keer per dag	Twee keer per dag	Twee keer per dag
Bij dieren die voor de functionele observaties gekozen zijn	Gedetailleerde klinische observaties	— vóór eerste blootstelling — binnen 8 uur na toediening op geraamde tijdstip piekeffect — op dagen 7 en 14 na toediening	— vóór eerste blootstelling — vervolgens één keer per week	— vóór eerste blootstelling — één keer tijdens de eerste of tweede week van blootstelling — vervolgens één keer per maand	— vóór eerste blootstelling — één keer aan het eind van de eerste maand van blootstelling — vervolgens één keer per drie maanden
	Functionele tests	— vóór eerste blootstelling — binnen 8 uur na toediening op geraamde tijdstip piekeffect — op dagen 7 en 14 na toediening	— vóór eerste blootstelling — tijdens de vierde week van behandeling, zo dicht mogelijk bij het eind van de blootstellingsperiode	— vóór eerste blootstelling — één keer tijdens de eerste of tweede week van blootstelling — vervolgens één keer per maand	— vóór eerste blootstelling — één keer aan het eind van de eerste maand van blootstelling — vervolgens één keer per drie maanden

▼B

B.44. **ABSORPTIE DOOR DE HUID: *IN-VIVO* METHODE**

1. **METHODE**

Deze testmethode komt overeen met OESO TG 427 (2004).

1.1. INLEIDING

De blootstelling aan veel chemische stoffen gebeurt vooral via de huid, terwijl bij de meeste bij laboratoriumdieren uitgevoerde toxicologische onderzoeken de orale toedieningsroute wordt gebruikt. Het in deze methode beschreven *in-vivo*-onderzoek naar percutane absorptie biedt de koppeling die nodig is voor een extrapolatie vanuit oraal onderzoek bij de uitvoering van een veiligheidsbeoordeling na blootstelling via de huid.

Een stof moet een groot aantal cellagen van de huid passeren alvorens deze in de circulatie terecht kan komen. De snelheidsbepalende laag is voor de meeste stoffen het stratum corneum, dat bestaat uit dode cellen. De permeabiliteit van de huid is afhankelijk van zowel de lipofiliteit van de chemische stof en de dikte van de buitenste laag van de epidermis als andere factoren zoals het molecuulgewicht en de concentratie van de stof. In het algemeen is de permeabiliteit van de huid van ratten en konijnen groter dan die van de huid van de mens, terwijl de permeabiliteit van de huid van cavia's en apen meer lijkt op die van de huid van de mens.

De methoden om de percutane absorptie te meten kunnen in twee categorieën worden verdeeld: *in vivo* en *in vitro*. De *in-vivo* methode kan bij verschillende soorten laboratoriumdieren goede informatie over de absorptie door de huid opleveren. De ontwikkeling van *in-vitro* methoden is van een recenter datum. Daarbij wordt gebruik gemaakt van het transport over dierlijke of menselijke huid met een volledige of partiële dikte naar een vloeistofreservoir. De *in-vitro* methode wordt apart in een andere testmethode (1) beschreven. Als hulp bij het kiezen van de geschiktste methode in een bepaalde situatie wordt aanbevolen de richtsnoeren van de OESO voor de uitvoering van studies inzake absorptie door de huid (2) te raadplegen, aangezien hierin gedetailleerdere informatie wordt gegeven over de geschiktheid van zowel *in-vivo* methoden als *in-vitro* methoden.

De hier beschreven *in-vivo* methode maakt het mogelijk de penetratie van de teststof in het systemische compartiment via de huid te bepalen. De techniek is al vele jaren lang op grote schaal gebruikt (3)(4)(5)(6)(7). Hoewel *in-vitro*-onderzoek naar de percutane absorptie in veel gevallen geschikt kan zijn, kunnen er ook situaties zijn waarin alleen een *in-vivo*-onderzoek de benodigde gegevens kan opleveren.

De voordelen van de *in-vivo* methode zijn dat deze een fysiologisch en metabool intact systeem gebruikt, een ook in andere toxicologische onderzoeken veel gebruikte species gebruikt en voor gebruik met andere species kan worden aangepast. De nadelen zijn dat er levende dieren moeten worden gebruikt, dat er radioactief gelabeld materiaal nodig is om gemakkelijker betrouwbare resultaten te krijgen, dat er problemen zijn bij het bepalen van de vroege absorptiefase en dat er een verschil in permeabiliteit is tussen de species die de voorkeur heeft (de rat) en de menselijke huid. Dierlijke huid heeft in het algemeen een grotere permeabiliteit en kan daardoor tot een overschatting van de percutane absorptie bij de mens leiden (6)(8)(9). Bijtende/corrosieve stoffen mogen niet bij levende dieren worden getest.

▼B

1.2. DEFINITIES

Ongeabsorbeerde dosis: de hoeveelheid die na blootstelling van het huidoppervlak wordt afgespoeld en nog op de niet-occlusieve bedekking aanwezig is, met inbegrip van de hoeveelheid waarvan wordt aangetoond dat deze tijdens de blootstelling vanaf de huid is verdampt.

Geabsorbeerde dosis (*in vivo*): de hoeveelheid teststof die aanwezig is in de urine, de wasvloeistof van de kooi, de feces, de uitgeademde lucht (indien gemeten), het bloed, de weefsels (indien verzameld) en het resterende karkas na verwijdering van de huid op de opbrenglocatie.

Absorbeerbare dosis: de hoeveelheid die na het spoelen op of in de huid aanwezig is.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof, die bij voorkeur radioactief gelabeld is, wordt bij een of meer geschikte dosisniveaus in de vorm van een representatief gangbaar preparaat op de geschoren huid van dieren aangebracht. Het testpreparaat wordt gedurende een vaste periode in contact met de huid gelaten onder een geschikte afdekking (niet-occlusief, semi-occlusief of occlusief) teneinde inslikken van het testpreparaat te voorkomen. Aan het eind van de blootstellingstijd wordt de afdekking verwijderd en wordt de huid met een geschikt reinigingsmiddel gereinigd; de afdekking en het reinigingsmateriaal worden voor analyse bewaard en er wordt een nieuwe afdekking aangebracht. De dieren worden vóór, gedurende en na de blootstellingsperiode in individuele metabole kooien gehuisvest en de uitwerpselen en uitgeademde lucht worden gedurende deze perioden voor analyse verzameld. De uitgeademde lucht behoeft niet te worden opgevangen wanneer er voldoende informatie is waaruit blijkt dat er weinig of geen vluchtige radioactieve metabolieten worden gevormd. Voor elke studie worden normaal gesproken verscheidene groepen dieren gebruikt die aan het testpreparaat worden blootgesteld. Eén groep wordt aan het eind van de blootstellingsperiode gedood. Andere groepen worden met geprogrammeerde tussenpozen daarna gedood (2). Aan het eind van de bemonsteringstijd worden de resterende dieren gedood, wordt het bloed voor analyse verzameld, wordt de opbrenglocatie voor analyse verwijderd en wordt het karkas op eventueel niet-uitgescheiden materiaal geanalyseerd. De monsters worden op correcte wijze geanalyseerd en de mate van percutane absorptie wordt bepaald (6)(8)(9).

1.4. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.4.1. **Keuze van de diersoort**

Meestal wordt de rat als species gebruikt, maar ook haarloze stammen en species waarvan de huidabsorptiesnelheid vergelijkbaarder is met die van de mens kunnen worden gebruikt (3)(6)(7)(8)(9). Er dienen jonge volwassen gezonde dieren van één geslacht (in principe mannetjes) van gangbare laboratoriumstammen te worden gebruikt. Aan het begin van de studie mag de gewichtsvariatie tussen de dieren niet groter zijn dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht. Mannetjesratten van 200-250 g zijn bijvoorbeeld geschikt, vooral in de bovenste helft van dit interval.

▼B

1.4.2. **Aantal en geslacht van de dieren**

Voor elk testpreparaat en elke geprogrammeerde beëindigingstijd moet een groep van ten minste vier dieren van één geslacht worden gebruikt. Elke groep zal na een verschillende tijdsduur worden gedood, bijvoorbeeld aan het eind van de blootstellingsperiode (meestal 6 of 24 uur) en op tijdstippen daarna (bv. 48 en 72 uur). Als er gegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er aanzienlijke verschillen in huidtoxiciteit tussen mannetjes en vrouwtjes zijn, moet het gevoeligste geslacht worden gekozen. Als dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, kan elk van beide geslachten worden gebruikt.

1.4.3. **Huisvesting en voeding**

De temperatuur in de proefdierruimte moet 22 °C (± 3 °C) zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voer mag gewoon laboratoriumvoer worden gebruikt en dit moet in ruime mate beschikbaar zijn met daarnaast een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. Tijdens de studie en bij voorkeur ook tijdens het acclimatiseren worden de dieren individueel in metabole kooien gehuisvest. Aangezien de resultaten worden beïnvloed door het morsen van voer en water, moet de kans op dergelijke voorvallen tot een minimum worden beperkt.

1.4.4. **Voorbereiding van de dieren**

De dieren worden gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren en gedurende ten minste vijf dagen vóór het begin van de studie in hun kooi gehouden, zodat ze aan de laboratoriumomstandigheden kunnen acclimatiseren.

Na de acclimatiseringsperiode en ongeveer 24 uur vóór de toediening wordt bij elk dier een stuk huid in de omgeving van de schouders en de rug geschoren. De permeabiliteit van beschadigde huid verschilt van die van intacte huid en er moet goed op worden gelet dat de huid niet wordt geschaafd. Na het scheren en ongeveer 24 uur voordat de teststof op de huid wordt aangebracht (zie punt 1.4.7), wordt het huidoppervlak met aceton schoongeveegd om talgvet te verwijderen. Nog eens met water en zeep wassen wordt niet aanbevolen, omdat zeepresten de absorptie van de teststof kunnen bevorderen. Het huidoppervlak moet groot genoeg zijn om een betrouwbare berekening van de geabsorbeerde hoeveelheid teststof per cm^2 huid mogelijk te maken, bij voorkeur ten minste 10 cm^2. Dit oppervlak is uitvoerbaar bij ratten met een lichaamsgewicht van 200-250 g. Na de voorbereiding worden de dieren in de metabole kooien teruggeplaatst.

1.4.5. **Teststof**

De teststof is de stof waarvan de penetratiekenmerken worden bestudeerd. De teststof moet bij voorkeur radioactief worden gelabeld.

1.4.6. **Testpreparaat**

Het preparaat van de teststof (bijvoorbeeld puur, verdund of geformuleerd materiaal met de teststof dat op de huid wordt aangebracht) moet hetzelfde zijn (of een realistisch surrogaat) als het preparaat waaraan mensen of andere potentiële doelsoorten kunnen worden blootgesteld. Voor een afwijking van het gangbare preparaat moet een motivering worden gegeven. Indien nodig wordt de teststof opgelost of gesuspendeerd in een geschikt medium. Voor een ander medium dan water moeten de absorptiekenmerken en de mogelijke interactie met de teststof bekend zijn.

▼B

1.4.7. **Opbrengen op de huid**

Er wordt een specifiek stuk van het huidoppervlak bepaald waar de teststof wordt opgebracht. Vervolgens wordt een bekende hoeveelheid testpreparaat gelijkmatig op deze plaats aangebracht. Deze hoeveelheid moet normaal gesproken representatief zijn voor de potentiële blootstelling van de mens, meestal 1-5 mg/cm^2 huid voor een vaste stof en maximaal 10 $\mu l/cm^2$ voor vloeistoffen. Voor andere hoeveelheden moet een motivering worden gegeven op basis van de verwachte gebruiksomstandigheden, de doelstellingen van de studie of de fysische kenmerken van het testpreparaat. Na opbrengen moet de behandelde locatie tegen verzorging door het dier zelf worden beschermd. Figuur 1 bevat een voorbeeld van een gangbaar instrument hiervoor. Meestal wordt de opbrenglocatie beschermd met een niet-occlusieve afdekking (bijvoorbeeld een permeabel nylon gaas). Bij oneindig opbrengen moet de opbrenglocatie echter occlusief worden afgedekt. Wanneer de recovery-efficiëntie van de teststof door verdamping van een half-vluchtige teststof in onaanvaardbare mate wordt verlaagd (zie ook de eerste alinea van punt 1.4.10), moet de verdampte stof worden opgevangen in een koolfilter waarmee het opbrenginstrument wordt afgedekt (zie figuur 1). Het is belangrijk dat een instrument de huid niet beschadigt en het testpreparaat niet absorbeert of daarmee reageert. De dieren worden in de individuele metabole kooien teruggeplaatst om de uitwerpselen te kunnen verzamelen.

1.4.8. **Duur van de blootstelling en bemonstering**

De blootstellingsduur is de tijdsduur tussen het opbrengen en verwijderen van het testpreparaat door de huid te wassen. Er moet op basis van de verwachte blootstellingsduur bij de mens een relevante blootstellingsduur worden gebruikt (meestal 6 of 24 uur). Na de blootstellingsperiode worden de dieren tot het geprogrammeerde tijdstip van doden in de metabole kooien gehouden. Gedurende de hele studie moet op periodieke tijdstippen worden geobserveerd of de dieren tekenen van toxiciteit/abnormale reacties vertonen. Aan het eind van de blootstellingsperiode wordt geobserveerd of de behandelde huid zichtbare tekenen van irritatie vertoont.

De metabole kooien moeten het mogelijk maken dat gedurende de hele studie de urine en de feces apart worden opgevangen. Ook moeten 14C-kooldioxide en vluchtige C-koolstofverbindingen kunnen worden opgevangen en deze moeten worden geanalyseerd wanneer ze in significante hoeveelheden worden geproduceerd (> 5 %). De urine, de feces en de opvangvloeistoffen (bijvoorbeeld ^{14}C-kooldioxide en vluchtige ^{14}C-koolstofverbindingen) moeten van elke groep op elk bemonsteringstijdstip apart worden verzameld. Als er voldoende informatie is waaruit blijkt dat er weinig of geen vluchtige radioactieve metabolieten worden gevormd, kunnen open kooien worden gebruikt.

De uitwerpselen worden gedurende de blootstellingsperiode, maximaal 24 uur na het eerste huidcontact, en vervolgens dagelijks tot het einde van het experiment verzameld. Drie intervallen voor de verzameling van de uitwerpselen zijn normaal gesproken voldoende, maar op grond van de beoogde toepassing van het testpreparaat of bestaande kinetische gegevens kunnen geschiktere of extra tijdstippen voor bestudering worden gekozen.

Aan het eind van de blootstellingsperiode wordt het beschermende instrument van elk dier verwijderd en apart bewaard om te worden geanalyseerd. De behandelde huid van alle dieren wordt ten minste drie keer gewassen met een reinigingsmiddel en bijvoorbeeld geschikte wattenproppen. Er moet voor worden gezorgd dat andere lichaamsdelen niet worden verontreinigd. Het reinigingsmiddel moet representatief zijn voor normale reinigingsmethoden, bijvoorbeeld een oplossing van zeep in water. Ten slotte moet de huid worden gedroogd. Alle wattenproppen en al het waswater moeten voor analyse worden bewaard. Er wordt een nieuwe afdekking aangebracht ter bescherming van de behandelde locatie van de dieren die behoren tot groepen die voor een later tijdstip bestemd zijn, voordat ze in hun eigen aparte kooien worden teruggeplaatst.

▼B

1.4.9. **Slotprocedures**

In elke groep worden de dieren op het geprogrammeerde tijdstip elk afzonderlijk gedood en wordt het bloed voor analyse opgevangen. Het beschermende instrument of de afdekking wordt voor analyse verwijderd. Bij elk dier wordt de huid van de opbrenglocatie en een vergelijkbaar oppervlak onbehandelde geschoren huid weggenomen om apart te worden geanalyseerd. De opbrenglocatie kan worden gefractioneerd om het stratum corneum te scheiden van de epidermis daaronder om meer informatie over de verdeling van de teststof te krijgen. De bepaling van deze verdeling gedurende een zekere periode na de blootstellingsperiode moet enige aanwijzingen opleveren over de lotgevallen van de teststof in het stratum corneum. Om het fractioneren van de huid (na het wassen van de huid aan het eind en het doden van het dier) te vergemakkelijken wordt elke beschermende afdekking verwijderd. De huid van de opbrenglocatie, met een ronde rand van de omringende huid daaromheen, wordt van de rat verwijderd en op een plaat geprikt. Op het huidoppervlak wordt met lichte druk een strook kleefband aangebracht en de kleefband wordt samen met een deel van het stratum corneum verwijderd. Vervolgens worden opnieuw stroken kleefband aangebracht totdat het kleefband niet meer aan het huidoppervlak blijft plakken, wanneer het stratum corneum volledig is verwijderd. Voor elk dier kunnen alle stroken kleefband in één houder worden verzameld en hieraan wordt een stof toegevoegd om het weefsel te verteren, waarin het stratum corneum wordt opgenomen. Potentiële doelorganen kunnen worden verwijderd om apart te worden geanalyseerd, voordat het resterende karkas op de daarin geabsorbeerde dosis wordt geanalyseerd. De karkassen van de dieren moeten apart worden bewaard voor analyse. Meestal zal een analyse van de totale inhoud volstaan. Doelorganen kunnen worden verwijderd om apart te worden geanalyseerd (indien andere studies daar aanleiding toe geven). De urine die op het geprogrammeerde tijdstip van doden nog in de blaas aanwezig is, moet aan de eerder verzamelde urine worden toegevoegd. Na het verzamelen van de uitwerpselen in de metabole kooien op het geprogrammeerde tijdstip van doden worden de kooien en de opvangbakken daarvan met een geschikt oplosmiddel gewassen. Ook andere mogelijk verontreinigde apparatuur wordt op dezelfde wijze geanalyseerd.

1.4.10. **Analyse**

In alle studies moet een afdoende recovery worden gehaald (daarbij moet worden gestreefd naar een gemiddelde van 100 ± 10 % van de radioactiviteit). Voor een recovery buiten dit interval moet een motivering worden gegeven. De hoeveelheid van de toegediende dosis in elk monster moet met geschikte gevalideerde procedures worden geanalyseerd.

In de statistische analyse moet een meting van de variantie van de duplo's voor elke opgebrachte hoeveelheid worden opgenomen.

2. **GEGEVENS**

Voor elk dier moeten op elk bemonsteringstijdstip voor de teststof en/of metabolieten de volgende metingen worden uitgevoerd. Naast de individuele gegevens moeten de voor elk bemonsteringstijdstip gegroepeerde gegevens als gemiddelden worden gerapporteerd.

— de hoeveelheid op de beschermende instrumenten;

— de hoeveelheid die uit de huid kan worden verwijderd;

— de hoeveelheid in/op de huid die niet van de huid kan worden gewassen;

▼B

— de hoeveelheid in het bloedmonster;

— de hoeveelheid in de uitwerpselen en de uitgeademde lucht (indien van toepassing);

— de hoeveelheid die achterblijft in het karkas en in organen die voor aparte analyse zijn verwijderd.

Aan de hand van de hoeveelheid teststof en/of metabolieten in de uitwerpselen, de uitgeademde lucht, het bloed en het karkas kan op elk tijdstip de totale geabsorbeerde hoeveelheid worden bepaald. Ook kan de hoeveelheid gedurende de blootstellingsduur geabsorbeerde teststof per cm^2 aan de teststof blootgestelde huid worden berekend.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de in het protocol vermelde voorschriften worden opgenomen, met inbegrip van een motivering voor het gebruikte testsysteem, en de volgende gegevens:

Teststof:

— informatie ter identificatie (bv. het CAS-nummer, indien beschikbaar; bron; zuiverheid (radiochemische zuiverheid); bekende verontreinigingen; chargenummer);

— fysische aard, fysisch-chemische eigenschappen (bv. pH, vluchtigheid, oplosbaarheid, stabiliteit, molecuulgewicht en log P_{ow}).

Testpreparaat:

— formulering en motivering van het gebruik;

— gedetailleerde gegevens over het testpreparaat, zoals opgebrachte hoeveelheid, bereikte concentratie, medium, stabiliteit en homogeniteit.

Proefdier:

— gebruikte species/stam;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— bron van de dieren, huisvestingsomstandigheden, voeding enz.;

— gewicht van elk dier aan het begin van de test.

Testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over de toediening van het testpreparaat (opbrenglocatie, analysemethoden, occlusie/niet-occlusie, volume, extractie, detectie);

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water.

Resultaten:

— eventuele verschijnselen van toxiciteit;

— tabel met absorptiegegevens (uitgedrukt als snelheid, hoeveelheid of percentage);

▼B

— algehele recovery van het experiment;

— interpretatie van de resultaten, vergelijking met eventueel beschikbare gegevens over de percutane absorptie van de teststof.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

1. Testmethode B.45. Absorptie door de huid: *in vitro*-methode.

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.

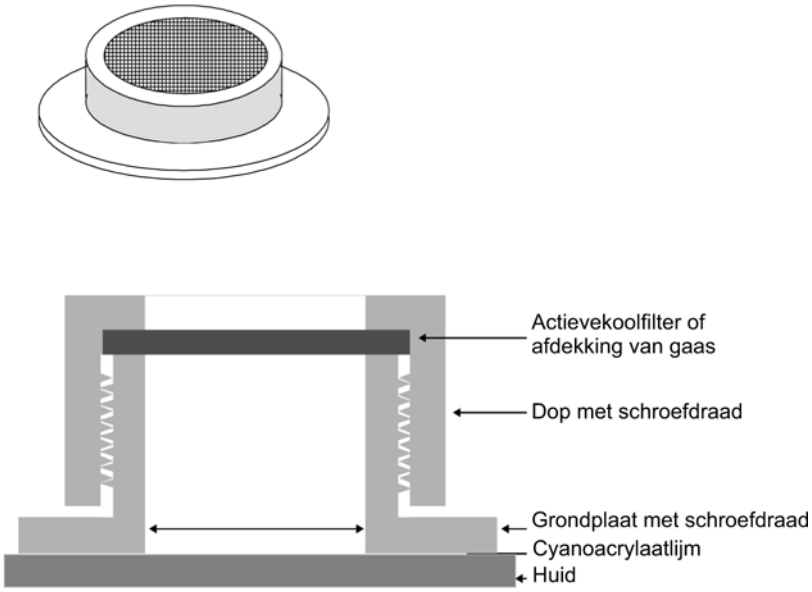
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼B

Figuur 1

Voorbeeld van een ontwerp voor een gangbaar instrument om de opbrenglocatie op de huid te bepalen en te beschermen bij *in vivo*-onderzoek van de percutane absorptie



▼B

B.45. **ABSORPTIE DOOR DE HUID: *IN-VITRO* METHODE**

1. **METHODE**

Deze testmethode komt overeen met OESO TG 428 (2004).

1.1. INLEIDING

Deze methode is ontworpen om informatie te verschaffen over de absorptie van een teststof die op weggenomen huid wordt aangebracht. De methode kan worden gecombineerd met de *in-vivo* methode voor absorptie door de huid (1) of afzonderlijk worden uitgevoerd. Als hulp bij het opzetten van studies op basis van deze methode wordt aanbevolen de richtsnoeren van de OESO voor de uitvoering van studies inzake absorptie door de huid (2) te raadplegen. Deze richtsnoeren zijn opgesteld om gemakkelijker geschikte *in-vitro* procedures voor specifieke omstandigheden te kunnen kiezen, zodat de betrouwbaarheid van resultaten die met deze methode worden verkregen, wordt gewaarborgd.

De methoden om de absorptie door de huid en de toediening via de huid te meten kunnen in twee categorieën worden verdeeld: *in vivo* en *in vitro*. *In vivo*-methoden voor absorptie door de huid zijn gangbaar en leveren farmacokinetische informatie bij een scala van diersoorten op. Een *in-vivo* methode wordt apart in een andere testmethode (1) beschreven. Ook *in-vitro* methoden worden al vele jaren gebruikt om de absorptie door de huid te meten. Hoewel er voor de in deze testmethode beschreven *in-vitro* methoden geen formeel valideringsonderzoek is uitgevoerd, waren deskundigen van de OESO het er in 1999 over eens dat er voldoende gegevens geëvalueerd waren om de *in-vitro* methode te ondersteunen (3). Nadere bijzonderheden ter motivering van deze ondersteuning, waaronder een significant aantal directe vergelijkingen van *in vitro*- en *in-vivo* methoden, worden in de richtsnoeren (2) vermeld. Er zijn verschillende monografieën waarin dit onderwerp wordt besproken en gedetailleerde achtergrondinformatie over het gebruik van een *in-vitro* methode wordt gegeven (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). *In-vitro* methoden meten de diffusie van chemische stoffen naar de huid en via de huid naar een vloeistofreservoir en kunnen niet-levende huid gebruiken om uitsluitend de diffusie te meten of verse metabool actieve huid om tegelijkertijd de diffusie en het metabolisme in de huid te meten. Dergelijke methoden worden specifiek gebruikt als screening om de toediening van chemische stoffen op en door de huid uit verschillende formuleringen te vergelijken en kunnen ook nuttige modellen bieden voor de evaluatie van de absorptie door de huid bij de mens.

De *in-vitro* methode is wellicht niet voor alle situaties en categorieën chemische stoffen bruikbaar. Het kan mogelijk zijn de *in-vitro* testmethode te gebruiken voor een eerste kwalitatieve evaluatie van de penetratie door de huid. In bepaalde gevallen zal het wellicht nodig zijn als vervolg hierop *in-vivo* gegevens te verzamelen. Voor een verdere uitwerking van situaties waarin de *in-vitro* methode geschikt is, wordt verwezen naar de richtsnoeren (2). Aanvullende gedetailleerde informatie om deze beslissing te ondersteunen is te vinden in (3).

Deze methode bevat algemene beginselen voor het meten van de absorptie door en de toediening via de huid van een teststof met behulp van verwijderde huid. Huid van vele zoogdiersoorten en ook van de mens kan worden gebruikt. De permeabiliteit van huid blijft na verwijdering uit het lichaam onveranderd, omdat de belangrijkste barrière voor diffusie het niet-levende stratum corneum is; actief transport van chemische stoffen door de huid is niet waargenomen. Er is aangetoond dat de huid in staat is bepaalde chemische stoffen tijdens de absorptie door de huid te metaboliseren (6), maar dit proces is niet snelheidsbeperkend ten aanzien van de feitelijk geabsorbeerde dosis, hoewel het de aard van het materiaal dat in de bloedsomloop terechtkomt wel kan beïnvloeden.

▼B

1.2. DEFINITIES

Ongeabsorbeerde dosis: de hoeveelheid die na blootstelling van het huidoppervlak wordt afgespoeld en nog op de niet-occlusieve bedekking aanwezig is, met inbegrip van de hoeveelheid waarvan wordt aangetoond dat deze tijdens de blootstelling vanaf de huid is verdampt.

Geabsorbeerde dosis (*in vitro*): massa teststof die binnen een gespecificeerd tijdsbestek in de receptorvloeistof of de systemische circulatie terechtkomt.

Absorbeerbare dosis (*in vitro*): de hoeveelheid die na het spoelen op of in de huid aanwezig is.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof, die radioactief gelabeld kan zijn, wordt aangebracht op het oppervlak van een huidmonster dat de twee compartimenten van een diffusiecel van elkaar scheidt. De chemische stof blijft gedurende een gespecificeerde tijd onder gespecificeerde omstandigheden op de huid aanwezig en wordt daarna met een geschikte reinigingsprocedure verwijderd. De receptorvloeistof wordt gedurende het experiment op bepaalde tijdstippen bemonsterd en geanalyseerd op de teststof en/of metabolieten.

Wanneer metabool actieve systemen worden gebruikt, kunnen met geschikte methoden metabolieten van de teststof worden geanalyseerd. Aan het eind van het experiment wordt, indien van toepassing, de distributie van de teststof en de metabolieten kwantitatief bepaald.

Onder geschikte omstandigheden, die in deze methode en de richtsnoeren (2) worden beschreven, wordt de absorptie van een teststof gedurende een bepaalde tijd gemeten door analyse van de receptorvloeistof en de behandelde huid. De hoeveelheid teststof die in de huid achterblijft, moet als geabsorbeerd worden beschouwd tenzij kan worden aangetoond dat de absorptie op grond van uitsluitend de waarden in de receptorvloeistof kan worden bepaald. Op grond van een analyse van de andere componenten (materiaal dat van de huid wordt gewassen of in de huidlagen achterblijft) kunnen nadere gegevens worden bepaald, bijvoorbeeld de totale verdeling van de teststof en de procentuele recovery.

Om de goede uitvoering en betrouwbaarheid van het testsysteem in het uitvoerende laboratorium aan te tonen moeten de resultaten voor relevante referentiechemicaliën beschikbaar zijn en in overeenstemming zijn met de gepubliceerde literatuur voor de gebruikte methode. Aan deze eis kan worden voldaan door tegelijk met de teststof een geschikte referentiestof (waarvan de lipofiliteit bij voorkeur vergelijkbaar is met die van de teststof) te testen of door adequate historische gegevens voor een aantal referentiestoffen met uiteenlopende lipofiliteit (bv. cafeïne, benzoëzuur en testosteron) te verstrekken.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1 **Diffusiecel**

Een diffusiecel bestaat uit een donor- en een receptorcompartiment waartussen een stukje huid wordt geklemd (figuur 1 geeft een voorbeeld van een gangbaar ontwerp). De cel moet voor een goede afdichting rondom de huid zorgen en mogelijkheden bieden voor een gemakkelijke bemonstering en een goede menging van de receptorvloeistof die in contact staat met de onderkant van de huid, alsmede voor een goede regulering van de temperatuur van de cel en de inhoud daarvan. Zowel statische als doorstroom-diffusiecellen zijn aanvaardbaar. Normaal gesproken is er bij de blootstelling aan een eindige dosis van een testpreparaat geen sprake van occlusie van het donorcompartiment. Voor oneindige toepassingen en bepaalde scenario's voor eindige doses kan er echter wel occlusie van het donorcompartiment worden toegepast.

▼B

1.4.2 **Receptorvloeistof**

Het gebruik van een fysiologisch compatibele receptorvloeistof wordt aanbevolen, maar ook andere vloeistoffen mogen worden gebruikt, mits daarvoor een motivering wordt gegeven. De exacte samenstelling van de receptorvloeistof moet worden vermeld. Er moet worden aangetoond dat de teststof voldoende oplosbaar is in de receptorvloeistof, zodat deze geen belemmering voor absorptie vormt. Daarnaast mag de receptorvloeistof geen nadelige invloed op de intacte staat van de huid hebben. In een doorstroomsysteem mag de stroomsnelheid de diffusie van de teststof naar de receptorvloeistof niet belemmeren. In een systeem met een statische cel moet de vloeistof continu worden geroerd en periodiek worden bemonsterd. Als het metabolisme wordt onderzocht, moet de receptorvloeistof de levensvatbaarheid van de huid gedurende het hele experiment ondersteunen.

1.4.3 **Huidpreparaten**

Er kan huid van menselijke of dierlijke bronnen worden gebruikt. Voor het gebruik van menselijke huid gelden nationale en internationale ethische overwegingen en voorwaarden. Hoewel levende huid de voorkeur verdient, kan ook niet-levende huid worden gebruikt, mits kan worden aangetoond dat de huid intact is. Zowel epidermis-membranen (enzymatisch, met warmte of chemisch gescheiden) als huid met een partiële dikte (meestal 200-400 μm dik), verkregen met een dermatoom, kunnen worden gebruikt. Ook huid met een volledige dikte kan worden gebruikt, maar een al te dikke huid (d.w.z. ongeveer > 1 mm) moet worden vermeden, tenzij dit specifiek nodig is voor de bepaling van de teststof in de huidlagen. Voor de keuze van species, anatomische locatie en preparatietechniek moet een motivering worden gegeven. Er zijn aanvaardbare gegevens nodig van ten minste vier duplo's per testpreparaat.

1.4.4 **Intacte staat van het huidpreparaat**

Het is van cruciaal belang dat de huid op correcte wijze wordt geprepareerd. Een onjuiste behandeling kan leiden tot beschadiging van het stratum corneum en daarom moet de intacte staat van de geprepareerde huid worden gecontroleerd. Wanneer het huidmetabolisme wordt bestudeerd, moet de verse weggenomen huid zo spoedig mogelijk en onder omstandigheden waarvan bekend is dat ze metabole activiteit ondersteunen, worden gebruikt. Als algemene leidraad geldt dat verse weggenomen huid binnen 24 uur moet worden gebruikt, maar de aanvaardbare bewaartermijn kan afhangen van het bij de metabolisering betrokken enzymsysteem en de opslagtemperatuur (13). Wanneer de huidpreparaten vóór gebruik bewaard zijn, moet worden aangetoond dat de barrièrefunctie intact is gebleven.

1.4.5 **Teststof**

De teststof is de stof waarvan de penetratiekenmerken worden bestudeerd. De teststof moet bij voorkeur radioactief worden gelabeld.

1.4.6 **Testpreparaat**

Het preparaat van de teststof (bijvoorbeeld puur, verdund of geformuleerd materiaal met de teststof dat op de huid wordt aangebracht) moet hetzelfde zijn (of een realistisch surrogaat) als het preparaat waaraan mensen of andere potentiële doelsoorten kunnen worden blootgesteld. Voor een afwijking van het gangbare preparaat moet een motivering worden gegeven.

▼B

1.4.7 **Concentraties en formuleringen van de teststof**

Normaal gesproken wordt meer dan een concentratie van de teststof gebruikt, waarmee het bereik wordt bestreken van de concentraties waaraan de mens kan worden blootgesteld. Ook moet worden overwogen een aantal gangbare formuleringen te testen.

1.4.8 **Opbrengen op de huid**

Bij blootstelling van de mens aan chemische stoffen gaat het onder normale omstandigheden meestal om een eindige dosis. Daarom moet een zodanige hoeveelheid teststof worden opgebracht dat de blootstelling van de mens wordt nagebootst, normaal gesproken 1-5 mg/cm^2 huid voor een vaste stof en maximaal 10 $\mu l/cm^2$ voor vloeistoffen. Voor de hoeveelheid moet een motivering worden gegeven op basis van de verwachte gebruiksomstandigheden, de doelstellingen van de studie of de fysische kenmerken van het testpreparaat. De op de huid opgebrachte hoeveelheid kan bijvoorbeeld oneindig zijn wanneer er grote volumes per oppervlakte-eenheid worden opgebracht.

1.4.9 **Temperatuur**

De passieve diffusie van chemische stoffen (en derhalve ook de absorptie door de huid) wordt beïnvloed door de temperatuur. Het diffusiecompartiment en de huid moeten op een constante temperatuur rond de normale huidtemperatuur van 32 + 1 ^oC worden gehouden. Het ontwerp van de cel bepaalt op welke temperatuur het waterbad of het verwarmingsblok moet worden gehouden om ervoor te zorgen dat de temperatuur van het receptorcompartiment en de huid aan de fysiologische norm voldoet. De vochtigheid moet bij voorkeur tussen 30 % en 70 % liggen.

1.4.10 **Duur van de blootstelling en bemonstering**

De huid kan gedurende het hele experiment of een kortere tijd (bijvoorbeeld om een specifiek type blootstelling van de mens na te bootsen) aan het testpreparaat worden blootgesteld. De overmaat testpreparaat wordt met een geschikt reinigingsmiddel van de huid gewassen en de wasvloeistof wordt voor analyse opgevangen. De procedure om het testpreparaat te verwijderen is afhankelijk van de verwachte gebruiksomstandigheden en hiervoor moet een motivering worden gegeven. Normaal gesproken is een bemonsteringsperiode van 24 uur nodig om een afdoende karakterisering van het absorptieprofiel mogelijk te maken. Aangezien de toestand van de huid na 24 uur slechter kan worden, mag de bemonsteringstijd normaal gesproken niet langer zijn dan 24 uur. Voor teststoffen die snel in de huid penetreren zal dit wellicht niet nodig zijn, mar voor teststoffen die langzaam penetreren kan een langere periode nodig zijn. De bemonsteringsfrequentie van de receptorvloeistof moet zodanig zijn dat het absorptieprofiel van de teststof grafisch kan worden weergegeven.

1.4.11 **Slotprocedures**

Alle componenten van het testsysteem moeten worden geanalyseerd en de recovery moet worden bepaald. Deze omvat het donorcompartiment, het waswater van het huidoppervlak, het huidpreparaat en het receptorcompartiment met de receptorvloeistof. In sommige gevallen kan de huid worden gefractioneerd in blootgesteld huidoppervlak en huid onder de flens van de cel en in stratum corneum, epidermis en dermis, die dan apart kunnen worden geanalyseerd.

1.4.12 **Analyse**

In alle studies moet een afdoende recovery worden gehaald (daarbij moet worden gestreefd naar een gemiddelde van 100 ± 10 % van de radioactiviteit en voor afwijkingen moet een motivering worden gegeven). De hoeveelheid teststof in de receptorvloeistof, het huidpreparaat, het waswater van het huidoppervlak en het spoelwater van de apparatuur moet met behulp van een geschikte techniek worden geanalyseerd.

▼B

2. **GEGEVENS**

De analyse van de receptorvloeistof, de distributie van de teststof in het testsysteem en het absorptieprofiel in de loop van de tijd moeten worden gerapporteerd. Wanneer de blootstellingsvoorwaarden zodanig zijn dat er sprake is van een eindige dosis, moeten de van de huid gewassen hoeveelheid, de in en aan de huid gebonden hoeveelheid (en de hoeveelheid in de verschillende huidlagen, indien deze is geanalyseerd) en de hoeveelheid in de receptorvloeistof (snelheid en hoeveelheid of percentage van de opgebrachte hoeveelheid) worden berekend. De absorptie door de huid kan soms alleen met behulp van de gegevens over de receptorvloeistof worden uitgedrukt. Wanneer de teststof echter aan het eind van de studie nog in de huid aanwezig is, moet deze hoeveelheid wellicht worden meegerekend in de totale geabsorbeerde hoeveelheid (zie punt 66 van referentie (3)). Wanneer er sprake is van blootstellingsomstandigheden met een oneindige dosis, kunnen de gegevens de berekening van een permeabiliteitsconstante (Kp) mogelijk maken. In deze laatste situatie is het geabsorbeerde percentage niet relevant.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de in het protocol vermelde voorschriften worden opgenomen, met inbegrip van een motivering voor het gebruikte testsysteem, en de volgende gegevens:

Teststof:

— fysische aard, fysisch-chemische eigenschappen (ten minste het molecuulgewicht en log P_{ow}) en de zuiverheid (radiochemische zuiverheid);

— informatie ter identificatie (bv. het chargenummer);

— oplosbaarheid in de receptorvloeistof.

Testpreparaat:

— formulering en motivering van het gebruik;

— homogeniteit.

Testomstandigheden:

— bronnen en locatie van de huid, preparatiemethode, bewaaromstandigheden vóór het gebruik, eventuele voorbehandeling (reiniging, behandeling met antibiotica enz.), metingen inzake de intacte staat van de huid, metabole status, motivering van het gebruik;

— ontwerp van de cel, samenstelling van de receptorvloeistof, stroomsnelheid van de receptorvloeistof of bemonsteringstijdstippen en -procedures;

— gedetailleerde gegevens over het opbrengen van het testpreparaat en kwantificering van de opgebrachte dosis;

— duur van de blootstelling;

— gedetailleerde gegevens over de verwijdering van het testpreparaat van de huid, bijvoorbeeld wassen van de huid;

— gedetailleerde gegevens over de analyse van de huid en eventueel gebruikte fractioneringstechnieken om de distributie in de huid aan te tonen;

▼B

— spoelprocedures voor cel en apparatuur;

— bepalingsmethoden, extractietechnieken, detectiegrenzen en validering van de analysemethode.

Resultaten:

— algehele recovery van het experiment (opgebrachte dosis = waswater van de huid + huid + receptorvloeistof + spoelwater van de cel);

— tabel met de individuele recovery van de cel in elk compartiment;

— absorptieprofiel;

— tabel met absorptiegegevens (uitgedrukt als snelheid, hoeveelheid of percentage).

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. **REFERENTIES**

1. Testmethode B.44. Absorptie door de huid: *in-vivo* methode.

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 HL (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, Beek 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

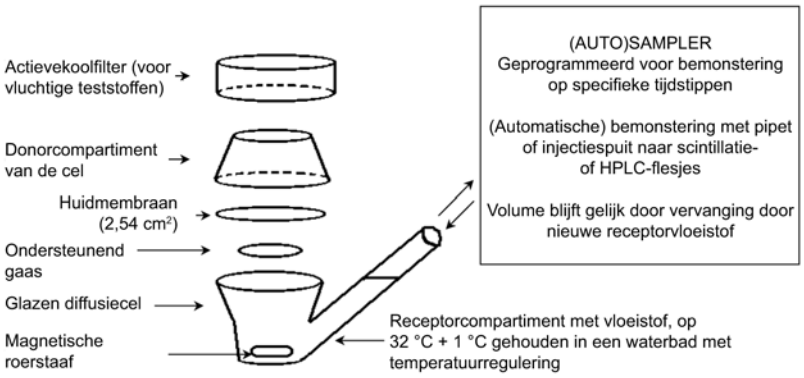
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

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.

Figuur 1

Voorbeeld van een gangbaar ontwerp voor een statische diffusiecel voor *in-vitro*-onderzoek van de percutane absorptie



▼M3

B.46. **IN-VITROHUIDIRRITATIE: TESTMETHODE MET GERECONSTRUEERDE HUMANE EPIDERMIS**

INLEIDING

1. Onder huidirritatie wordt verstaan: het ontstaan van reversibele weefselschade aan de huid na het aanbrengen van een testmateriaal gedurende maximaal vier uur (zoals gedefinieerd in het GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties) en Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels, de zogeheten CLP-Verordening (1)(3)). Deze testmethode bevat een in-vitroprocedure die gebruikt kan worden om de gevaren van irriterende chemische stoffen (stoffen en mengsels) te identificeren in overeenstemming met het VN-GHS en de EU-CLP-categorie 2 (1) (2) (3). In de EU en andere regio's die niet de optionele GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) hebben aangenomen, kan deze TM ook worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die niet zijn ingedeeld, d.w.z. stoffen in de VN-GHS- en EU-CLP-categorie „Geen categorie" (1)(3). Deze TM kan worden gebruikt om de door chemische stoffen veroorzaakte huidirritatie te bepalen als een zelfstandige vervangende test voor in-vivohuidirritatietests binnen een teststrategie met verschillende niveaus (4 en hoofdstuk B.4 in deze bijlage).

2. De bepaling van de huidirritatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren [OESO-testrichtlijn 404; hoofdstuk B.4 in deze bijlage] (4). In verband met bezorgdheid ten aanzien van dierenwelzijn is B.4 in 2004 herzien, waarbij de bepaling van huidcorrosie/-irritatie wordt uitgevoerd door een teststrategie met meerdere niveaus toe te passen, met gebruikmaking van gevalideerde in-vitro- of ex-vivotestmethoden, ter voorkoming van pijn en leed bij dieren. Drie gevalideerde in-vitrotestmethoden zijn aangenomen als OESO-testrichtlijnen 430, 431 en 435 (5) (6) (7) en twee methoden zijn als de hoofdstukken B.40 en B.40 bis in deze bijlage opgenomen, die bedoeld zijn om gebruikt te worden voor het corrosiviteitsgedeelte van de teststrategie met meerdere niveaus van B.4 of OESO-testrichtlijn 404 (4).

3. Deze TM heeft betrekking op huidirritatie als eindpunt voor de menselijke gezondheid. De methode is gebaseerd op gereconstrueerde humane epidermis (RhE), die qua algemeen ontwerp (het gebruik van uit mensen verkregen niet-getransformeerde epidermiskeratinocyten als celbron en het gebruik van representatief weefsel en cytoarchitectuur) nauwe overeenkomsten heeft met de biochemische en fysiologische eigenschappen van de bovenste delen van de menselijke huid, d.w.z. de epidermis. Deze TM omvat tevens een reeks prestatienormen (aanhangsel 2) voor de beoordeling van soortgelijke en gewijzigde RhE-gebaseerde methoden die zijn ontwikkeld door EC-ECVAM (8), in overeenstemming met de beginselen van OESO-richtsnoer nr. 34 (9).

4. Er zijn drie gevalideerde methoden die voldoen aan de eisen van deze TM. Prevaliderings-, optimaliserings- en valideringsonderzoeken zijn afgerond voor een in-vitromethode (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), met gebruikmaking van een RhE-model, die in de handel verkrijgbaar is als EpiSkin™ (aangeduid als de Validated Reference Method (VRM), gevalideerde referentiemethode). Twee andere in de handel verkrijgbare in vitro uitgevoerde huidirritatietestmethoden op basis van RhE hebben soortgelijke resultaten opgeleverd als de VRM overeenkomstig op prestatienormen gebaseerde validering (21), en dit zijn de RhE-methoden EpiDerm™ SIT (EPI-200) en SkinEthic™ (22).

▼M3

5. Voordat een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde in-vitro-RhE-methode anders dan de RhE-methoden VRM, EpiDerm™ SIT (EPI-200) of SkinEthic™ kan worden gebruikt voor gereglementeerde doeleinden, moeten de betrouwbaarheid, relevantie (nauwkeurigheid) en beperkingen ervan voor het voorgestelde gebruik bepaald worden om te waarborgen dat de methode als vergelijkbaar met de VRM kan worden beschouwd, overeenkomstig de vereisten van de in deze TM vastgestelde prestatienormen (aanhangsel 2). Daarnaast wordt aanbevolen de OESO-toelichting (OECD Explanatory Background Document) inzake in vitro uitgevoerde huidirritatietests te raadplegen alvorens een soortgelijke of gewijzigde in-vitro-RhE-methode te ontwikkelen, te valideren en in te dienen voor wettelijke goedkeuring (23).

DEFINITIES

6. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

7. Zoals het valideringsonderzoek (16) aantoont, bevat de TM de beperking dat de chemische stoffen niet kunnen worden ingedeeld in de optionele GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) (1). Indien de methode wordt gebruikt als een gedeeltelijk vervangende test, kan het nodig zijn aanvullende invivotests uit te voeren om het huidirritatiepotentieel volledig te karakteriseren (4 en hoofdstuk B.4 van deze bijlage). Voor het gebruik van menselijke huid gelden nationale en internationale ethische overwegingen en voorwaarden.

8. Deze TM heeft betrekking op de in-vitrohuidirritatiecomponent van de teststrategie met meerdere niveaus van B.4 (OESO-testrichtlijn 404) inzake huidcorrosie/-irritatie (4). Hoewel deze TM geen toereikende informatie over huidcorrosie oplevert, moet worden opgemerkt dat B.40 bis (OESO-testrichtlijn 431) betreffende huidcorrosie gebaseerd is op hetzelfde RhE-testsysteem, maar met gebruikmaking van een ander protocol (hoofdstuk B.40 bis). Deze methode is gebaseerd op RhE-modellen die gebruikmaken van menselijke keratinocyten, die derhalve in vitro het doelorgaan van het te onderzoeken bestanddeel vertegenwoordigen. Bovendien heeft de methode direct betrekking op de eerste fase van de inflammatoire reactie/het werkingsmechanisme (celbeschadiging en weefselbeschadiging leidend tot plaatselijk trauma) die tijdens irritatie in vivo plaatsvindt. Een brede reeks chemische stoffen is getest binnen het onderliggende valideringsproces voor deze TM en de empirische databank van het valideringsonderzoek bevat in totaal 58 chemische stoffen (16)(18)(23). Dit is van toepassing op vaste stoffen, vloeibare stoffen, halfvaste stoffen en wassen. De vloeibare stoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen oplosbaar of niet oplosbaar in water zijn. Indien mogelijk moeten vaste stoffen tot een poeder worden vermalen, voordat ze worden aangebracht; geen andere voorbehandeling van het monster is vereist. Gassen en aerosols zijn nog niet gevalideerd in een valideringsonderzoek (24). Hoewel het denkbaar is dat deze met behulp van RhE-technologie kunnen worden getest, staat de huidige TM het testen van gassen en aerosols niet toe. Tevens dient opgemerkt te worden dat sterk gekleurde chemische stoffen de metingen van levensvatbaarheid van cellen kunnen verstoren en het bij deze stoffen nodig is aangepaste controles te gebruiken met het oog op correcties (zie punten 24-26).

9. Eén test bestaande uit drie gerepliceerde weefsels zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien de indeling ervan ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen zoals niet-concordante metingen van replicaties en/of een gemiddeld levensvatbaarheidspercentage van 50 ± 5 %, moet een tweede test worden overwogen, evenals een derde test in geval van niet-concordante resultaten tussen de eerste twee tests.

▼M3

PRINCIPE VAN DE TEST

10. De teststof wordt plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal RhE-model dat bestaat uit niet-getransformeerde, uit mensen verkregen epidermiskeratinocyten, die gekweekt zijn om een meerlagig, hooggedifferentieerd model van de menselijke *epidermis* te vormen. Het model bestaat uit een georganiseerd *stratum basale*, *stratum spinosum* en *stratum granulosum*, en een meerlagig *stratum corneum*, die intercellulaire lamelvormige lipidelagen bevatten die representatief zijn voor de belangrijkste lipideklassen, analoog aan die in vivo worden aangetroffen.

11. Door chemische stoffen geïnduceerde huidirritatie, die zich manifesteert als erytheem en oedeem, is het gevolg van een cascade van gebeurtenissen, beginnend met de penetratie van de *stratum corneum* en beschadiging van de onderliggende keratinocytlagen. Uit de afstervende keratinocyten komen mediatoren vrij die de inflammatoire cascade veroorzaken die inwerkt op de cellen in de *dermis*, in het bijzonder de stroma- en endotheliale cellen. Het zijn de dilatatie en verhoogde permeabiliteit van de endotheliale cellen waardoor de waargenomen erytheem en oedeem ontstaan (24). De op RhE gebaseerde methoden meten de initiërende gebeurtenissen in de cascade.

12. De levensvatbaarheid van cellen wordt gemeten door enzymatische omzetting van de vitale kleurstof MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromide, thiazolylblauw; CAS-nummer 298-93-1) in een blauw formazanzout dat kwantitatief wordt gemeten na extractie uit weefsels (25). Irriterende chemische stoffen worden geïdentificeerd op hun vermogen om de levensvatbaarheid van cellen te reduceren tot minder dan gedefinieerde drempelwaarden (d.w.z. ≤ 50 %, voor GHS-/CLP-categorie 2). Afhankelijk van het regelgevend kader waarin de resultaten van deze TM worden gebruikt, kunnen chemische stoffen die leiden tot een levensvatbaarheid van cellen van meer dan de gedefinieerde grenswaarde beschouwd worden als niet-irriterende stoffen (d.w.z. > 50 %, geen categorie).

AANTONING VAN BEKWAAMHEID

13. Voordat de drie gevalideerde methoden die aan deze TM voldoen, routinematig worden gebruikt, moeten laboratoria technische bekwaamheid aantonen, met gebruikmaking van de tien referentiestoffen die in tabel 1 worden vermeld. Voor soortgelijke methoden die op grond van deze TM worden ontwikkeld of voor wijzigingen van enige van de drie gevalideerde methoden, moet aan de in aanhangsel 2 van deze TM beschreven prestatienormvereisten worden voldaan, voordat de methode wordt gebruikt voor gereglementeerde tests.

14. Als onderdeel van deze bekwaamheidsdemonstratie wordt aanbevolen dat de gebruiker na ontvangst de door de fabrikant van het RhE-model gespecificeerde barrière-eigenschappen van de weefsels verifieert. Dit is in het bijzonder van belang indien weefsels over lange afstanden/gedurende lange perioden zijn vervoerd. Zodra een methode met succes is opgezet en de bekwaamheid in het gebruik ervan is aangetoond, behoeft een dergelijke verificatie niet routinematig te worden uitgevoerd. Echter, indien een methode routinematig wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de barrière-eigenschappen op regelmatige basis te blijven toetsen.

Tabel 1

Referentiestoffen ([1])

Chemische stof	CAS-nr.	In-vivoscore ([2])	Fysische toestand	VN-GHS-/EU-CLP-categorie
Naftaleenazijnzuur	86-87-3	0	vast	geen cat.
isopropanol	67-63-0	0,3	vloeibaar	geen cat.

▼M3

Chemische stof	CAS-nr.	In-vivoscore ([2])	Fysische toestand	VN-GHS-/EU-CLP-categorie
Methylstearaat	112-61-8	1	vast	geen cat.
Heptylbutyraat	5870-93-9	1,7	vloeibaar	geen cat. (*optionele cat. 3*) ([3]) ([4])
Hexylsalicylaat	6259-76-3	2	vloeibaar	geen cat. (*optionele cat. 3*) ([3]) ([4])
Cyclamenaldehyde	103-95-7	2,3	vloeibaar	cat. 2
1-broomhexaan	111-25-1	2,7	vloeibaar	cat. 2
kaliumhydroxide (5 % water)	1310-58-3	3	vloeibaar	cat. 2
1-methyl-3-fenyl-1-piperazine	5271-27-2	3,3	vast	cat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	vloeibaar	cat. 2

([1]) Deze referentiestoffen zijn een subgroep van de in het valideringsonderzoek gebruikte referentiestoffen.
([2]) In-vivoscore overeenkomstig B.4 en OESO-testrichtlijn 404 (4).
([3]) Bij deze testmethode wordt de optionele GHS-categorie 3 (licht irriterende stoffen) (1) beschouwd als geen categorie.
([4]) De optionele VN-GHS-categorie 3 is niet toepasbaar op grond van de CLP-verordening van de EU.

PROCEDURE

15. Het onderstaande is een beschrijving van de componenten en procedures van een RhE-methode voor beoordeling van huidirritatie. Een RhE-model moet gereconstrueerd zijn en kan in het laboratorium zelf worden ontwikkeld of in de handel worden verkregen. Standard Operating Procedures (SOP's) voor de RhE-methoden EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) en SkinEthic™ zijn beschikbaar (26)(27)(28). Het testen moet op de volgende wijze worden uitgevoerd:

Componenten van de RhE-Testmethode

Algemene voorwaarden

16. Om het epitheel op te bouwen moeten niet-getransformeerde humane keratinocyten worden gebruikt. Er moeten verschillende lagen levende epitheelcellen (basale laag, *stratum spinosum, stratum granulosum*) aanwezig zijn onder een functioneel *stratum corneum*. Het *stratum corneum* moet uit meerdere lagen bestaan en het vereiste lipideprofiel hebben, zodat een sterke en functionele barrière wordt gevormd waar cytotoxische markerstoffen, bv. natriumdodecylsulfaat (SDS) of Triton X-100, niet snel doorheen kunnen dringen. De barrièrefunctie kan beoordeeld worden door de concentratie te bepalen waarin een markerstof de levensvatbaarheid van het weefsel met 50 % doet dalen (IC_{50}) na een vaste blootstellingstijd, of door de blootstellingstijd te bepalen die nodig is om de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % te doen dalen (ET_{50}) bij aanbrenging van de markerstof in een bepaalde, vaste concentratie. De omsluitingseigenschappen van het model moeten voorkomen dat materiaal om het *stratum corneum* heen het levende weefsel kan bereiken. Dat zou een slecht model voor huidblootstelling opleveren. Het RhE-model mag niet verontreinigd zijn met bacteriën, virussen, mycoplasma of fungi.

▼M3

Functionele voorwaarden

Levensvatbaarheid

17. De levensvatbaarheid wordt bij voorkeur gekwantificeerd door middel van de MTT-test (25). Gebruikers van het RhE-model moeten waarborgen dat iedere gebruikte batch van het RhE-model voldoet aan gedefinieerde criteria voor de negatieve controle (NC). De optische densiteit (OD) van het extractieoplosmiddel alleen moet voldoende klein zijn, d.w.z. OD< 0,1. Een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) voor de OD-waarden van de negatieve controle (onder de voorwaarden van de huidirritatietestmethode) is vastgesteld door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model en de aanvaardbaarheidsbereiken voor de drie gevalideerde methoden worden in tabel 2 gegeven. Er dient te worden gedocumenteerd dat de weefsels die in de negatieve controle worden gebruikt gedurende de volledige blootstellingsperiode van de test in cultuur stabiel zijn (een vergelijkbare gemeten levensvatbaarheid opleveren).

Tabel 2

Aanvaardbaarheidsbereiken voor OD-waarden in negatieve controle

	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Barrièrefunctie

18. Het *stratum corneum* met de daarin aanwezige lipiden dient sterk genoeg te zijn om snelle penetratie van cytotoxische markerstoffen, bv. SDS of Triton X-100, te weerstaan, wat wordt beoordeeld aan de hand van de IC_{50} of ET_{50} (tabel 3).

Morfologie

19. Histologisch onderzoek van het RhE-model moet worden uitgevoerd om aan te tonen dat de structuur van het weefsel op die van de menselijke *epidermis* lijkt (onder meer een meerlagig *stratum corneum*).

Reproduceerbaarheid

20. De resultaten van de positieve controlestof (PC) en negatieve controles (NC) van de testmethode moeten reproduceerbaar zijn in de tijd.

Kwaliteitscontrole (QC)

21. De ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model moet garanderen en aantonen dat iedere batch van het gebruikte RhE-model voldoet aan gedefinieerde productievrijgavecriteria, waarvan die voor *levensvatbaarheid* (punt 17), *barrièrefunctie* (punt 18) en *morfologie* (punt 19) het meest relevant zijn. Deze gegevens moeten beschikbaar worden gesteld aan de gebruikers van de methode, zodat ze deze informatie kunnen opnemen in het testverslag. Een aanvaardbaarheidsbereik (boven- en ondergrens) voor de IC_{50} of de ET_{50} moet door de ontwikkelaar/leverancier van het RhE-model worden vastgesteld (of door de onderzoeker die een in eigen laboratorium ontwikkeld model gebruikt). Een betrouwbare voorspelling van irritatie-effecten kan uitsluitend worden gedaan op grond van resultaten verkregen met deugdelijk weefsel. Bij wijze van voorbeeld zijn in tabel 3 de aanvaardbaarheidsbereiken voor de drie gevalideerde methoden gegeven.

▼M3

Tabel 3

Voorbeelden van QC-criteria voor batchvrijgave

	Ondergrens aanvaardbaarheid	Bovengrens aanvaardbaarheid
EpiSkin™ (SM) (SDS-behandeling van 18 uur) (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 hr	ET_{50} = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 9,0 hr

Het aanbrengen van de test- en controlestoffen

22. Ten minste drie weefselmonsters moeten worden gebruikt voor iedere teststof en voor de controles in ieder experiment. Voor zowel vloeibare als vaste stoffen geldt dat er zo veel teststof moet worden aangebracht dat het *epidermisoppervlak* gelijkmatig bedekt is, d.w.z. ten minste 25 µL/cm^2 of 25 mg/cm^2 moet worden gebruikt, maar er mag geen oneindige dosis worden gebruikt. In het geval van vaste stoffen moet het *epidermisoppervlak* voor aanbrenging worden bevochtigd met gedeïoniseerd of gedestilleerd water, om voor een goed contact van de teststof met het *epidermisoppervlak* te zorgen. Indien mogelijk moeten vaste stoffen in de vorm van een fijn poeder worden getest. Aan het eind van de blootstellingsperiode moet de teststof zorgvuldig met waterige buffer of 0,9 % NaCl van het *epidermisoppervlak* worden gewassen. Afhankelijk van welke van de drie gevalideerde RhE-methoden wordt gebruikt, varieert de blootstellingsperiode van 15 tot 60 minuten, en de incubatietemperatuur van 20 tot 37 °C. Deze blootstellingsperioden en temperaturen zijn voor iedere RhE-methode geoptimaliseerd en vertegenwoordigen de verschillende intrinsieke eigenschappen van de methoden; zie voor details de Standard Operating Procedures (SOP's) voor de methoden (26)(27)(28).

23. In elk experiment moeten gelijktijdig uitgevoerde negatieve controles (NC) en positieve controles (PC) worden gebruikt om aan te tonen dat de levensvatbaarheid (met de NC), de barrièrefunctie en de resulterende gevoeligheid (met de PC) van de weefsels binnen een gedefinieerd historisch aanvaardbaarheidsbereik liggen. Als PC-stof wordt een waterige SDS-oplossing van 5 % aanbevolen. Als NC-stoffen zijn water of met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS) geschikt.

Metingen van de levensvatbaarheid van de cellen

24. Het belangrijkste aspect van de testprocedure is dat de levensvatbaarheid niet onmiddellijk na de blootstelling aan de teststoffen wordt gemeten, maar pas nadat de behandelde en gewassen weefsels voldoende lang zijn geïncubeerd in vers medium. Gedurende deze periode kan het weefsel herstellen van zwak irriterende effecten en vertonen zich duidelijke cytotoxische effecten. In de optimaliseringsfase van de test (11) (12) (13) (14) (15) is gebleken dat een na-incubatie van 42 uur optimaal is.

25. De MTT-omzettingstest is een gevalideerde kwantitatieve methode, en de aangewezen methode voor het meten van de levensvatbaarheid van de cellen binnen deze TM. De test werkt goed met geconstrueerd driedimensionaal weefsel. Het huidmonster wordt 3 uur in een MTT-oplossing met een geschikte concentratie (bv. 0,3 - 1 mg/mL) gelegd. Het neergeslagen blauwe formazanproduct wordt vervolgens met een oplosmiddel (bv. isopropanol, aangezuurde isopropanol) uit het weefsel geëxtraheerd, en de formazanconcentratie wordt bepaald door de OD te meten bij 570 nm, bij een bandbreedte van maximaal ongeveer 30 nm.

▼M3

26. De optische eigenschappen van de teststof of chemische effecten van de teststof op het MTT kunnen de test storen en tot een foutieve bepaling van de levensvatbaarheid leiden (omdat de teststof de kleurproductie kan voorkomen of omkeren, of juist veroorzaken). Dit kan gebeuren als een bepaalde teststof niet volledig van de huid wordt verwijderd door wassen, of als de stof in de *epidermis* penetreert. Als de teststof rechtstreekse effecten op het MTT heeft (MTT-reductie), zelf gekleurd is, of tijdens de weefselbehandeling gekleurd raakt, moeten er aanvullende controles worden uitgevoerd om storing van de levensvatbaarheidsmeting door de teststof te detecteren en daarvoor te corrigeren. Een gedetailleerde beschrijving van hoe rechtstreekse MTT-reductie kan worden gecorrigeerd, is te vinden in de SOP's voor de drie gevalideerde testmethoden (26)(27)(28).

Aanvaardbaarheidscriteria

27. Bij elke test met deugdelijke weefselbatches (zie paragraaf 21) geeft de OD die men meet voor met NC behandelde weefsels, per definitie de kwaliteit weer van de weefsels die het hele proces van verzending en ontvangst, evenals alle stappen uit het irritatietestprotocol hebben doorgemaakt. De OD-waarden van controles mogen niet onder historisch vastgestelde ondergrenzen komen. Evenzo komt het vermogen van de weefsels om op een irriterende stof te reageren onder de specifieke omstandigheden van de TM (26)(27)(28) tot uitdrukking in metingen met weefsels die met PC, d.w.z. 5 % waterige SDS-oplossing, zijn behandeld. Er moeten bijbehorende en geschikte grenzen voor de toegestane variabiliteit tussen weefselmonsters worden gedefinieerd (bv. als standaarddeviaties worden gebruikt moeten die binnen het eenzijdige tolerantie-interval van 95 % vallen dat berekend is op grond van historische gegevens). voor de standaarddeviaties van VRM < 18 %).

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

28. De met elke teststof verkregen OD-waarden kunnen worden gebruikt voor de berekening van een levensvatbaarheid die genormaliseerd is ten opzichte van NC, die op 100 % wordt gesteld. De drempelwaarde van de procentuele levensvatbaarheid van de cellen die als scheiding tussen irriterende en niet-geclassificeerde teststoffen fungeert, en de statistische procedure(s) die worden gebruikt om de resultaten te evalueren en irriterende stoffen te identificeren, moeten duidelijk worden gespecificeerd en gedocumenteerd, en de juistheid daarvan moet worden aangetoond. De drempelwaarden voor de voorspelling van irritatie zijn hieronder gegeven:

— de teststof wordt beschouwd als irriterend voor de huid overeenkomstig VN-GHS-/EU-CLP-categorie 2, indien de levensvatbaarheid van het weefsel na blootstelling en na-incubatie minder is dan of gelijk is aan (≤) 50 %;

— afhankelijk van het regelgevend kader waarin de resultaten van deze TM worden gebruikt, mag de teststof als niet irriterend voor de huid worden beschouwd overeenkomstig de VN-GHS-/EU-CLP-categorie „Geen categorie", indien de levensvatbaarheid van het weefsel na blootstelling en na-incubatie meer is dan (>) 50 %.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

29. Voor elk experiment moeten gegevens van individuele weefselmonsters (bv. de OD-waarden en de berekende procentuele levensvatbaarheid van de cellen voor elke teststof, met inbegrip van de indeling) in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens uit herhaalde experimenten, indien van toepassing. Daarnaast moeten voor elk experiment gemiddelden ± standaarddeviatie worden vermeld. Waargenomen interacties met het MTT-reagens en gekleurde teststoffen moeten voor alle geteste stoffen worden gemeld.

▼**M3**

Testverslag

30. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Test- en controlestoffen:

— de chemische naam of namen, zoals de CAS-naam en het CAS-nummer, alsmede de EG-naam en het EG-nummer, indien dit bekend is;

— de zuiverheid en de samenstelling van de stof (in gewichtsprocent(en));

— de fysisch-chemische eigenschappen die voor de uitvoering van het onderzoek relevant zijn (bv. fysische toestand, stabiliteit en vluchtigheid, pH, oplosbaarheid in water indien bekend);

— de behandeling van de test-/controlestoffen voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

— bewaaromstandigheden.

Motivering voor het gebruikte RhE-model en protocol

Testomstandigheden:

— het gebruikte celsysteem;

— volledige ondersteunende informatie over het specifieke gebruikte huidmodel, met inbegrip van de deugdelijkheid daarvan. Hieronder moet ten minste informatie zijn over:

  i) de levensvatbaarheid,

  ii) de barrièrefunctie,

  iii) de morfologie,

  iv) de reproduceerbaarheid en voorspelbaarheid,

  v) kwaliteitscontroles (QC) van het model;

— gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;

— de gebruikte testdoses, duur van de blootstelling en de na-incubatie;

— een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure;

— verwijzingen naar historische gegevens over het model. Deze moeten ten minste omvatten:

  i) de aanvaardbaarheid van de QC-gegevens met verwijzing naar historische batchgegevens,

  ii) de aanvaardbaarheid van de waarden voor de positieve en negatieve controles met verwijzing naar gemiddelde waarden en bereiken van negatieve en positieve controles;

— een beschrijving van de gebruikte evaluatiecriteria inclusief een motivering van de geselecteerde drempelwaarde(n) voor het voorspellingsmodel;

— verwijzingen naar historische controlegegevens;

▼M3

Resultaten:

— een tabel met de gegevens voor de individuele teststoffen voor ieder experiment en iedere meting van een weefselmonster;

— indicatie van de controles die zijn gebruikt voor rechtstreeks MTT-reducerende stoffen en/of gekleurde teststoffen;

— beschrijving van andere waargenomen effecten.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

LITERATUUR

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: [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. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 december 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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)? Available at: [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. Available at: [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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and 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. and 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. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and 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. Available at: [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). Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42 bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, OJ L 225, 21.8.2001, p. 1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and 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. and 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. and 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

Aanhangsel 1

Definities

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (9).

Levensvatbaarheid van cellen: een parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt gemeten, bv. het vermogen van cellulaire mitochondriale dehydrogenases om de vitale kleurstof MTT (3-(4,5-dimethylthiazool-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide, thiazolylblauw) te reduceren, dat, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal levende cellen en/of de vitaliteit van de cellen.

Concordantie: dit is een maat voor de prestaties van de testmethode voor testmethoden die een categoriale uitkomst geven en het is één aspect van relevantie. Deze term en de term „nauwkeurigheid" worden vaak door elkaar gebruikt; de term wordt gedefinieerd als het percentage van alle geteste chemische stoffen die correct als positief of negatief worden geclassificeerd (9).

ET_{50}*:* kan worden geraamd door vaststelling van de blootstellingstijd die nodig is om de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % te doen dalen bij aanbrenging van de markerstof in een bepaalde, vaste concentratie. Zie ook IC_{50}.

EU CLP (Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels): voert in de Europese Unie (EU) het GHS-systeem van de VN uit dat chemicaliën (stoffen en mengsels) indeelt en etiketteert (3).

GHS (mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

IC_{50}*:* kan worden geraamd door vaststelling van de concentratie waarin een markerstof de levensvatbaarheid van de weefsels met 50 % doet dalen (IC_{50}) na een vaste blootstellingstijd. Zie ook ET_{50}.

Oneindige dosis: hoeveelheid op de *epidermis* aangebrachte teststof die groter is dan de hoeveelheid die nodig is om het *epidermisoppervlak* volledig en gelijkmatig te bedekken.

„Me too"-test: een informele uitdrukking voor een testmethode die in structureel en functioneel opzicht vergelijkbaar is met een gevalideerde en geaccepteerde testmethode. Een dergelijke testmethode zou geschikt zijn voor inhaalvalidering. Dit is een alternatieve benaming voor gelijksoortige testmethode (9).

Prestatienormen: Normen, gebaseerd op een gevalideerde referentiemethode, die de basis vormen voor de beoordeling van de vergelijkbaarheid van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht gelijksoortige testmethode. Hieronder begrepen zijn: i) essentiële componenten van de testmethode; ii) een minimumlijst van referentiestoffen die zijn gekozen uit de stoffen die zijn gebruikt om de aanvaardbare prestaties van de gevalideerde testmethode aan te tonen; en iii) de nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidsniveaus die door de voorgestelde testmethode moeten worden gehaald wanneer ze worden beoordeeld aan de hand van de minimumlijst van referentiestoffen; deze waarden zijn gebaseerd op de waarden die voor de gevalideerde testmethode zijn verkregen (9).

▼**M3**

Referentiestoffen: chemische stoffen die gebruikt worden in het valideringsproces, waarvan de responsen in het in-vitro- of in-vivoreferentietestsysteem of de doelsoort reeds bekend zijn. Deze chemische stoffen moeten representatief zijn voor de klassen van chemische stoffen waarvoor de testmethode zal worden gebruikt en moeten het volledige bereik van responses bestrijken dat verwacht kan worden van de chemische stoffen waarvoor de test gebruikt zal worden, van sterk tot zwak, tot negatief. Het kan nodig zijn om verschillende reeksen referentiestoffen te gebruiken voor de verschillende fasen van het valideringsproces en voor verschillende testmethoden en -doeleinden (9).

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (9).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (9).

Vervangende test: een test, ontworpen ter vervanging van een voor de identificatie van gevaren en/of risicobeoordeling geaccepteerde en routinematig gebruikte test, waarvan is vastgesteld dat hij, in vergelijking met de geaccepteerde test, de gezondheid van mens of dier of het milieu, naargelang het geval, gelijke of betere bescherming biedt voor alle mogelijke testsituaties en chemische stoffen (9).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. De gevoeligheid is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

Huidirritatie: het ontstaan van reversibele weefselschade aan de huid na het aanbrengen van een testmateriaal gedurende maximaal vier uur. Huidirritatie is een lokaal optredende, niet-immunogene reactie die zich kort na stimulatie voordoet (29). Het voornaamste kenmerk is dat het een reversibel proces is waarbij inflammatoire reacties en de meeste klinische symptomen van ontstekinggerelateerde irritatie (erytheem, oedeem, jeuk en pijn) optreden.

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/inactieve teststoffen dat door de test correct wordt ingedeeld. De specificiteit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert, en is een belangrijke factor bij de beoordeling van de relevantie van een testmethode (9).

Trapsgewijze teststrategie: teststrategie waarbij opeenvolgende testmethoden worden gebruikt; de in elke volgende stap geselecteerde testmethoden worden gekozen op basis van de resultaten van de vorige teststap (9).

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

▼M3

Aanhangsel 2

Prestatienormen voor beoordeling van voorgestelde soortgelijke of gewijzigde *in vitro* testmethoden met gereconstrueerde humane *epidermis* (RhE) voor de bepaling van huidirritatie

INLEIDING

1. Prestatienormen zijn bedoeld om mee te delen op welke grondslag kan worden vastgesteld dat nieuwe testmethoden, zowel niet-generieke methoden (d.w.z. methoden die beschermd zijn door het auteursrecht, die een handelsmerk hebben en die geregistreerd zijn) als generieke methoden, bepaald kunnen worden teneinde voldoende nauwkeurigheid en betrouwbaarheid te bieden voor specifieke testdoeleinden. Deze prestatienormen, die gebaseerd zijn op gevalideerde en geaccepteerde testmethoden, kunnen worden gebruikt om de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid te beoordelen van andere soortgelijke methoden (informeel „me too"-tests genoemd) die gebaseerd zijn op soortgelijke wetenschappelijke principes en die hetzelfde biologische of toxische effect meten of voorspellen (9).

2. Voordat gewijzigde methoden (d.w.z. voorgestelde potentiële verbeteringen van een goedgekeurde testmethode) gebruikt kunnen worden, moet een evaluatie worden uitgevoerd ter bepaling van het effect van de voorgestelde wijzigingen op de prestaties van de test en de mate waarin dergelijke wijzigingen de informatie beïnvloeden die beschikbaar is voor de andere componenten van het valideringsproces. Afhankelijk van de aard van de voorgestelde wijzigingen en hun aantal, de gegenereerde gegevens en ondersteunende documentatie voor deze wijzigingen, moeten ze onderworpen worden aan hetzelfde valideringsproces als het voor een nieuwe test beschreven proces of, indien van toepassing, aan een beperkte beoordeling van betrouwbaarheid en relevantie met gebruikmaking van geaccepteerde prestatienormen (9).

3. Soortgelijke („me too") of gewijzigde methoden van elk van de drie gevalideerde methoden (EpiSkin™ (aangeduid als de Validated Reference Method (VRM), gevalideerde referentiemethode), EpiDerm™ SIT (EPI-200) en SkinEthic™ RHE) die zijn voorgesteld voor gebruik in het kader van deze testmethode, moeten worden beoordeeld om hun betrouwbaarheid en nauwkeurigheid na te gaan met behulp van chemische stoffen die het volledige bereik van Draize-irritatiescores bestrijken. Wanneer de voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methoden zijn beoordeeld aan de hand van de 20 aanbevolen referentiestoffen van de prestatienormen (tabel 1), moeten ze betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden opleveren die vergelijkbaar zijn met of beter zijn dan die van de VRM (tabel 2) (2) (16). De te behalen betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden worden vermeld in de punten 8 tot 12 van dit aanhangsel. De groep referentiestoffen omvat niet-geclassificeerde (VN GHS/EU CLP geen categorie) en geclassificeerde (VN GHS/EU CLP categorie 2) (1) stoffen, die verschillende chemische klassen vertegenwoordigen, zodat de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid (gevoeligheid, specificiteit en algemene nauwkeurigheid) van de voorgestelde testmethode vergeleken kunnen worden met die van de VRM. Zowel de betrouwbaarheid van de methode als het vermogen om irriterende stoffen van VN GHS/EU CLP categorie 2 correct te identificeren en, afhankelijk van het regelgevingskader waarvoor gegevens worden geproduceerd, ook het vermogen om stoffen van VN GHS/EU CLP geen categorie correct te identificeren, moeten worden bepaald voordat de methode kan worden gebruikt voor het testen van nieuwe stoffen.

4. Deze prestatienormen zijn gebaseerd op de prestatienormen van het EC-CEVMA (8), bijgewerkt volgens de VN-GHS- en EU-CLP-systemen betreffende indeling en etikettering (1) (3). De oorspronkelijke prestatienormen werden vastgesteld na voltooiing van het valideringsonderzoek (21) en werden gebaseerd op het classificatiesysteem van de EU als bepaald in Richtlijn 2001/59/EG van de Commissie van 6 augustus 2001 tot achtentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen ([1]). Omwille van de aanname van het VN-GHS-systeem voor indeling en etikettering in de EU (EU CLP) (3), die

([1]) PB L 225 van 21.8.2001, blz. 1

▼M3

plaatsvond tussen de voltooiing van het valideringsonderzoek en de voltooiing van deze TM, werden de pretatienormen bijgewerkt (8). Deze bijwerking betrof voornamelijk wijzigingen (i) in de reeks referentiestoffen voor de prestatienormen, en (ii) aan de vastgestelde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden (2) (23).

PRESTATIENORMEN VOOR IN-VITRO-RhE-TESTMETHODEN VOOR HUIDIRRITATIE

5. De prestatienormen omvatten de volgende drie elementen (9):

I) essentiële componenten van de testmethode;

II) minimumlijst van referentiestoffen;

III) vastgestelde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden.

I) **Essentiële componenten van de testmethode**

6. Deze bestaan uit essentiële structurele, functionele en procedurele componenten van een gevalideerde methode die moeten worden opgenomen in het protocol van een voorgestelde, in mechanistisch en functioneel opzicht soortgelijke of gewijzigde methode. Deze componenten omvatten unieke kenmerken van de methode, cruciale procedurele gegevens en metingen in het kader van de kwaliteitscontrole. Het vasthouden aan essentiële componenten van de testmethode zorgt ervoor dat een soortgelijke of gewijzigde voorgestelde methode uitgaat van dezelfde begrippen als de bijbehorende VRM (9). De essentiële componenten van de testmethode worden uitvoerig beschreven in de punten 16 tot 21 van de TM en het testen moet als volgt plaatsvinden:

— De algemene voorwaarden (punt 16)

— De functionele voorwaarden, namelijk:

— levensvatbaarheid (punt 17);

— barrièrefunctie (punt 18);

— morfologie (punt 19);

— reproduceerbaarheid (punt 20); en

— kwaliteitscontrole (punt 21).

II) **Minimumlijst van referentiestoffen**

7. Referentiestoffen worden gebruikt om na te gaan of de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid van een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methode, waarvan is aangetoond dat deze in structureel en functioneel opzicht voldoende gelijkt op de VRM, of die een kleine wijziging aan een van de drie gevalideerde methoden aanbrengt, vergelijkbaar zijn als of beter zijn dan de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid van de VRM (2) (8) (16) (23). De 20 aanbevolen referentiestoffen die in tabel 1 worden opgesomd, omvatten stoffen uit verschillende chemische klassen (d.w.z. chemische categorieën op basis van functionele groepen), die het volledige bereik van Draize-irritatiescores bestrijken (van niet-irriterend tot sterk irriterend). De in deze lijst opgenomen stoffen omvatten 10 stoffen ingedeeld bij VN GHS/EU-CLP categorie 2 en 10 niet in een categorie ingedeelde stoffen, waarvan er drie optioneel worden ingedeeld bij VN GHS categorie 3. In het kader van deze testmethode wordt de optionele categorie 3 beschouwd als „geen categorie”. De in tabel 1 opgenomen stoffen zijn geselecteerd uit de stoffen die worden gebruikt tijdens de optimalisatiefase die volgde op de prevalidering en in het valideringsonderzoek van de VRM, met betrekking tot hun

▼M3

chemische functionaliteit en fysische toestand (14) (18). Deze referentiestoffen vormen het minimumaantal stoffen dat gebruikt moet worden voor de evaluatie van de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van een voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methode, maar mogen niet worden gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe methoden. Wanneer een stof uit de lijst niet beschikbaar is, kan een andere stof waarvoor voldoende in-vivoreferentiegegevens beschikbaar zijn, worden gebruikt, voornamelijk een van de stoffen die zijn gebruikt in de optimaliseringsfase na de prevalidering of het valideringsonderzoek van de VRM. Indien gewenst, kan de minimumlijst van referentiestoffen worden uitgebreid met stoffen die andere chemische klassen vertegenwoordigen en waarvoor voldoende in-vivoreferentiegegevens beschikbaar zijn, om de nauwkeurigheid van de voorgestelde methode nader te evalueren.

Tabel 1

Minimumlijst van referentiestoffen voor de bepaling van de nauwkeurigheids- en betrouwbaarheidswaarden van soortgelijke of gewijzigde huidirritatiemethoden met gereconstrueerde humane epidermis (RhE) ([1])

Chemische stof	CAS-nummer	Fysische toestand	In-vivo-score	VRM in vitro cat.	VN GHS/EU CLP in vivo cat.
1-broom-4-chloorbutaan	6940-78-9	vloeibaar	0	cat. 2	geen cat.
diethylftalaat	84-66-2	vloeibaar	0	geen cat.	geen cat.
naftaleenazijnzuur	86-87-3	vast	0	geen cat.	geen cat.
allylfenoxyacetaat	7493-74-5	vloeibaar	0,3	geen cat.	geen cat.
isopropanol	67-63-0	vloeibaar	0,3	geen cat.	geen cat.
4-methylthiobenzaldehyde	3446-89-7	vloeibaar	1	cat. 2	geen cat.
methylstearaat	112-61-8	vast	1	geen cat.	geen cat.
heptylbutyraat	5870-93-9	vloeibaar	1,7	geen cat.	geen cat.
hexylsalicylaat	6259-76-3	vloeibaar	2	geen cat.	geen cat.
cinnamaldehyde	104-55-2	vloeibaar	2	cat. 2	geen cat. (*optionele cat. 3*) ([8])
1-decanol (([7])	*112-30-1*	*vloeibaar*	*2,3*	*cat. 2*	*cat. 2*
cyclamenaldehyde	103-95-7	vloeibaar	2,3	cat. 2	cat. 2
1-broomhexaan	111-25-1	vloeibaar	2,7	cat. 2	cat. 2
2-chloormethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	vast	2,7	cat. 2	cat. 2
di-n-propyldisulfide (([7])	*629-19-6*	*vloeibaar*	*3*	*geen cat.*	*cat. 2*
kaliumhydroxide (5 % water)	1310-58-3	vloeibaar	3	cat. 2	cat. 2
benzeenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	vloeibaar	3,3	cat. 2	cat. 2
1-methyl-3-fenyl-1-piperazine	5271-27-2	vast	3,3	cat. 2	cat. 2

▼M3

Chemische stof	CAS-nummer	Fysische toestand	In-vivo-score	VRM in vitro cat.	VN GHS/EU CLP in vivo cat.
heptanal	111-71-7	vloeibaar	3,4	cat. 2	cat. 2
tetrachloorethyleen	127-18-4	vloeibaar	4	cat. 2	cat. 2

([1]) De chemische stoffen zijn gekozen aan de hand van de volgende criteria: i) de stoffen zijn verkrijgbaar in de handel; ii) ze bestrijken het volledige bereik van Draize-irritatiescores (van niet-irriterend tot sterk irriterend); iii) de chemische structuur van de stoffen is goed omschreven; iv) ze zijn representatief voor de chemische functionaliteit die in het valideringsproces is gebruikt; en v) ze kennen geen extreem toxisch profiel (bv. carcinogeen of toxisch voor het voortplantingssysteem) en er zijn ook geen buitensporige verwijderingskosten aan verbonden.
([2]) Stoffen die irriterend zijn voor konijnen, maar waarvoor betrouwbaar bewijs is dat ze niet-irriterend zijn voor mensen (31) (32) (33).
([3]) Volgens de VN GHS, niet in de EU CLP ()

III) **Vastgestelde betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden**

8. Teneinde de betrouwbaarheid en relevantie vast te stellen van voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methoden die tussen laboratoria worden overgedragen, moeten de 20 referentiestoffen uit tabel 1 in ten minste drie laboratoria worden getest. Indien de voorgestelde methode echter in slechts één laboratorium zal worden gebruikt, is het niet nodig om de methode te valideren aan de hand van tests in verschillende laboratoria. Het is echter van essentieel belang dat dergelijke valideringsonderzoeken onafhankelijk worden beoordeeld door internationaal erkende valideringsinstanties, in overeenstemming met internationale richtsnoeren (9). In elk laboratorium dienen alle 20 referentiestoffen te worden getest in drie onafhankelijke experimenten met verschillende weefselbatches en op tijdstippen die voldoende ver uit elkaar liggen. Elk experiment moet bestaan uit minstens drie gelijktijdig geteste weefselmonsters voor elke opgenomen teststof, negatieve controle (NC) en positieve controle (PC).

9. De betrouwbaarheids- en nauwkeurigheidswaarden van de voorgestelde methode moeten worden berekend met inachtneming van alle vier de onderstaande criteria, waardoor de betrouwbaarheids- en relevantiewaarden op een vooraf gedefinieerde en consistente manier worden berekend:

   1. Alleen de gegevens van experimenten van volledige reeksen komen in aanmerking voor de berekening van de methode voor variabiliteit en voorspellingskracht (nauwkeurigheid) binnen een laboratorium en tussen laboratoria.

   2. In elk deelnemend laboratorium moet de uiteindelijke classificatie van elke referentiestof plaatsvinden op basis van de gemiddelde levensvatbaarheid over de verschillende experimenten van een volledige reeks.

   3. Alleen de gegevens verkregen voor stoffen met volledige reeksen experimenten in alle deelnemende laboratoria komen in aanmerking voor de berekening van de methode voor variabiliteit tussen laboratoria.

   4. De nauwkeurigheidswaarden moeten worden berekend op basis van de afzonderlijke laboratoriumvoorspellingen die de verschillende deelnemende laboratoria hebben verkregen voor de 20 referentiestoffen.

   In dit verband bestaat een **reeks experimenten** uit drie afzonderlijke experimenten van één laboratorium voor één teststof. Een **volledige reeks experimenten** is een reeks experimenten van één laboratorium voor één teststof waarbij de drie experimenten allemaal geldig zijn. Dit betekent dat één ongeldig experiment een volledige reeks van drie experimenten ongeldig maakt.

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid

10. Een beoordeling van intralaboratoriumreproduceerbaarheid zou een concordantie van ten minste (≥) 90 % moeten vertonen tussen de classificaties van de 20 referentiestoffen (VN GHS/EU CLP categorie 2 en geen categorie) die in verschillende, onafhankelijke experimenten binnen één laboratorium tot stand zijn gekomen.

▼M3

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid

11. Het is niet nodig de interlaboratoriumreproduceerbaarheid te beoordelen als de voorgestelde methode in slechts één laboratorium zal worden gebruikt; Voor methoden die tussen laboratoria moeten worden overgedragen, moet de concordantie van classificaties van de 20 referentiestoffen (VN GHS/EU CLP categorie 2 en geen categorie) die tot stand zijn gekomen in verschillende, onafhankelijke experimenten in bij voorkeur minimaal drie laboratoria, ten minste (≥) 80 % zijn.

Voorspellingskracht (nauwkeurigheid)

12. De nauwkeurigheid (gevoeligheid, specificiteit en algemene nauwkeurigheid) van de voorgestelde soortgelijke of gewijzigde methode moet vergelijkbaar zijn met of beter zijn dan die van de VRM, rekening houdend met aanvullende informatie betreffende de relevantie in de onderzochte soort (tabel 2). De gevoeligheid moet ten minste (≥) 80 % zijn (2) (8) (23). Een bijkomende specifieke beperking geldt echter voor de gevoeligheid van de voorgestelde in-vitromethode, omdat slechts twee in-vivostoffen van categorie 2, *1-decanol* en *di-n-propyldisulfide* door meer dan één deelnemend laboratorium verkeerdelijk ingedeeld kunnen worden als „geen categorie". De specificiteit moet ten minste (≥) 70 % zijn (2) (8) (23). Er zijn geen verdere beperkingen met betrekking tot de specificiteit van de voorgestelde in-vitromethode, d.w.z. een deelnemend laboratorium kan eender welke in-vivostof die tot geen categorie behoort, verkeerdelijk indelen zolang de uiteindelijke specificiteit van de testmethode binnen het aanvaardbare bereik blijft. De algemene nauwkeurigheid moet ten minste (≥) 75 % zijn (2) (8) (23). Hoewel de gevoeligheid van de VRM die is berekend voor de 20 referentiestoffen in tabel 1 gelijk is aan 90 %, wordt de vastgestelde minimale gevoeligheidswaarde die vereist is voor een soortgelijke of gewijzigde methode vastgesteld op 80 % opdat deze geldig zou worden beschouwd, aangezien zowel *1-decanol* (een grensgeval) en *di-n-propyldisulfide* (een valsnegatief van de VRM) erom bekend staan dat zij niet-irriterend zijn voor mensen (31) (32) (33), hoewel ze in de proef met konijnen als irriterende stoffen zijn aangemerkt. Aangezien RhE-modellen uitgaan van cellen van humane oorsprong, kunnen ze voorspellen dat deze stoffen niet-irriterend zijn (VN GHS/EU CLP geen categorie).

Tabel 2

Voorspellingswaarden voor gevoeligheid, specificiteit en algemene nauwkeurigheid die vereist zijn opdat soortgelijke of gewijzigde methoden geldig worden geacht.

Gevoeligheid	Specificiteit	Algemene nauwkeurigheid
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Acceptatiecriteria van het onderzoek

13. Het is mogelijk dat een of meer tests betreffende een of meer teststoffen niet voldoen aan de acceptatiecriteria van de test- en controlestoffen of dat zij om andere redenen niet aanvaardbaar zijn. Voor elke teststof mogen ten hoogste twee aanvullende tests worden verricht om ontbrekende gegevens aan te vullen („hertesten"). Omdat bij hertesten ook PC en NC gelijktijdig moeten worden getest, mogen met name voor elke teststof ten hoogste twee aanvullende experimenten worden verricht.

14. Het is denkbaar dat het minimumaantal van drie geldige experimenten voor elke geteste stof zelfs na hertesten niet wordt bereikt voor elke referentiestof in elk deelnemend laboratorium, wat leidt tot een onvolledige gegevensmatrix. In zulke gevallen worden de gegevensreeksen uitsluitend aanvaardbaar geacht als aan de volgende drie criteria is voldaan:

1. Op alle 20 referentiestoffen moet ten minste één volledige reeks experimenten zijn verricht.

▼**M3**

2. In elk van de ten minste drie deelnemende laboratoria moet ten minste 85 % van de reeksen experimenten volledig zijn (voor 20 stoffen; d.w.z. in één laboratorium zijn 3 ongeldige reeksen experimenten toegestaan).

3. Ten minste 90 % van alle mogelijke reeksen experimenten van ten minste drie laboratoria moet volledig zijn (voor 20 stoffen getest in 3 laboratoria; d.w.z. in totaal zijn 6 ongeldige reeksen experimenten toegestaan).

▼M7

B.47. BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY- (BCOP-) TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN I) CHEMISCHE STOFFEN DIE ERNSTIG OOGLETSEL VEROORZAKEN EN II) CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 437 (2013) van de OESO. De Bovine Corneal Opacity and Permeability- (BCOP-) testmethode werd in 2006 en 2010 geëvalueerd door het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), samen met het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM) en het Japans Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (JaCVAM) (1) (2). Bij de eerste evaluatie werd de BCOP-testmethode geëvalueerd op haar bruikbaarheid voor het identificeren van chemische stoffen (stoffen en mengsels) die ernstig oogletsel veroorzaken (1). Bij de tweede evaluatie werd de BCOP-testmethode geëvalueerd op haar bruikbaarheid voor het identificeren van chemische stoffen (stoffen en mengsels) waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (2). De BCOP-valideringsdatabank bevatte in totaal 113 stoffen en 100 mengsels (2) (3). Op basis van deze evaluaties en hun collegiale toetsing werd geconcludeerd dat de testmethode in staat is zowel chemische stoffen (zowel stoffen als mengsels) die ernstig oogletsel veroorzaken (categorie 1), als chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (4) en Verordening (EG) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening) ([1]), correct te identificeren. De testmethode werd daarom voor beide doeleinden bekrachtigd als wetenschappelijk geldig. Onder „ernstig oogletsel" wordt verstaan weefselbeschadiging in het oog of een ernstige fysieke gezichtsvermindering na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen niet volledig omkeerbaar is. Teststoffen die ernstig oogletsel veroorzaken worden ingedeeld in VN-GHS-categorie 1. Chemische stoffen die niet zijn geclassificeerd voor oogirritatie of ernstig oogletsel, zijn gedefinieerd als chemische stoffen die niet voldoen aan de voorwaarden voor indeling in VN-GHS-categorie 1 of 2 (2A of 2B), d.w.z. er wordt naar verwezen als VN-GHS Geen categorie. Deze testmethode omvat het aanbevolen gebruik en de beperkingen van de BCOP-testmethode op basis van de evaluaties ervan. De belangrijkste verschillen tussen de oorspronkelijke versie van 2009 en de bijgewerkte versie van 2013 van de OESO-testrichtlijn hebben betrekking op, maar zijn niet beperkt tot: het gebruik van de BCOP-testmethode voor de identificatie van chemische stoffen waarvoor classificatie volgens het GHS-systeem van de VN niet nodig is (punten 2 en 7); verduidelijkingen van de toepasselijkheid van de BCOP-testmethode voor het testen van alcoholen, ketonen en vaste stoffen (punten 6 en 7) en van stoffen en mengsels (punt 8); verduidelijkingen van de manier waarop oppervlakteactieve stoffen en oppervlakteactieve stoffen bevattende mengsels moeten worden getest (punt 28); bijwerkingen en verduidelijkingen met betrekking tot de positieve controles (punten 39 en 40); een bijwerking van de beslissingscriteria van de BCOP-testmethode (punt 47); een bijwerking van de acceptatiecriteria van het onderzoek (punt 48); een bijwerking van de elementen van het testverslag (punt 49); een bijwerking van aanhangsel 1 betreffende definities; de toevoeging van aanhangsel 2 betreffende de voorspellingskracht van de BCOP-testmethode onder verschillende classificatiesystemen; een bijwerking van aanhangsel 3 betreffende de lijst van stoffen voor de bekwaamheidstoetsing; en een bijwerking van aanhangsel 4 betreffende de BCOP-corneahouder (punt 1) en betreffende de opacitometer (punten 2 en 3).

([1]) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

▼M7

Momenteel wordt algemeen aangenomen dat er in de nabije toekomst geen in-vitrotest voor oogirritatie zal komen die de in-vivo-Draize-oogtest volledig zal kunnen vervangen om voorspellingen te doen voor het volledige bereik van irritatie voor verschillende klassen chemische stoffen. Strategische combinaties van meerdere alternatieve testmethoden binnen een (trapsgewijze) teststrategie kunnen de Draize-oogtest mogelijk echter wel vervangen (5). De top-downbenadering (5) is bedoeld om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof een hoog irritatiepotentieel heeft, terwijl de bottom-upbenadering (5) bedoeld is om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof onvoldoende oogirritatie zal veroorzaken om classificatie noodzakelijk te maken. De BCOP-testmethode is een in-vitrotestmethode die onder bepaalde voorwaarden en met specifieke beperkingen kan worden gebruikt voor de classificatie van gevaren voor de ogen en voor de etikettering van chemische stoffen. Hoewel de BCOP-testmethode niet geldig geacht wordt als zelfstandige vervanging van de in-vivo-oogtest bij konijnen, wordt de BCOP-testmethode aanbevolen als een eerste stap binnen een teststrategie zoals de top-downbenadering die door Scott et al. is voorgesteld (5) voor de identificatie van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken, d.w.z. voor chemische stoffen die moeten worden ingedeeld in VN-GHS-categorie 1, zonder verdere tests (4). De BCOP-testmethode wordt ook aanbevolen voor de identificatie van chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, zoals gedefinieerd door het GHS van de VN (VN-GHS Geen categorie) (4), binnen een teststrategie zoals de bottom-upbenadering (5). Voor een chemische stof waarvoor met de BCOP-testmethode niet wordt voorspeld dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt of dat classificatie voor oogirritatie/ernstig oogletsel niet nodig is, moeten echter aanvullende tests (in vitro en/of in vivo) worden uitgevoerd om tot een definitieve classificatie te komen.

Deze testmethode is bedoeld om de procedures te beschrijven die worden gebruikt om het mogelijke gevaar van een teststof voor de ogen te beoordelen aan de hand van het vermogen van deze chemische stof om troebelheid en verhoogde permeabiliteit in een afgezonderde boviene cornea te veroorzaken. Toxische effecten op de cornea worden als volgt gemeten: (i) verminderde lichttransmissie (troebelheid), en (ii) verhoogde doorlating van natriumfluoresceïne (permeabiliteit). De beoordelingen van de troebelheid en permeabiliteit van de cornea na blootstelling aan een teststof worden samengevoegd om een in-vitro-irritatiescore (IVIS) af te leiden, die gebruikt wordt om het irritatieniveau van de teststof te bepalen.

Definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

Deze testmethode is gebaseerd op het protocol van de BCOP-testmethode van het ICCVAM (6) (7), dat oorspronkelijk ontwikkeld werd op basis van informatie verkregen uit het protocol van het Institute for In Vitro Sciences (IIVS) en Protocol 124 van INVITTOX (8). Laatstgenoemde vertegenwoordigt het protocol dat gebruikt werd voor de door de Europese Gemeenschap gesteunde prevalideringsstudie die in 1997-1998 werd uitgevoerd. Beide protocollen waren gebaseerd op de BCOP-testmethode die voor het eerst werd beschreven door Gautheron et al. (9).

De BCOP-testmethode kan worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die ernstig oogletsel veroorzaken zoals gedefinieerd door het GHS van de VN, d.w.z. chemische stoffen die moeten worden ingedeeld in VN-GHS-categorie 1 (4). Wanneer de BCOP-testmethode voor dit doel wordt gebruikt, heeft zij een algemene nauwkeurigheid van 79 % (150/191), een percentage vals-positieve uitslagen van 25 % (32/126) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 14 % (9/65), vergeleken met gegevens van de in-vivo-oogtest bij konijnen die werden ingedeeld volgens het GHS-classificatiesysteem van de VN (3) (zie aanhangsel 2, tabel 1). Wanneer teststoffen binnen bepaalde chemische (d.w.z. alcoholen, ketonen) of fysische (d.w.z. vaste stoffen) klassen worden uitgesloten van de databank, heeft de BCOP-testmethode een algemene nauwkeurigheid van 85 % (111/131), een percentage vals-positieve uitslagen van 20 % (16/81) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 8 % (4/50) voor het GHS-classificatiesysteem van de VN (3). De mogelijke tekortkomingen van de BCOP-testmethode

▼M7

wanneer deze wordt gebruikt voor de identificatie van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS-categorie 1), zijn gebaseerd op de waargenomen hoge percentages vals-positieve uitslagen voor alcoholen en ketonen en de waargenomen hoge percentages vals-negatieve uitslagen voor vaste stoffen in de valideringsdatabank (1) (2) (3). Omdat echter niet voor alle alcoholen en ketonen sprake is van overpredictie door de BCOP-testmethode en sommige correct zijn voorspeld als VN-GHS-categorie 1, worden deze twee organische functionele groepen niet beschouwd als groepen die buiten het toepassingsgebied van de testmethode liggen. Het is aan de gebruiker van deze testmethode om te beslissen of een mogelijke overpredictie van een alcohol of keton kan worden geaccepteerd of dat verdere tests moeten worden uitgevoerd in een bewijskrachtbenadering. Wat betreft de percentages vals-negatieve uitslagen voor vaste stoffen, zij opgemerkt dat vaste stoffen kunnen leiden tot variabele en extreme blootstellingsomstandigheden in de in-vivo-Draize-test op oogirritatie, die irrelevante voorspellingen van het werkelijke irritatiepotentieel van deze stoffen kunnen opleveren (10). Er zij ook opgemerkt dat geen van de geïdentificeerde vals-negatieve uitslagen in de ICCVAM-valideringsdatabank (2) (3), in de context van de identificatie van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS-categorie 1), heeft geleid tot een IVIS $\leq$ 3, dat het criterium is dat wordt gebruikt om een teststof in te delen in VN-GHS Geen categorie. Vals-negatieve uitslagen van de BCOP-testmethode zijn in deze context bovendien niet kritiek, omdat alle teststoffen met 3 < IVIS $\leq$ 55 vervolgens worden getest met andere afdoend gevalideerde in-vitrotests, of als laatste optie bij konijnen, afhankelijk van de wettelijke voorschriften, met een sequentiële teststrategie in een op bewijskracht gebaseerde aanpak. Aangezien sommige vaste chemische stoffen door de BCOP-testmethode correct worden voorspeld als stoffen die behoren tot VN-GHS-categorie 1, wordt deze fysische toestand evenmin beschouwd als een toestand die buiten het toepassingsgebied van de testmethode ligt. Onderzoekers zouden kunnen overwegen deze testmethode te gebruiken voor alle typen chemische stoffen, waarbij een IVIS > 55 moet worden geaccepteerd als indicatief voor een respons die ernstig oogletsel veroorzaakt waardoor de teststof zonder verder tests moet worden ingedeeld in VN-GHS-categorie 1. Positieve resultaten die verkregen werden met alcoholen of ketonen, dienen echter, zoals reeds gezegd, met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd vanwege het risico van overpredictie.

De BCOP-testmethode kan ook worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die niet hoeven te worden ingedeeld voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS-classificatiesysteem (4). Wanneer de BCOP-testmethode voor dit doel wordt gebruikt, heeft zij een algemene nauwkeurigheid van 69 % (135/196), een percentage vals-positieve uitslagen van 69 % (61/89) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 0 % (0/107), vergeleken met gegevens van de in-vivo-oogtest bij konijnen die werden ingedeeld volgens het GHS-classificatiesysteem van de VN (3) (zie aanhangsel 2, tabel 2). Het verkregen percentage vals-negatieve uitslagen (in vivo in VN-GHS Geen categorie ingedeelde chemische stoffen die een IVIS > 3 opleveren, zie punt 47) is behoorlijk hoog, maar niet kritiek in deze context, omdat alle teststoffen met 3 < IVIS $\leq$ 55 vervolgens worden getest met andere afdoend gevalideerde in-vitrotests, of als laatste optie bij konijnen, afhankelijk van de wettelijke voorschriften, met een sequentiële teststrategie in een op bewijskracht gebaseerde aanpak. De BCOP-testmethode vertoont geen specifieke tekortkomingen voor het testen van alcoholen, ketonen en vaste stoffen, wanneer het doel van de test is chemische stoffen te identificeren waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS Geen categorie) (3). Onderzoekers zouden kunnen overwegen deze testmethode te gebruiken voor alle typen chemische stoffen, waarbij een negatief resultaat (IVIS $\leq$ 3) moet worden geaccepteerd als een indicatie dat classificatie niet nodig is (VN-GHS Geen categorie). Aangezien de BCOP-testmethode slechts 31 % van de chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, correct kan identificeren, zou deze testmethode niet de eerste keuze moeten zijn om een bottom-upbenadering mee te beginnen (5) als er andere gevalideerde en erkende in-vitromethoden met een vergelijkbare hoge gevoeligheid maar een hogere specificiteit beschikbaar zijn.

▼M7

De BCOP-valideringsdatabank bevatte in totaal 113 stoffen en 100 mengsels (2) (3). De BCOP-testmethode wordt daarom toepasbaar geacht voor het testen van zowel stoffen als mengsels.

De BCOP-testmethode wordt niet aanbevolen voor het identificeren van teststoffen die moeten worden ingedeeld als irriterend voor de ogen (VN-GHS-categorie 2 of categorie 2A) of teststoffen die moeten worden ingedeeld als licht irriterend voor de ogen (VN-GHS-categorie 2B), vanwege het aanzienlijke aantal chemische stoffen van VN-GHS-categorie 1 die te laag zijn ingedeeld in VN-GHS-categorie 2, 2A of 2B en het aanzienlijke aantal chemische stoffen van VN-GHS Geen categorie die te hoog zijn ingedeeld in VN-GHS-categorie 2, 2A of 2B (2) (3). Voor dit doel kan het nodig zijn verdere tests met een andere geschikte methode uit te voeren.

Bij alle procedures met boviene ogen en cornea's dienen de op de testinrichting toepasselijke regelgeving en procedures voor de behandeling van van dieren afkomstig materiaal te worden nageleefd, met inbegrip van maar niet beperkt tot weefsels en weefselvloeistoffen. Universele voorzorgsmaatregelen voor laboratoria zijn aanbevolen (11).

Hoewel de BCOP-testmethode geen rekening houdt met letsels van het ooglid en de iris, wordt wel gekeken naar effecten op het hoornvlies, die bij in-vivo-onderzoek de belangrijkste factor voor indeling zijn bij de VN-GHS-classificatie. De reversibiliteit van hoornvliesletsels op zichzelf kan niet worden beoordeeld met de BCOP-testmethode. Er is voorgesteld, op basis van studies op de ogen van konijnen, dat een beoordeling van de aanvankelijke diepte van het hoornvliesletsel kan worden gebruikt om een onderscheid te maken tussen reversibele en irreversibele effecten (12). Er is echter meer wetenschappelijke kennis nodig om te begrijpen hoe irreversibele effecten optreden die geen verband houden met de aanvankelijke diepte van het letsel. Tot slot kan de potentiële systemische toxiciteit die gepaard gaat met de blootstelling van het oog, met de BCOP-methode niet beoordeeld worden.

Deze testmethode zal periodiek worden bijgewerkt wanneer nieuwe informatie en gegevens in aanmerking worden genomen. Histopathologie kan bijvoorbeeld van nut zijn wanneer een vollediger karakterisering van schade aan de cornea nodig is. Zoals beschreven in OESO-leidraad nr. 160 (13), worden gebruikers aangemoedigd cornea's te bewaren en histopathologische specimens te prepareren die kunnen worden gebruikt om een databank en beslissingscriteria op te zetten die de nauwkeurigheid van deze testmethode verder kunnen verbeteren.

Elk laboratorium dat deze testmethode voor het eerst opstelt, dient gebruik te maken van de in aanhangsel 3 voorziene chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Een laboratorium kan deze chemische stoffen gebruiken om zijn technische bekwaamheden met betrekking tot het uitvoeren van de BCOP-testmethode aan te tonen, vooraleer het gegevens van de BCOP-testmethode indient voor de wettelijke gevarenclassificatie.

PRINCIPE VAN DE TEST

De BCOP-testmethode is een organotypisch model dat handhaving op korte termijn van de normale fysiologische en biochemische werking van de boviene cornea in vitro vereist. In deze testmethode wordt schade door de teststof beoordeeld door kwantitatieve metingen van de wijzigingen in de troebelheid en permeabiliteit van de cornea door gebruik van een opacitometer, respectievelijk een VIS-spectrofotometer. Beide metingen worden gebruikt om een IVIS te berekenen die gebruikt wordt om een in-vitro-irritatiegevarenclassificatie toe te kennen voor de voorspelling van de mogelijke in-vivo-oogirritatie door een teststof (zie beslissingscriteria in punt 48).

De BCOP-testmethode gebruikt afgezonderde cornea's van de ogen van pas geslacht vee. De troebelheid van cornea's wordt kwantitatief gemeten als de hoeveelheid lichttransmissie door de cornea. De permeabiliteit wordt kwantitatief gemeten als de hoeveelheid natriumfluoresceïne die door de volledige dikte van de cornea passeert, wat gemeten wordt in het medium dat zich bevindt in de achterkamer. Teststoffen worden aangebracht op de epitheellaag van de cornea

▼M7

door toevoeging aan de voorkamer van de corneahouder. Aanhangsel 4 geeft een beschrijving en een tekening van een corneahouder die wordt gebruikt in de BCOP-testmethode. Corneahouders zijn verkrijgbaar in de handel of kunnen zelf worden gemaakt.

Bron en ouderdom van runderogen en selectie van diersoorten

Vee dat naar de slachterij wordt gebracht, wordt meestal geslacht ofwel voor menselijke consumptie ofwel voor ander commercieel gebruik. Voor gebruik in de BCOP-testmethode worden enkel de cornea's van gezonde dieren die geschikt worden geacht voor de menselijke voedselketen in aanmerking genomen. Aangezien vee een grote verscheidenheid aan gewicht vertoont, afhankelijk van ras, leeftijd en geslacht, is er geen aanbevolen gewicht van het dier op het ogenblik van de slachting.

De afmetingen van de cornea's kunnen variëren als gevolg van het gebruik van de ogen van dieren van verschillende leeftijdscategorieën. Cornea's met een horizontale diameter van > 30,5 mm en een centrale corneale dikte (CCT) ≥ 1100 μm zijn meestal afkomstig van vee dat ouder is dan acht jaar, terwijl cornea's met een horizontale diameter van < 28,5 mm en een CCT < 900 μm meestal afkomstig zijn van vee dat jonger is dan vijf jaar (14). Om die reden worden doorgaans geen ogen gebruikt van vee dat ouder is dan 60 maanden. Ogen van vee jonger dan 12 maanden worden doorgaans niet gebruikt aangezien de ogen dan nog niet volgroeid zijn en de corneale dikte en diameter aanzienlijk kleiner zijn dan deze opgetekend voor ogen van volwassen vee. Het gebruik van cornea's van jonge dieren (d.w.z. 6 tot 12 maanden oud) is toegestaan aangezien hieraan voordelen verbonden zijn, zoals grotere beschikbaarheid, een nauwe leeftijdsgroep en minder gevaar met betrekking tot de blootstelling van werknemers aan boviene spongiforme encefalopathie (15). Aangezien nadere evaluatie van het effect van corneale grootte of dikte op de responsiviteit op corrosieve en irriterende chemische stoffen nuttig kan zijn, worden gebruikers aangemoedigd om de geschatte leeftijd en/of het gewicht van de dieren waarvan de cornea's in onderzoek worden gebruikt, te rapporteren.

Verzameling en vervoer van ogen naar het laboratorium

De ogen worden verzameld door werknemers van de slachterij. Om mechanische en andere vormen van oogschade te minimaliseren, dienen de ogen na de dood zo spoedig mogelijk verwijderd te worden en onmiddellijk na verwijdering en tijdens het vervoer gekoeld te worden. Om blootstelling van de ogen aan mogelijk irriterende chemische stoffen te voorkomen, mogen de werknemers van de slachterij geen detergent gebruiken bij het afspoelen van de kop van het dier.

De ogen dienen volledig te worden ondergedompeld in gekoelde Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) in een houder van aangepaste grootte en naar het laboratorium te worden vervoerd op een wijze die bederf en/of bacteriële contaminatie minimaliseert. Omdat de ogen worden verzameld tijdens het slachtproces, is het mogelijk dat ze blootgesteld worden aan bloed en andere biologische materialen zoals bacteriën en andere micro-organismen. Om die reden dient te worden verzekerd dat het risico op besmetting zo klein mogelijk is (bv. door de houder met de ogen tijdens de verzameling en het vervoer op nat ijs te plaatsen en door antibiotica toe te voegen aan de HBSS die gebruikt wordt om de ogen tijdens het vervoer te bewaren [bv. penicilline aan 100 IU/ml en streptomycine aan 100 μg/ml]).

Het tijdsinterval tussen de verzameling van de ogen en het gebruik van de cornea's in de BCOP-testmethode dient te worden beperkt tot een minimum (gewoonlijk verzameling en gebruik op dezelfde dag) en mag de onderzoeksresultaten niet in gevaar brengen. Deze resultaten zijn gebaseerd op de selectiecriteria voor de ogen alsook op de positieve en negatieve controleresponsen. Alle in het onderzoek gebruikte ogen dienen van dezelfde groep op een bepaalde dag verzamelde ogen te zijn.

Selectiecriteria voor in de BCOP-testmethode te gebruiken ogen

In het laboratorium aangekomen, worden de ogen zorgvuldig onderzocht voor gebreken zoals verhoogde troebelheid, krassen en neovascularisatie. Enkel cornea's zonder deze gebreken mogen worden gebruikt.

▼M7

De kwaliteit van elke cornea wordt ook op latere tijdstippen van het onderzoek beoordeeld. Cornea's met een troebelheid van meer dan zeven eenheden of equivalent voor de gebruikte opacitometer en corneahouders na een initiële equilibreerperiode van een uur, dienen te worden weggegooid (*OPMERKING:* de opacitometer dient te worden geijkt met troebelheidsnormen die worden gebruikt voor de vaststelling van de troebelheidseenheden, zie aanhangsel 4).

Elke behandelingsgroep (teststof, tegelijkertijd gemeten negatieve en positieve controles) bevat minstens drie ogen. Drie cornea's dienen te worden gebruikt voor de negatieve controle in de BCOP-testmethode. Aangezien alle cornea's uit de oogbol worden verwijderd en in de corneale kamers worden geplaatst, bestaat het risico voor artefacten door de behandeling van de individuele corneale troebelheids- en permeabiliteitswaarden (met inbegrip van de negatieve controle). Bovendien worden de troebelheids- en permeabiliteitswaarden van de cornea's van de negatieve controle gebruikt om de troebelheids- en permeabiliteitswaarden van de met de teststof behandelde cornea's en de cornea's van de positieve controle in de IVIS-berekeningen te corrigeren.

PROCEDURE

Voorbereiding van de ogen

Cornea's zonder gebreken worden voorzichtig losgemaakt van de harde oogrok met een rand van 2 tot 3 mm, die nodig zal zijn voor de opeenvolgende handelingen, zodat geen schade ontstaat aan het corneale epitheel en endotheel. De afzonderlijke cornea's worden in een speciaal ontworpen corneahouder geplaatst die bestaat uit een voorkamer en een achterkamer die de epitheellaag, respectievelijk de endotheellaag van de cornea raken. Beide kamers zijn overvloedig gevuld met voorverwarmde Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) zonder fenolrood (eerst de achterkamer) om de vorming van bellen te voorkomen. Het apparaat wordt dan geëquilibreerd op 32 ± 1 °C voor een periode van ten minste één uur om de cornea's met het medium te laten equilibreren en een normale metabolische activiteit te bereiken voor zover mogelijk (de temperatuur van het hoornvliesoppervlak in vivo is ongeveer 32 °C).

Na het equilibreren wordt nieuwe voorverwarmde EMEM zonder fenolrood toegevoegd aan beide kamers en worden referentietroebelheidswaarden gemeten in elke cornea. Cornea's die macroscopische weefselschade (bv. krassen, pigmentatie, neovascularisatie) of een troebelheid van meer dan zeven eenheden of equivalent voor de gebruikte opacitometer en corneahouders vertonen, worden verwijderd. Minstens drie cornea's worden geselecteerd als cornea's voor negatieve (of oplosmiddel-) controle. De resterende cornea's worden dan onderverdeeld in een behandelings- en een positieve-controlegroep.

Aangezien de warmtecapaciteit van water groter is dan die van lucht, geeft water stabielere temperatuuromstandigheden voor incubatie. Om die reden wordt het gebruik van een waterbad aanbevolen om de temperatuur van de corneahouder met inhoud op 32 ± 1 °C te houden. Luchtincubators kunnen echter ook worden gebruikt met de nodige voorzorgsmaatregelen voor behoud van de temperatuurstabiliteit (bv. door voorverwarming van de houders en media).

Aanbrenging van de teststof

Twee verschillende behandelingsprotocollen worden gebruikt, één voor vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen (vaste stoffen en vloeistoffen), en één voor niet-oppervlakteactieve vaste stoffen.

Vloeistoffen worden onverdund getest. Halfvaste stoffen, pasta's en was worden gewoonlijk getest op dezelfde wijze als vloeistoffen. Zuivere oppervlakteactieve stoffen worden getest met een concentratie van 10 % g/v in een oplossing van 0,9 % natriumchloride, gedistilleerd water of een ander oplosmiddel waarvan geweten is dat het geen nadelig effect heeft op het testsysteem. Alternatieve verdunningen dienen te worden gemotiveerd. Mengsels die oppervlakteactieve

▼M7

stoffen bevatten, kunnen onverdund of verdund tot een passende concentratie worden getest, afhankelijk van het relevante blootstellingsscenario in vivo. De geteste concentratie dient te worden gemotiveerd. Cornea's worden blootgesteld aan vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen voor een periode van 10 minuten. Andere blootstellingsperioden dienen op adequate wetenschappelijke manier te worden gemotiveerd. Zie aanhangsel 1 voor een definitie van een oppervlakteactieve stof en een oppervlakteactieve stof bevattend mengsel.

Niet-oppervlakteactieve stoffen worden gewoonlijk getest als oplossingen of suspensies met een concentratie van 20 % g/v in een oplossing van 0,9 % natriumchloride, gedistilleerd water of een ander oplosmiddel waarvan geweten is dat het geen nadelig effect heeft op het testsysteem. In bepaalde omstandigheden en met de juiste wetenschappelijke verklaring, kunnen vaste stoffen ook zuiver getest worden door rechtstreekse aanbrenging op het cornea-oppervlak aan de hand van de open-kamermethode (zie punt 32). Cornea's worden blootgesteld aan vaste stoffen voor een periode van vier uur, maar zoals bij vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen kunnen met de juiste wetenschappelijke motivering alternatieve blootstellingsperioden worden gebruikt.

Verschillende behandelingsmethoden kunnen worden gebruikt afhankelijk van de fysische aard en chemische kenmerken (bv. vaste stoffen, vloeistoffen, viskeuze of niet-viskeuze vloeistoffen) van de teststof. Essentieel is dat de teststof de hele epitheellaag bedekt en dat deze chemische stof voldoende wordt verwijderd tijdens het uitwassen. Een gesloten-kamermethode wordt gewoonlijk gebruikt voor niet-viskeuze tot licht-viskeuze vloeibare teststoffen, terwijl een open-kamermethode gewoonlijk wordt gebruikt voor semi-viskeuze en viskeuze vloeibare teststoffen en voor zuiver vaste stoffen.

In de gesloten-kamermethode wordt voldoende teststof (750 µl) om de epitheelzijde van de cornea te bedekken, ingebracht in de voorkamer via de doseergaten aan de bovenzijde van de kamer, waarna de gaten tijdens de blootstelling met kamerstoppen worden verzegeld. Het is belangrijk na te gaan dat elke cornea gedurende het juiste tijdsinterval is blootgesteld aan een teststof.

In de open-kamermethode worden de afsluitring van het glas en het glas van de voorkamer verwijderd voor de behandeling. De controle- of teststof (750 µl of voldoende teststof om de cornea volledig te bedekken) wordt rechtstreeks op de epitheellaag van de cornea aangebracht met een micropipet. Als een teststof moeilijk te pipetteren is, kan de teststof met drukcompensatie in een plunjerpipet worden gebracht om de dosistoediening te vergemakkelijken. De pipetpunt van de plunjerpipet wordt ingebracht in de verdeelpunt van de spuit, zodat het materiaal onder druk kan worden opgeladen in de verdeelpunt. Gelijktijdig worden de spuitplunjer ingedrukt en de pipetzuiger opgetrokken. Als er zich luchtbellen vormen in de pipetpunt, dan wordt de teststof verwijderd (uitgedreven) en het proces herhaald tot de punt gevuld is zonder luchtbellen. Indien nodig, kan een gewone spuit (zonder naald) worden gebruikt, aangezien hiermee een nauwkeurige hoeveelheid teststof kan worden gemeten en de teststof gemakkelijk op de epitheellaag van de cornea kan worden aangebracht. Na de dosering wordt het glas van de voorkamer teruggeplaatst om opnieuw een gesloten systeem te creëren.

Incubatie na blootstelling

Na de blootstellingsperiode worden de teststof, de negatieve-controle- of de positieve-controlestof verwijderd uit de voorkamer en wordt het epitheel ten minste drie keer (of tot geen spoor van de teststof meer kan worden waargenomen) gewassen met EMEM (dat fenolrood bevat). Een medium dat fenolrood bevat, wordt voor het uitwassen gebruikt aangezien verkleuring van het fenolrood kan worden gecontroleerd om de doeltreffendheid van het uitwassen van zuurrijke of alkalische teststoffen te bepalen. De cornea's worden meer dan drie keer gewassen als het fenolrood nog steeds verkleurt (geel of purper) of als er nog

▼M7

teststof zichtbaar is. Zodra het medium vrij is van teststof, krijgen de cornea's een laatste uitwassing met EMEM (zonder fenolrood). EMEM (zonder fenolrood) wordt gebruikt als laatste uitwassing om te verzekeren dat alle fenolrood uit de voorkamer is verwijderd voordat de troebelheid wordt gemeten. De voorkamer wordt dan gevuld met nieuwe EMEM zonder fenolrood.

Voor vloeistoffen of oppervlakteactieve stoffen worden de cornea's eerst uitgewassen en vervolgens geïncubeerd op 32 ± 1 °C voor een bijkomende periode van twee uur. Langere post-blootstellingstijd kan nuttig zijn in bepaalde omstandigheden en kan geval per geval worden beschouwd. Met vaste stoffen behandelde cornea's worden grondig uitgewassen na een blootstelling van vier uur maar hebben geen bijkomende incubatietijd nodig.

Aan het einde van de incubatietijd na blootstelling voor vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen en aan het einde van vier uur blootstelling voor niet-oppervlakteactieve vaste stoffen, worden de troebelheid en permeabiliteit van elke cornea opgetekend. Elke cornea wordt eveneens visueel geobserveerd en relevante waarnemingen worden opgetekend (bv. loskomend weefsel, overblijvende teststof, niet-uniforme troebelheidspatronen). Deze waarnemingen kunnen belangrijk zijn aangezien ze kunnen worden weerspiegeld door variaties in de metingen van de opacitometer.

Controlestoffen

In elk experiment worden gelijktijdig negatieve controles of controles met oplosmiddel/medium en positieve controles uitgevoerd.

Bij het testen van een vloeistof aan 100 %, wordt een gelijktijdige negatieve controle (bv. 0,9 % natriumchlorideoplossing of gedistilleerd water) in de BCOP-testmethode opgenomen, zodat niet-specifieke wijzigingen in het testsysteem kunnen worden opgespoord. Dit levert tevens een referentiekader voor de eindpunten van het onderzoek. Het verzekert ook dat de omstandigheden van het onderzoek niet op ongepaste wijze leiden tot een irriterende respons.

Bij het testen van een verdunde vloeistof, oppervlakteactieve stof of vaste stof, wordt gelijktijdig een controlegroep met een oplosmiddel/medium in de BCOP-testmethode opgenomen zodat niet-specifieke wijzigingen in het testsysteem kunnen worden opgespoord; dit levert tevens een referentiekader voor de eindpunten van het onderzoek. Er kunnen enkel oplosmiddelen/media worden gebruikt waarvan geweten is dat ze geen nadelig effect op het testsysteem hebben.

In elk experiment wordt een chemische stof waarvan bekend is dat deze een positieve reactie geeft, opgenomen als gelijktijdige positieve controle om de integriteit van het testsysteem te verifiëren en na te gaan dat het experiment juist is uitgevoerd. Om te verzekeren dat de variabiliteit in de positieve-controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de irriterende respons niet buitensporig zijn.

Voorbeelden van positieve controles voor vloeibare teststoffen zijn 100 % ethanol of 100 % dimethylformamide. Een voorbeeld van een positieve controle voor vaste teststoffen is een concentratie van 20 % g/v imidazool in een 0,9 % natriumchlorideoplossing.

IJkstoffen zijn nuttig voor de beoordeling van potentiële oogirritatie bij onbekende chemische stoffen uit een specifieke chemische klasse of productklasse of voor de beoordeling van potentiële relatieve irritatie van een voor het oog irriterende stof binnen een reeks van irritatieresponsen.

Gemeten eindpunten

De troebelheid wordt gemeten door de hoeveelheid lichttransmissie door de cornea. De corneale troebelheid wordt kwantitatief gemeten met behulp van een opacitometer. De resultaten zijn troebelheidswaarden op een continue schaal.

De permeabiliteit wordt bepaald door de hoeveelheid natriumfluoresceïne die alle corneale cellagen penetreert (d.w.z. van de epitheellaag aan het buitenste corneale oppervlak tot de endotheellaag aan de binnenkant). Eén ml natriumfluoresceïneoplossing (4 of 5 mg/ml voor vloeistoffen en oppervlakteactieve stoffen respectievelijk niet-oppervlakteactieve vaste stoffen) wordt toegevoegd aan de voorkamer van de corneahouder, die in verbinding staat met de epitheelzijde van de cornea, terwijl de achterkamer, die in verbinding staat met de endotheelzijde van de cornea, gevuld is met nieuwe EMEM. De houder wordt dan gedurende

▼M7

90 ± 5 min op 32 ± 1 °C geïncubeerd in een horizontale positie. De hoeveelheid natriumfluoresceïne die doordringt naar de achterkamer wordt kwantitatief gemeten met behulp van UV/VIS-spectrofotometrie. Op 490 nm beoordeelde spectrofotometrische metingen worden opgetekend als optische dichtheid (OD490) of extinctiewaarden, die gemeten worden op een continue schaal. De permeabiliteitswaarden van fluoresceïne worden bepaald aan de hand van de OD490-waarden op basis van een VIS-spectrofotometer met een standaardweglengte van 1 cm.

Ook kan een 96-wells-microtiterplaatlezer gebruikt worden op voorwaarde dat (i) het lineaire bereik van de plaatlezer voor de vaststelling van fluoresceïne OD490-waarden kan worden vastgesteld; en (ii) de juiste hoeveelheid fluoresceïnemonsters in de 96-wells-plaat wordt gebruikt om OD490-waarden te verkrijgen die gelijk zijn aan een standaardweglengte van 1 cm (hiervoor kan een volledige well noodzakelijk zijn [meestal 360 µl]).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de gegevens

Zodra de troebelheids- en gemiddelde permeabiliteits-(OD_{490})-waarden gecorrigeerd zijn voor achtergrondtroebelheid en de permeabiliteits-OD490-waarden van de negatieve controle, dienen de gemiddelde troebelheids- en permeabiliteits-OD_{490}-waarden voor elke behandelingsgroep als volgt samengevoegd te worden in een empirisch afgeleide formule om voor elke behandelingsgroep een in-vitro-irritatiescore (IVIS) te berekenen:

IVIS = gemiddelde troebelheidswaarde + (15 x gemiddelde permeabiliteits-OD_{490}-waarde)

Sina et al. (16) schreef dat deze formule afgeleid was tijdens onderzoeken in eigen laboratorium en interlaboratoriumonderzoeken. De gegevens die gegenereerd werden voor een reeks van 36 verbindingen in een multilaboratoriumonderzoek werden onderworpen aan een multivariate analyse om de best passende verhouding tussen in-vivo- en in-vitrogegevens te bepalen. Wetenschappers van twee verschillende bedrijven hebben deze analyse uitgevoerd en kwamen op ongeveer identieke verhoudingen uit.

De troebelheids- en permeabiliteitswaarden dienen ook onafhankelijk van elkaar beoordeeld te worden om te bepalen of een teststof corrosiviteit of hevige irritatie opwekt via slechts een van de twee eindpunten (zie beslissingscriteria).

Beslissingscriteria

De IVIS-drempelwaarden voor de identificatie van teststoffen als chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS-categorie 1) en teststoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is (VN-GHS Geen categorie) zijn hieronder gegeven:

IVIS	VN-GHS
≤ 3	Geen categorie
> 3; ≤ 55	Voorspelling onmogelijk
> 55	Categorie 1

Acceptatiecriteria van het onderzoek

Een test wordt als aanvaardbaar beschouwd als de positieve controle een IVIS oplevert die tussen twee standaardafwijkingen van het huidige historische gemiddelde valt, dat minstens om de drie maanden wordt bijgewerkt of telkens als een aanvaardbare test wordt uitgevoerd in laboratoria waar op onregelmatige basis tests worden uitgevoerd (d.w.z. minder dan een keer per maand). De negatieve-controlerespons of controlerespons met oplosmiddel/medium dient te resulteren in troebelheids- en permeabiliteitswaarden die lager zijn dan de vastgestelde bovengrenswaarden voor achtergrondtroebelheid en permeabiliteit voor boviene cornea's die werden gebruikt voor de negatieve controle respectievelijk

▼M7

oplosmiddel/mediumcontrole. Eén test bestaande uit ten minste drie cornea's zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien de indeling ervan ondubbelzinnig is. Echter, bij grensgevallen in de eerste test moet een tweede test worden overwogen (maar deze is niet noodzakelijkerwijs vereist), evenals een derde test in geval van niet-concordante gemiddelde IVIS- resultaten tussen de eerste twee tests. In deze context wordt een resultaat in de eerste test als grensgeval beschouwd als de voorspellingen van de 3 cornea's niet concordant waren, in de zin dat:

— 2 van de 3 cornea's gaven voorspellingen die niet concordant waren met het gemiddelde van alle 3 cornea's, OF,

— 1 van de 3 cornea's gaf een voorspelling die niet concordant was met het gemiddelde van alle 3 cornea's, EN het niet-concordante resultaat lag > 10 IVIS-eenheden van de drempelwaarde van 55.

— Als de herhaalde test de voorspelling van de eerste test bevestigt (op basis van de gemiddelde IVIS-waarde), kan zonder verdere tests een definitief besluit worden genomen. Als de herhaalde test een voorspelling oplevert die niet-concordant is met die van de eerste test (op basis van de gemiddelde IVIS-waarde), moet een derde en laatste test worden uitgevoerd om de onduidelijkheid weg te nemen en de teststof te classificeren. Het kan toelaatbaar zijn af te zien van verdere tests voor de classificatie en etikettering indien een of meer van de tests een indeling in VN-GHS-categorie 1 voorspelt.

Testverslag

Het testverslag dient de volgende informatie te bevatten, indien relevant voor het voeren van het onderzoek:

Test- en controlestoffen

— Chemische benaming(en) zoals de gestructureerde benaming gebruikt door de Chemical Abstracts Service (CAS), gevolgd door andere benamingen indien bekend; het CAS-registratienummer (RN), indien bekend;

— Zuiverheid en samenstelling van de test-/controlestof (in percentage(s) per gewicht) voor zover deze informatie beschikbaar is;

— Fysisch-chemische eigenschappen zoals de fysische staat, vluchtigheid, pH, stabiliteit, scheikundige klasse, oplosbaarheid in water, die van belang zijn voor het voeren van het onderzoek;

— De behandeling van de test-/controlestoffen voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

— Stabiliteit, indien bekend.

Informatie met betrekking tot de opdrachtgever en de testinstallatie

— Naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de directeur van het onderzoek.

Omstandigheden van de testmethode

— Gebruikte opacitometer (bv. model en specificaties) en instellingen van het instrument;

— Kalibratie-informatie voor apparaten die zijn gebruikt voor het meten van de troebelheid en de permeabiliteit (bv. opacitometer en spectrofotometer) ter verzekering van de lineariteit van de metingen;

— Type gebruikte corneahouders (bv. model en specificaties);

▼M7

— Beschrijving van andere gebruikte apparatuur;

— De gebruikte procedure ter verzekering van de integriteit (d.w.z. nauwkeurigheid en betrouwbaarheid) van de testmethode in de tijd (bv. periodiek testen van stoffen voor bekwaamheidstoetsing).

Criteria voor aanvaardbare test

— Aanvaardbare tegelijkertijd gemeten positieve en negatieve controlebereiken gebaseerd op historische gegevens;

— Indien van toepassing, aanvaardbare tegelijkertijd gemeten referentiecontrolebereiken gebaseerd op historische gegevens.

Verzameling en voorbereiding van de ogen

— Identificatie van de herkomst van de ogen (d.w.z. de plaats waar ze verzameld werden);

— Corneale diameter als maat voor de leeftijd van het dier van herkomst en voor de geschiktheid van het onderzoek;

— Opslag- en transportomstandigheden van de ogen (bv. datum en tijdstip van de verzameling, tijdsinterval tot aan de aanvang van de tests, transportmedia en temperatuuromstandigheden, eventueel gebruikte antibiotica);

— Voorbereiding en aanbrenging van de boviene cornea's met inbegrip van verklaringen betreffende hun kwaliteit, temperatuur van de corneahouders, en criteria voor de selectie van de voor de tests gebruikte cornea's.

Testprocedure

— Aantal gebruikte duplo's;

— Identificatiegegevens van de gebruikte negatieve en positieve controles (indien van toepassing, ook het oplosmiddel en de referentiecontroles);

— Gebruikte concentratie(s) van de teststof, aanbrenging, blootstellingstijd en incubatietijd na blootstelling;

— Een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;

— Een beschrijving van de gebruikte criteria voor de aanvaardbaarheid van tests;

— Een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure;

— Een beschrijving van de gebruikte beslissingscriteria.

Resultaten

— Tabel met de gegevens van individuele testmonsters (bv. troebelheid en OD490-waarden en berekende IVIS voor de teststof en de positieve, negatieve en referentiecontroles [indien inbegrepen], weergegeven in tabelvorm, met inbegrip van gegevens van herhaalde experimenten met identieke monsters indien van toepassing, en gemiddelde ± de standaardafwijking voor elk experiment);

— Een beschrijving van andere waargenomen effecten;

— De afgeleide in-vitro VN-GHS-classificatie, indien van toepassing.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

▼M7

LITERATUUR

(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 nr. 07-4517. Beschikbaar op: 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 nr. 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Beschikbaar op: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OESO (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, nr. 189, OESO, Parijs.

(4) VN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York en Genève: Verenigde Naties. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

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

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication nr. 07-4517. Beschikbaar op: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication nr. 10-7553A. Beschikbaar op: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

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

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

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

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Beschikbaar op: [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) OESO (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. Vastgesteld op 25 oktober 2011. Parijs: Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling.

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

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

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

(17) Hoofdstuk B.5 van deze bijlage, Acute oogirritatie/-corrosie.

(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 nr. 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Beschikbaar op: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OESO (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Nr. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Beschikbaar op: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid.

Bewijskracht(proces): het proces waarbij de sterke en zwakke punten van verschillende gegevens worden onderzocht bij het komen tot en ondersteunen van een conclusie met betrekking tot het gevarenpotentieel van een teststof.

Bottom-upbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een chemische stof waarvan wordt vermoed dat classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen waarvoor classificatie niet nodig is (negatief resultaat) van andere chemische stoffen (positief resultaat).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Cornea: het doorschijnende gedeelte van het voorste deel van de oogbal dat de iris en pupil bedekt en licht naar binnen toelaat.

Corneale permeabiliteit: kwantitatieve meting van de schade aan het hoornvliesepitheel door bepaling van de hoeveelheid natriumfluoresceïne die door alle corneale cellagen dringt.

Corneale troebelheid: meting van de mate van troebelheid van de cornea na blootstelling aan een teststof. Verhoogde corneale troebelheid is een aanwijzing voor schade aan de cornea. De troebelheid kan subjectief worden beoordeeld aan de hand van bijvoorbeeld de Draize-oogtest bij konijnen of objectief met een instrument zoals een „opacitometer”.

Ernstig oogletsel: veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging. Verwisselbaar met „Irreversibele effecten op ogen” en met „VN-GHS-categorie 1” (4).

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Gevalideerde testmethode: een testmethode waarvoor valideringsstudies werden gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er dient te worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (4).

Ijkstof: een chemische stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: (i) (een) constante en betrouwbare bron(nen); (ii) een structurele en functionele gelijkenis met de klasse chemische stoffen die getest wordt; (iii) bekende fysische-chemische kenmerken; (iv) ondersteunende gegevens over bekende effecten en (v) een bekende werkzaamheid binnen het bereik van de gewenste respons.

In-vitro-irritatiescore (IVIS): een empirisch afgeleide formule die gebruikt wordt in de BCOP-testmethode waarbij de gemiddelde troebelheid en de gemiddelde permeabiliteit voor elke behandelingsgroep gecombineerd worden in één enkele in-vitroscore voor elke behandelingsgroep. IVIS = gemiddelde troebelheidswaarde + (15 x gemiddelde permeabiliteitswaarde).

▼M7

Irreversibele effecten op ogen: zie „ernstig oogletsel”.

Medium-/oplosmiddelcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of medium, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of medium opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten negatieve controle, toont het ook aan of het oplosmiddel of medium met het testsysteem interageert.

Mengsel: een mengsel of een oplossing bestaande uit twee of meer stoffen waarin deze stoffen geen reactie met elkaar aangaan (4).

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie”. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt.

Negatieve controle: een onbehandeld monster dat alle bestanddelen van een testsysteem bevat. Dit monster wordt tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt om te bepalen of het oplosmiddel interageert met het testsysteem.

Niet ingedeeld: chemische stoffen die niet zijn geclassificeerd voor oogirritatie (VN-GHS-categorie 2, 2A of 2B) of ernstig oogletsel (VN-GHS-categorie 1). Verwisselbaar met „VN-GHS Geen categorie”.

Oogirritatie: het ontstaan van veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig reversibel zijn. Verwisselbaar met „Reversibele effecten op ogen” en met „VN-GHS-categorie 2” (4).

Opacitometer: een instrument dat gebruikt wordt om de „corneale troebelheid” te meten door kwantitatieve beoordeling van lichttransmissie door de cornea. Gewoonlijk bestaat dit instrument uit twee compartimenten, elk met een eigen lichtbron en fotocel. Eén compartiment wordt gebruikt voor de behandelde cornea, terwijl het andere wordt gebruikt voor de ijking en de nulinstelling van het instrument. Licht van een halogeenlamp wordt door een controlebestanddeel (lege kamer zonder vensters of vloeistof) naar een fotocel gestuurd en vergeleken met het licht dat door een experimenteel bestanddeel, dat de kamer met de cornea bevat, naar een fotocel wordt gestuurd. Het verschil in lichttransmissie van de fotocellen wordt vergeleken en er wordt een numerieke troebelheidswaarde weergegeven op een digitaal scherm.

Oppervlakteactieve stof: ook genoemd „agens dat inwerkt op de oppervlakte”; dit is een stof, zoals een detergent, die de oppervlaktespanning van een vloeistof kan verlagen en het zo mogelijk maakt dat de vloeistof gaat schuimen of in vaste stoffen doordringt; ook bekend als een bevochtigingsmiddel.

Oppervlakteactieve stof bevattend mengsel: in de context van deze testmethode, een mengsel dat een of meer oppervlakteactieve stoffen bevat in een uiteindelijke concentratie van > 5 %.

▼M7

Percentage vals-negatieve uitslagen: het percentage van alle positieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Percentage vals-positieve uitslagen: het percentage van alle negatieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een chemische stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positieve-controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Reversibele effecten op ogen: zie „oogirritatie”.

Stof: chemische elementen en verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het product en alle onzuiverheden ten gevolge van het productieprocédé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd (4).

Top-downbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een chemische stof waarvan wordt vermoed dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (positief resultaat) van andere chemische stoffen (negatief resultaat).

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Trapsgewijze teststrategie: een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende tests niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze sequentiële testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

VN-GHS-categorie 1: zie „ernstig oogletsel”.

VN-GHS-categorie 2: zie „oogirritatie”.

VN-GHS Geen categorie: chemische stoffen die niet voldoen aan de voorwaarden voor indeling in VN-GHS-categorie 1 of 2 (2A of 2B). Verwisselbaar met „Niet ingedeeld”.

▼M7

Aanhangsel 2

VOORSPELLINGSKRACHT VAN DE BCOP-TESTMETHODE

Tabel 1

Voorspellingskracht van de BCOP-testmethode voor de identificatie van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken [VN-GHS-/EU-CLP-categorie 1 vs Niet categorie 1 (cat. 2 + Geen cat.); VS-EPA-klasse I vs Niet klasse I (klasse II + klasse III + klasse IV)]

Classificatie-systeem	Aant.	Nauwkeurigheid		Gevoeligheid		Vals-negatief		Specificiteit		Vals-positief	
		%	Aant.	%	Aant.	%	Aant.	%	Aant.	%	Aant.
VN-GHS EU-CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
VS-EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabel 2

Voorspellingskracht van de BCOP-testmethode voor de identificatie van chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is („niet irriterende stoffen”) [VN-GHS/ EU-CLP Geen categorie vs Niet Geen categorie (cat. 1 + cat. 2); VS-EPA-klasse IV vs Niet klasse IV (klasse I + klasse II + klasse III)]

Classificatie-systeem	Aant.	Nauwkeurigheid		Gevoeligheid		Vals-negatief		Specificiteit		Vals-positief	
		%	Aant.	%	Aant.	%	Aant.	%	Aant.	%	Aant.
VN-GHS EU-CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
VS-EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Aanhangsel 3

CHEMISCHE STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING VOOR DE BCOP-TESTMETHODE

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van deze testmethode, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte identificatie van de gevarenclassificatie voor de ogen van de 13 chemische stoffen die in tabel 1 worden aangeraden. Deze chemische stoffen werden geselecteerd om het bereik van responsen voor gevaren voor de ogen te vertegenwoordigen op basis van resultaten in de in-vivo-oogtest bij konijnen (TG 405) (17) en het VN-GHS-classificatiesysteem (d.w.z. categorieën 1, 2A, 2B, of Niet ingedeeld) (4). Andere selectiecriteria waren dat chemische stoffen in de handel verkrijgbaar zijn, dat er in-vivo-referentiegegevens van hoge kwaliteit beschikbaar zijn, en dat er in-vitro-gegevens van hoge kwaliteit beschikbaar zijn voor de BCOP-testmethode. Er zijn referentiegegevens beschikbaar in het Streamlined Summary Document (3) en in het ICCVAM Background Review Document voor de BCOP-testmethode (2) (18).

Tabel 1

Aanbevolen chemische stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met de BCOP-testmethode

Chemische stof	CAS RN	Chemische klasse (1)	Fysische vorm	In-vivoclassificatie (2)	BCOP-classificatie
Benzalkoniumchloride (5 %)	8001-54-5	Onium-verbinding	Vloeistof	Categorie 1	Categorie 1
Chloorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	Vaste stof	Categorie 1	Categorie 1
Dibenzoyl-L-wijnsteenzuur	2743-38-6	Carbonzuur, ester	Vaste stof	Categorie 1	Categorie 1
Imidazool	288-32-4	Heterocyclisch	Vaste stof	Categorie 1	Categorie 1
Trichloorazijnzuur (30 %)	76-03-9	Carbonzuur	Vloeistof	Categorie 1	Categorie 1
2,6-Dichloorbenzoylchloride	4659-45-4	Acylhalogenide	Vloeistof	Categorie 2A	Nauwkeurige/betrouwbare voorspelling onmogelijk.
Ethyl-2-methylacetoacetaat	609-14-3	Keton, ester	Vloeistof	Categorie 2B	Nauwkeurige/betrouwbare voorspelling onmogelijk.
Ammoniumnitraat	6484-52-2	Anorganisch zout	Vaste stof	Categorie 2 (3)	Nauwkeurige/betrouwbare voorspelling onmogelijk.
EDTA, dikaliumzout	25102-12-9	Amine, carbonzuur (zout)	Vaste stof	Niet ingedeeld	Niet ingedeeld
Tween 20	9005-64-5	Ester, polyether	Vloeistof	Niet ingedeeld	Niet ingedeeld
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Acylhalogenide	Vaste stof	Niet ingedeeld	Niet ingedeeld
Fenylbutazon	50-33-9	Heterocyclisch	Vaste stof	Niet ingedeeld	Niet ingedeeld

▼M7

Chemische stof	CAS RN	Chemische klasse (1)	Fysische vorm	In-vivoclassificatie (2)	BCOP-classificatie
Polyoxyethyleen-23-laurylether (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alcohol	Vloeistof	Niet ingedeeld	Niet ingedeeld

Afkortingen: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number.

(1) Scheikundige klassen werden toegekend aan elke teststof aan de hand van een standaard classificatieschema, gebaseerd op het classificatiesysteem National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (beschikbaar op http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Gebaseerd op de resultaten van de in-vivo-oogtest op konijnen (OESO TG 405) (17) en aan de hand van de VN-GHS (4).

(3) Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 1 van 3 of 2 van 3 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. Het in-vivo-onderzoek omvatte 3 dieren. Alle eindpunten behalve roodheid van de conjunctiva in één dier herstelden tot een score van nul op dag 7 of eerder. Het ene dier dat op dag 7 niet volledig was hersteld, had een score van 1 (op dag 7) voor de roodheid van de conjunctiva, die volledig was hersteld op dag 10.

▼M7

Aanhangsel 4

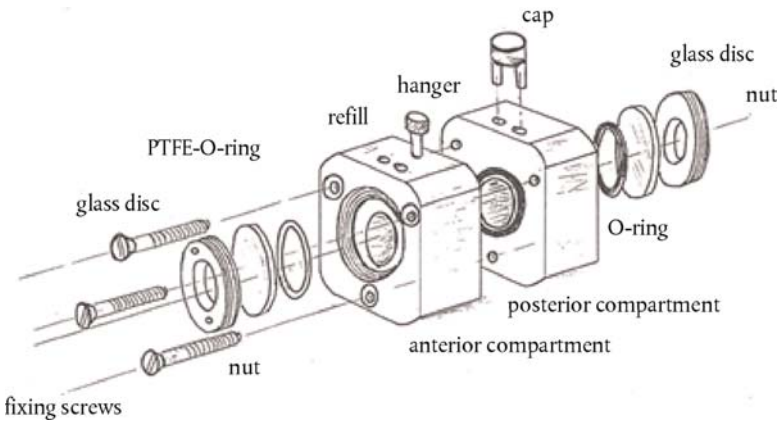
DE BCOP-CORNEAHOUDER

De BCOP-corneahouders zijn gemaakt van inert materiaal (bv. polypropyleen). De houders bestaan uit twee helften (een voorste en een achterste kamer) en hebben twee gelijke cilindrische inwendige kamers. Elke kamer heeft een inhoud van ongeveer 5 ml en is afgewerkt met een glazen venster waardoor de troebelheidsmetingen worden opgetekend. Elk van de inwendige kamers heeft een diameter van 1,7 cm en is 2,2 cm diep ([1]). De achterste kamer is voorzien van een o-ring om lekkage te voorkomen. De cornea's worden op de o-ring van de achterste kamers geplaatst met de endotheelzijde naar beneden en de voorste kamers worden op de epitheelzijde van de cornea's geplaatst. De kamers worden op hun plaats gehouden door drie schroeven van roestvrij staal die zich bevinden aan de randen van de kamer. Aan het einde van elke kamer bevindt zich een vensterglas, dat verwijderd kan worden voor gemakkelijke toegang tot de cornea. Tussen het vensterglas en de kamer bevindt zich eveneens een o-ring om lekkage te voorkomen. Elke kamer heeft bovenaan twee openingen voor toevoeging en verwijdering van media en teststoffen. Tijdens de behandeling en de incubatieperiode worden zij afgesloten met een rubberdop. De lichttransmissie door corneahouders kan mogelijk veranderen, omdat de effecten van slijtage of opeenstapeling van residuen van bepaalde chemische stoffen op de boorgaten of op het vensterglas van de inwendige kamers de verstrooiing of reflectie van licht kunnen beïnvloeden. Hierdoor zou de referentiewaarde voor de lichttransmissie (en omgekeerd de referentiewaarde voor de troebelheidsmetingen) door de corneahouders kunnen stijgen of dalen, en dit kan zichtbaar zijn door merkbare veranderingen in de verwachte initiële corneale referentietroebelheidsmetingen in de afzonderlijke kamers (d.w.z. de initiële corneale troebelheidswaarden in specifieke afzonderlijke corneahouders kunnen stelselmatig meer dan 2 of 3 troebelheidseenheden verschillen van de verwachte referentiewaarden). Elk laboratorium zou moeten overwegen een programma vast te stellen voor het beoordelen van veranderingen in de lichttransmissie door de corneahouders, afhankelijk van de aard van de geteste verbindingen en de gebruiksfrequentie van de kamers. Om referentiewaarden vast te stellen, kunnen corneahouders voordat tot routinegebruik wordt overgegaan, worden gecontroleerd door de referentietroebelheidswaarden (of lichttransmissie) van kamers gevuld met volledig medium, zonder cornea's, te meten. De corneahouders worden daarna op gezette tijden gecontroleerd op veranderingen in de lichttransmissie tijdens gebruiksperioden. Elk laboratorium kan de frequentie voor het controleren van de corneahouders vaststellen op basis van de geteste stoffen, de gebruiksfrequentie en waarnemingen van veranderingen in de referentietroebelheidswaarden van cornea's. Indien merkbare veranderingen in de lichttransmissie door de corneahouders worden waargenomen, moeten passende reinigings- en/of polijstprocedures voor de binnenkant van de corneahouders of vervanging ervan worden overwogen.

([1]) De opgegeven afmetingen zijn gebaseerd op een corneahouder die wordt gebruikt voor koeien tussen 12 en 60 maanden oud. Indien dieren tussen 6 en 12 maanden worden gebruikt, dient de houder zodanig te worden ontworpen dat elke kamer een inhoud heeft van 4 ml en elk van de interne kamers een diameter heeft van 1,5 cm en diepte van 2,2 cm. Voor elke nieuw-ontworpen corneahouder is het zeer belangrijk dat de verhouding tussen het blootgestelde corneale oppervlak en de achterkamerinhoud dezelfde is als de verhouding in de traditionele corneahouder. Dit is noodzakelijk om te verzekeren dat de permeabiliteitswaarden correct bepaald worden voor de berekening van de IVIS aan de hand van de voorgestelde formule.

▼M7

De corneahouder: Opengewerkte tekening



▼M7

Aanhangsel 5

DE OPACITOMETER

De opacitometer is een meetapparaat voor lichttransmissie. Voor bijvoorbeeld de OP-KIT-apparatuur van Electro Design (Riom, Frankrijk) die werd gebruikt in de validering van de BCOP-testmethode, wordt licht van een halogeenlamp door een controlebestanddeel (lege kamer zonder vensters of vloeistof) naar een fotocel gestuurd en vergeleken met het licht dat door een experimenteel bestanddeel, dat de kamer met de cornea bevat, naar een fotocel wordt gestuurd. Het verschil in lichttransmissie van de fotocellen wordt vergeleken en er wordt een numerieke troebelheidswaarde weergegeven op een digitaal scherm. De troebelheidseenheden worden vastgesteld. Andere typen opacitometers met een andere opzet (bv. waarvoor geen gelijktijdige metingen van de controle en experimentele compartimenten vereist zijn) kunnen worden gebruikt indien is aangetoond dat ze vergelijkbare resultaten geven als de gevalideerde apparatuur.

De troebelheidsmeter dient een lineaire respons te geven met een reeks troebelheidswaarden inclusief de grenswaarden van de verschillende klassen zoals beschreven in het voorspellend model (d.w.z. tot aan de grenswaarde die de corrosiviteit/het hevig irriterend karakter bepaalt). Om lineaire en nauwkeurige waarden tot een troebelheid van 75-80 troebelheidseenheden te verzekeren, dient de opacitometer te worden gekalibreerd met een reeks kalibratiemiddelen. Kalibratiemiddelen worden in de kalibratiekamer (een corneale kamer ontworpen om de kalibratiemiddelen te bevatten) geplaatst en afgelezen op de opacitometer. De kalibratiekamer is zodanig ontworpen dat de kalibratiemiddelen op ongeveer dezelfde afstand tussen het licht en de fotocel geplaatst zijn als de cornea's tijdens de troebelheidsmetingen. De referentiewaarden en initiële ingestelde waarde hangen af van het gebruikte type apparatuur. Lineariteit van de troebelheidsmetingen moet worden verzekerd door passende (instrumentspecifieke) procedures. Voor bijvoorbeeld de OP-KIT-apparatuur van Electro Design (Riom, Frankrijk) wordt de opacitometer eerst gekalibreerd op 0 troebelheidseenheden met behulp van de kalibratiekamer zonder kalibratiemiddel. Daarna worden drie verschillende kalibratiemiddelen één voor één in de kalibratiekamer geplaatst en worden de troebelheidswaarden gemeten. Kalibratiemiddelen 1, 2 en 3 dienen te resulteren in troebelheidsmetingen die gelijk zijn aan hun vastgestelde waarden van respectievelijk 75, 150 en 225 troebelheidseenheden ± 5 %.

▼M7

B.48. ISOLATED CHICKEN EYE-TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN I) CHEMISCHE STOFFEN DIE ERNSTIG OOGLETSEL VEROORZAKEN EN II) CHEMISCHE STOFFEN WAARVOOR CLASSIFICATIE VOOR OOGIRRITATIE OF ERNSTIG OOGLETSEL NIET NODIG IS

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 438 (2013) van de OESO. De Isolated Chicken Eye- (ICE-) testmethode werd in 2006 en 2010 geëvalueerd door het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), samen met het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM) en het Japans Centrum voor de validatie van alternatieve methoden (JaCVAM) (1) (2) (3). Bij de eerste evaluatie werd de ICE-testmethode bekrachtigd als een wetenschappelijk geldige testmethode voor gebruik als screeningtest voor de identificatie van chemische stoffen (stoffen en mengsels) die ernstig oogletsel veroorzaken (categorie 1) zoals gedefinieerd door het mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) van de Verenigde Naties (VN) (1) (2) (4) en Verordening (EG) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels (CLP-verordening) ([1]). Bij de tweede evaluatie werd de ICE-testmethode geëvalueerd op haar bruikbaarheid als screeningtest voor de identificatie van chemische stoffen die niet geclassificeerd zijn voor oogirritatie of ernstig oogletsel zoals gedefinieerd door het GHS van de VN (3) (4). Op basis van de resultaten van de valideringsstudie en de aanbevelingen van het peer review panel werd de oorspronkelijke aanbeveling gehandhaafd om de ICE-testmethode te gebruiken voor de classificatie van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS-categorie 1), omdat de beschikbare databank sinds de oorspronkelijke ICCVAM-validering ongewijzigd is gebleven. In dat stadium werden geen verdere aanbevelingen gedaan om het toepassingsgebied van de ICE-testmethode uit te breiden met andere categorieën. Met het oog op de beoordeling van de bruikbaarheid van de ICE-testmethode voor de identificatie van chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, werd de in-vitro- en in-vivo-gegevensverzameling die in de valideringsstudie werd gebruikt, opnieuw beoordeeld (5). Op grond van deze herbeoordeling werd geconcludeerd dat de ICE-testmethode ook kan worden gebruikt voor de identificatie van chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie en ernstig oogletsel zoals gedefinieerd door het GHS van de VN niet nodig is (4) (5). Deze testmethode omvat de aanbevolen toepassingen en beperkingen van de ICE-testmethode op basis van deze evaluaties. De belangrijkste verschillen tussen de oorspronkelijke versie van 2009 en de bijgewerkte versie van 2013 van de testrichtlijn van de OESO hebben betrekking op, maar zijn niet beperkt tot, het gebruik van de ICE-testmethode voor de identificatie van chemische stoffen waarvoor classificatie volgens het GHS-classificatiesysteem van de VN niet nodig is, een bijwerking van de elementen van het testverslag, een bijwerking van aanhangsel 1 betreffende definities, en een bijwerking van aanhangsel 2 betreffende de stoffen voor de bekwaamheidstoetsing.

Momenteel wordt algemeen aangenomen dat er in de nabije toekomst geen in-vitrotest voor oogirritatie zal komen die de in-vivo-Draize-oogtest volledig zal kunnen vervangen om voorspellingen te doen voor het volledige bereik van irritatie voor verschillende klassen chemische stoffen. Strategische combinaties van meerdere alternatieve testmethoden binnen een (trapsgewijze) teststrategie kunnen de Draize-oogtest mogelijk echter wel vervangen (6). De top-downbenadering (7) is bedoeld om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof een hoog irritatiepotentieel heeft, terwijl de bottom-upbenadering (7) bedoeld is om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie verwacht wordt dat een chemische stof onvoldoende oogirritatie zal veroorzaken om classificatie noodzakelijk te maken. De ICE-testmethode is een in-vitrotestmethode die onder bepaalde voorwaarden en met specifieke beperkingen zoals beschreven in de punten (8) tot en

([1]) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

▼M7

met (10) kan worden gebruikt voor de classificatie van gevaren voor de ogen en de etikettering van chemische stoffen. Hoewel de ICE-testmethode niet geldig geacht wordt als zelfstandige vervanging van de in-vivo-oogtest bij konijnen, wordt de ICE-testmethode aanbevolen als een eerste stap binnen een teststrategie zoals de top-downbenadering die door Scott et al. is voorgesteld (7) voor de identificatie van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken, d.w.z. voor chemische stoffen die moeten worden ingedeeld in VN-GHS-categorie 1, zonder verdere tests (4). De ICE-testmethode wordt ook aanbevolen voor de identificatie van chemische stoffen waarvoor classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, zoals gedefinieerd door het GHS van de VN (VN-GHS Geen categorie) (4), en kan derhalve worden gebruikt als eerste stap in een bottom-upbenadering van een teststrategie (7). Voor een chemische stof waarvoor met de ICE-testmethode niet wordt voorspeld dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt of dat classificatie voor oogirritatie/ernstig oogletsel niet nodig is, moeten echter aanvullende tests (in vitro en/of in vivo) worden uitgevoerd om tot een definitieve classificatie te komen. Bovendien moeten de toepasselijke regelgevingsinstanties worden geraadpleegd voordat de ICE-testmethode wordt gebruikt in een bottom-upbenadering volgens andere classificatiesystemen dan het GHS van de VN.

Deze testmethode is bedoeld om de procedures te beschrijven die worden gebruikt om het mogelijke gevaar van een teststof voor de ogen te beoordelen aan de hand van het vermogen van deze chemische stof om toxiciteit op te wekken in een verwijderd kippenoog. Toxische effecten op de cornea worden gemeten door (i) een kwalitatieve beoordeling van de troebelheid, (ii) een kwalitatieve beoordeling van de schade aan de epitheellaag op basis van aanbrenging van fluoresceïne op het oog (fluoresceïne-retentie), (iii) een kwantitatieve meting van toegenomen dikte (zwelling) en (iv) een kwalitatieve beoordeling van macroscopische morfologische schade aan het oppervlak. De beoordelingen van de corneale troebelheid, zwelling en schade na blootstelling aan een teststof worden individueel beoordeeld en daarna gecombineerd om een oogirritatieklasse te kunnen afleiden.

Definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

Deze testmethode is gebaseerd op het protocol dat is voorgesteld in OESO-leidraad nr. 160 (8) en ontwikkeld werd naar aanleiding van een internationale valideringsstudie van het ICCVAM (1) (3) (9) met bijdragen van het European Centre for the Validation of Alternative Methods, het Japanese Center for the Validation of Alternative Methods en TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederland). Het protocol is gebaseerd op informatie verkregen uit gepubliceerde protocollen alsook het huidige door TNO gebruikte protocol (10) (11) (12) (13) (14).

Bij de onderliggende validering van deze testmethode werd een groot aantal chemische stoffen getest en de empirische databank van de valideringsstudie bevatte 152 chemische stoffen, waarvan 72 stoffen en 80 mengsels (5). De testmethode is van toepassing op vaste stoffen, vloeistoffen, emulsies en gels. Vloeistoffen mogen waterig of niet-waterig zijn; vaste stoffen mogen al dan niet in water oplosbaar zijn. Gassen en aerosols zijn nog niet gevalideerd in een valideringsstudie.

De ICE-testmethode kan worden gebruik om chemische stoffen te identificeren die ernstig oogletsel veroorzaken en die moeten worden ingedeeld in VN-GHS-categorie 1 (4). Voor het doel van dit onderzoek zijn de geïdentificeerde beperkingen van de ICE-testmethode gebaseerd op het grote aantal vals-positieve uitslagen voor alcoholen en het grote aantal vals-negatieve uitslagen voor vaste stoffen en oppervlakteactieve stoffen (1) (3) (9). In deze context (VN-GHS-categorie 1 aangemerkt als niet tot VN-GHS-categorie 1 behorend) zijn vals-negatieve uitslagen echter niet kritiek omdat alle teststoffen die een negatief resultaat geven, vervolgens worden getest met (een) andere afdoend gevalideerde in-vitrotest(s), of als laatste optie bij konijnen, afhankelijk van de wettelijke voorschriften, met een sequentiële teststrategie in een op bewijskracht gebaseerde

▼M7

aanpak. Voorts zij opgemerkt dat vaste stoffen kunnen leiden tot variabele en extreme blootstellingsomstandigheden in de in-vivo-Draize-test op oogirritatie, die irrelevante voorspellingen van het werkelijke irritatiepotentieel van deze stoffen kunnen opleveren (15). Onderzoekers zouden kunnen overwegen deze testmethode te gebruiken voor alle typen chemische stoffen, waarbij een positief resultaat dient te worden aangenomen als een aanwijzing van ernstig oogletsel, d.w.z. om de stof zonder verdere tests in te delen in VN-GHS-categorie 1. Positieve resultaten die verkregen werden met alcoholen dienen echter met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd vanwege het risico van overpredictie.

Wanneer de ICE-testmethode wordt gebruikt om chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (VN-GHS-categorie 1) te identificeren, heeft deze testmethode een algemene nauwkeurigheidsgraad van 86 % (120/140), een percentage vals-positieve uitslagen van 6 % (7/113) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 48 % (13/27) vergeleken met gegevens van de in-vivo-oogtest bij konijnen die werden geclassificeerd volgens het GHS-classificatiesysteem van de VN (4) (5).

De ICE-testmethode kan ook worden gebruik om chemische stoffen te identificeren die niet hoeven te worden ingedeeld voor oogirritatie of ernstig oogletsel volgens het VN-GHS-classificatiesysteem (4). Voor de ICE-testmethode in een bottom-upbenadering volgens andere classificatiesystemen wordt gebruikt, dienen de toepasselijke regelgevingsinstanties te worden geraadpleegd. Deze testmethode kan worden gebruikt voor alle soorten chemische stoffen, waarbij een negatief resultaat kan worden aangenomen om een chemische stof niet in te delen voor oogirritatie en ernstig oogletsel. Op basis van één resultaat van de valideringsdatabank is de voorspelling voor aangroeiwerende oplosmiddelhoudende organische verven echter mogelijk te laag (5).

Wanneer de ICE-testmethode wordt gebruikt om chemische stoffen te identificeren die geen indeling voor oogirritatie en ernstig oogletsel behoeven, heeft deze testmethode een algemene nauwkeurigheidsgraad van 82 % (125/152), een percentage vals-positieve uitslagen van 33 % (26/79) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 1 % (1/73) vergeleken met gegevens van de in-vivo-oogtest bij konijnen die werden geclassificeerd volgens het GHS-classificatiesysteem van de VN (4) (5). Wanneer teststoffen in bepaalde klassen (zoals aangroeiwerende oplosmiddelhoudende organische verven) worden uitgesloten van de databank, heeft de ICE-testmethode een nauwkeurigheidsgraad van 83 % (123/149), een percentage vals-positieve uitslagen van 33 % (26/78) en een percentage vals-negatieve uitslagen van 0 % (0/71) voor het VN-GHS-classificatiesysteem (4) (5).

De ICE-testmethode wordt niet aanbevolen voor het identificeren van teststoffen die moeten worden geclassificeerd als irriterend voor de ogen (VN-GHS-categorie 2 of categorie 2A) of teststoffen die moeten worden geclassificeerd als licht irriterend voor de ogen (VN-GHS-categorie 2B), vanwege het aanzienlijke aantal chemische stoffen van VN-GHS-categorie 1 die te laag zijn ingedeeld in VN-GHS-categorie 2, 2A of 2B en het aanzienlijke aantal chemische stoffen van VN-GHS Geen categorie die te hoog zijn ingedeeld in VN-GHS-categorie 2, 2A of 2B. Voor dit doel kan het nodig zijn verdere tests met een andere geschikte methode uit te voeren.

Alle procedures met kippenogen dienen de op de testinrichting toepasselijke regelgeving en procedures voor de behandeling van menselijke of van dieren afkomstige materialen na te leven, met inbegrip van maar niet beperkt tot weefsels en weefselvloeistoffen. Universele voorzorgsmaatregelen voor laboratoria zijn aanbevolen (16).

Hoewel de ICE-testmethode geen rekening houdt met letsels van het ooglid en de iris zoals die in de oogirritatietestmethode bij konijnen worden beoordeeld, wordt wel gekeken naar effecten op het hoornvlies, die bij in-vivo-onderzoek de belangrijkste factor voor indeling zijn bij de VN-GHS-classificatie. Hoewel de reversibiliteit van hoornvliesletsels op zichzelf niet kan worden beoordeeld in de ICE-testmethode, werd bovendien voorgesteld, op basis van studies op de ogen van konijnen, dat een beoordeling van de aanvankelijke diepte van het hoornvliesletsel kan worden gebruikt om sommige types irreversibele effecten te identificeren (17). Zo is er in het bijzonder meer wetenschappelijke kennis nodig om te begrijpen hoe irreversibele effecten optreden die geen verband

▼M7

houden met de aanvankelijke diepte van het letsel. Tot slot kan de ICE-testmethode niet worden gebruikt voor een beoordeling van de mogelijkheid van met blootstelling van het oog geassocieerde systemische toxiciteit.

Deze testmethode zal periodiek worden bijgewerkt wanneer nieuwe informatie en gegevens in aanmerking worden genomen. Histopathologie kan bijvoorbeeld van nut zijn wanneer een vollediger karakterisering van schade aan de cornea nodig is. Om die mogelijkheid te evalueren, worden de gebruikers aangemoedigd om ogen te bewaren en histopathologiespecimen te prepareren die kunnen worden gebruikt om een databank en beslissingscriteria te ontwikkelen die de nauwkeurigheid van deze testmethode verder kunnen verbeteren. De OESO heeft een leidraad over het gebruik van in-vitrotestmethoden voor oculaire toxiciteit uitgewerkt met gedetailleerde procedures voor het verzamelen van histopathologiespecimen en informatie over waar specimen en/of histopathologiegegevens kunnen worden ingediend (8).

Elk laboratorium dat dit onderzoek voor het eerst opstelt, dient gebruik te maken van de in bijlage 2 voorziene chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Een laboratorium kan deze chemicaliën gebruiken om zijn technische bekwaamheden met betrekking tot het uitvoeren van de ICE-testmethode aan te tonen vooraleer het ICE-onderzoeksgegevens indient voor de wettelijke gevarenclassificatie.

PRINCIPE VAN DE TEST

De ICE-testmethode is een organotypisch model dat handhaving op korte termijn van het kippenoog in vitro vereist. In deze testmethode wordt schade door de teststof beoordeeld door vaststelling van corneale zwelling, troebelheid en fluoresceïne-retentie. Daar waar de laatste twee parameters een kwalitatieve beoordeling vergen, vereist de analyse van de corneale zwelling een kwantitatieve beoordeling. Elke meting wordt ofwel omgezet in een kwantitatieve score die gebruikt wordt voor de berekening van een algemene irritatie-index, ofwel een kwalitatieve indeling toegekend die gebruikt wordt voor de toekenning van een in-vitro-indeling van het gevaar voor de ogen, hetzij als VN-GHS-categorie 1, hetzij als niet ingedeeld volgens VN-GHS. Elk van deze resultaten kan dan worden aangewend om het potentiële ernstige oogletsel in vivo of de afwezigheid van de noodzaak van indeling als gevaarlijk voor de ogen van een teststof te voorspellen (zie beslissingscriteria). Er kan evenwel geen indeling worden gegeven voor chemische stoffen waarvan niet is voorspeld dat zij ernstig oogletsel veroorzaken of die niet zijn ingedeeld met de ICE-testmethode (zie punt 11).

Bron en ouderdom van de kippenogen

In het verleden werden voor dit onderzoek steeds ogen verzameld van kippen uit de slachterij die geslacht werden voor de menselijke consumptie waardoor er geen nood was aan proefdieren. Enkel ogen van gezonde dieren die geschikt zijn voor de menselijke voedselketen worden gebruikt.

Hoewel een gecontroleerde studie voor de beoordeling van de ideale leeftijd van de kip nog niet werd gevoerd, was de leeftijd en het gewicht van de in deze testmethode gebruikte kippen in het verleden dat van piepkuikens van oudsher geslacht in een pluimveeslachterij (d.w.z. ongeveer 7 weken oud, 1,5 tot 2,5 kg).

Verzameling en vervoer van ogen naar het laboratorium

Na verdoving van de kippen, meestal met een elektrische schok, en incisie in de nek voor bloeding, dient de kop onmiddellijk verwijderd te worden. Er dient een plaatselijke bron van kippen, niet ver van het laboratorium te worden gezocht zodat de koppen snel genoeg van de slachterij naar het laboratorium kunnen worden vervoerd om bederf en/of bacteriële besmetting zoveel mogelijk te beperken. Om de naleving van de acceptatiecriteria van de test te verzekeren dient het tijdsinterval tussen de verzameling van de koppen en het moment waarop de ogen in de superfusiekamer worden geplaatst nadat zij zijn weggenomen, tot een minimum te worden beperkt (gewoonlijk maximaal twee uur). Alle in het onderzoek gebruikte ogen dienen van dezelfde groep op een bepaalde dag verzamelde ogen te zijn.

▼M7

Aangezien de ogen in het laboratorium ontleed worden, worden de koppen intact en op omgevingstemperatuur van de slachterij (gewoonlijk tussen 18 °C en 25 °C) vervoerd in plastic dozen, bevochtigd met in isotoon zout gedrenkte doeken.

Selectiecriteria en aantal ogen gebruikt in de ICE

Ogen die een hoge referentie-fluoresceïneverkleuring (d.w.z. > 0,5) of corneale troebelheidsscore (d.w.z. > 0,5) vertonen, worden na verwijdering verworpen.

Elke behandelingsgroep en tegelijkertijd gemeten positieve controle bestaat uit ten minste drie ogen. De negatieve controlegroep of de oplosmiddelcontrole (indien een ander oplosmiddel dan zout gebruikt wordt) bestaat uit ten minste één oog.

Wanneer vaste materialen het resultaat „GHS Geen categorie" opleveren, is een tweede cyclus met drie ogen aanbevolen om het negatieve resultaat te bevestigen of te verwerpen.

PROCEDURE

Voorbereiding van de ogen

De oogleden worden zorgvuldig verwijderd zodat geen schade wordt berokkend aan de cornea. De corneale integriteit kan eenvoudig worden beoordeeld met een druppel van 2 % (g/v) natriumfluoresceïne die gedurende enkele seconden wordt aangebracht op het hoornvliesoppervlak en daarna uitgewassen met een isotone zoutoplossing. Met fluoresceïne behandelde ogen worden daarna onderzocht met een spleetlampmicroscoop om er zeker van te zijn dat de cornea niet beschadigd is (d.w.z. fluoresceïne-retentie en corneale troebelheidsscore ≤ 0.5).

Indien het oog onbeschadigd is, wordt het voorzichtig verder verwijderd uit de schedel zonder de cornea te beschadigen. De oogbal wordt van de oogrand getrokken door het derde ooglid stevig vast te houden met een chirurgische tang terwijl de oogspier afgesneden wordt met een kromme schaar met botte punten. Het is belangrijk schade aan de cornea door buitensporige druk (d.w.z. misvorming door samendrukking) te voorkomen.

Als het oog van de oogrand verwijderd is, zou een zichtbaar gedeelte van de oogzenuw nog aangehecht moeten zijn. Zodra het oog van de oogrand verwijderd is, wordt het op een absorberend verband gelegd en worden het derde ooglid en ander bindweefsel weggesneden.

Het verwijderde oog wordt op een klem van roestvrij staal geplaatst met de cornea in verticale positie. De klem wordt dan overgebracht naar een kamer van het superfusieapparaat (18). De klemmen dienen zo in het superfusieapparaat te worden geplaatst dat de volledige cornea met de isotone zoutoplossing wordt bedropen (3-4 druppels per minuut of 0,1 tot 0,15 ml/min). In de kamers van het superfusieapparaat moet een temperatuur van 32 ± 1,5 °C worden gehandhaafd. Bijlage 3 bevat een diagram van een typisch superfusieapparaat met oogklemmen, dat verkrijgbaar is in de handel of zelf kan worden gemaakt. Het apparaat kan worden aangepast aan de behoeften van elk individueel laboratorium (bv. om een ander aantal ogen te houden).

Nadat ze in het superfusieapparaat geplaatst zijn, worden de ogen nogmaals onderzocht met een spleetlampmicroscoop om te controleren dat er zich tijdens de dissectieprocedure geen schade heeft voorgedaan. Met behulp van de dieptemeter van de spleetlampmicroscoop wordt meteen ook de corneale dikte gemeten ter hoogte van de corneale apex. Ogen met een fluoresceïne-retentiescore van > 0,5; (ii) corneale troebelheid > 0,5; elk bijkomend teken van schade, dienen te worden vervangen. Individuele ogen die niet werden verwijderd op basis van de voorgaande criteria dienen te worden verwijderd indien de corneale dikte met meer dan 10 % afwijkt van de gemiddelde waarde van alle ogen. Gebruikers dienen zich te realiseren dat spleetlampmicroscopen verschillende resultaten voor corneale dikte kunnen opleveren naargelang van de instelling van de breedte van de spleet. De breedte van de spleet dient te worden ingesteld op 0,095 mm.

▼M7

Zodra alle ogen onderzocht en goedgekeurd zijn, worden de ogen gedurende ongeveer 45 tot 60 minuten geïncubeerd om ze vóór de dosering te equilibreren met het testsysteem. Na de equilibreerperiode wordt een nulreferentiemeting opgetekend voor de corneale dikte en troebelheid die zal dienen als referentie (d.w.z. tijd = 0). De fluoresceïnescore die bepaald wordt bij de ontleding wordt gebruikt als referentiemeting voor dat eindpunt.

Aanbrenging van de teststof

Onmiddellijk na de nulreferentiemetingen wordt het oog (in de houder) verwijderd uit het superfusieapparaat, in horizontale positie geplaatst, en wordt de teststof aangebracht op de cornea.

Vloeibare teststoffen worden gewoonlijk onverdund getest, maar kunnen worden verdund indien dit nodig blijkt te zijn (bv. als onderdeel van de onderzoeksopzet). Het aanbevolen oplosmiddel voor verdunde teststoffen is fysiologische zoutoplossing. Andere oplosmiddelen mogen echter ook worden gebruikt in gecontroleerde omstandigheden maar indien aan een ander oplosmiddel dan fysiologische zoutoplossing de voorkeur wordt gegeven, dient dit te worden gemotiveerd.

Vloeibare teststoffen worden zodanig aangebracht op de cornea dat het gehele oppervlak van de cornea gelijk bedekt is met de teststof; het standaardvolume is 0,03 ml.

Indien mogelijk, dienen de vaste stoffen zo fijn mogelijk gemalen te worden in een vijzel of een vergelijkbaar maalinstrument. Het poeder wordt zodanig op de cornea aangebracht dat het hele oppervlak gelijk bedekt is met de teststof; de standaardhoeveelheid is 0,03 g.

De teststof (vloeibaar of vast) wordt gedurende 10 seconden toegediend en dan weggespoeld met isotone zoutoplossing (ongeveer 20 ml) op omgevingstemperatuur. Het oog (in de houder) wordt daarna terug in het superfusieapparaat geplaatst in de oorspronkelijke rechtopstaande positie. Indien nodig kunnen de cornea na de toediening gedurende 10 seconden en op latere tijdstippen (bv. wanneer er residuen van de teststof op de cornea worden aangetroffen) bijkomend worden uitgewassen. Over het algemeen is de hoeveelheid zoutoplossing die extra wordt gebruikt voor het uitwassen, niet van doorslaggevend belang, maar de vaststelling dat chemische stoffen aan de cornea blijven kleven is wel belangrijk.

Controlestoffen

In elk experiment moeten gelijktijdig gemeten negatieve controles of controles met oplosmiddel/medium en positieve controles worden opgenomen.

Bij het testen van vloeistoffen aan 100 % of vaste stoffen wordt fysiologische zoutoplossing gebruikt als tegelijkertijd gemeten negatieve controle in de ICE-testmethode om niet-specifieke veranderingen in het testsysteem op te sporen en om te garanderen dat de onderzoeksomstandigheden niet ongewenst leiden tot een irriterende respons.

Bij het testen van verdunde vloeistoffen wordt een tegelijkertijd gemeten controlegroep van oplosmiddelen/media opgenomen in de testmethode om niet-specifieke veranderingen in het testsysteem op te sporen en om te garanderen dat de onderzoeksomstandigheden niet ongewenst leiden tot een irriterende respons. Zoals gesteld in punt 31, kunnen enkel oplosmiddelen/media worden gebruikt waarvan geweten is dat ze geen nadelig effect op het testsysteem hebben.

Een bekende voor de ogen irriterende stof wordt in elk experiment opgenomen als gelijktijdige positieve controle om na te gaan of de juiste respons wordt opgewekt. Aangezien het ICE-onderzoek in deze testmethode wordt gebruikt om corrosieve en hevig irriterende stoffen te identificeren, is het best dat de positieve controle gebeurt met een referentiestof die een hevige respons opwekt in deze testmethode. Om te verzekeren dat de variabiliteit in de positieve-controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de hevig irriterende respons echter niet buitensporig zijn. Voor de positieve controle dienen voldoende in-vitrogegevens te worden gegenereerd zodat een statistisch

▼M7

gedefinieerde aanvaardbare reeks voor de positieve controle kan worden berekend. Indien voor een bepaalde positieve controle geen gepaste historische ICE-testmethodegegevens beschikbaar zijn, dan is het mogelijk dat onderzoek dient te worden verricht om deze gegevens te verkrijgen.

Voorbeelden van positieve controles voor vloeibare teststoffen zijn 10 % azijnzuur of 5 % benzalkoniumchloride. Voorbeelden van positieve controles voor vaste teststoffen zijn natriumhydroxide of imidazool.

IJkstoffen zijn nuttig voor de beoordeling van potentiële oogirritatie bij onbekende chemische stoffen uit een specifieke chemische klasse of productklasse of voor de beoordeling van potentiële relatieve irritatie van een voor het oog irriterende stof binnen een reeks van irritatieresponsen.

Gemeten eindpunten

Behandelde cornea's worden beoordeeld vóór behandeling en op 30, 75, 120, 180 en 240 minuten (± 5 minuten) na het uitwassen na behandeling. Deze punten in de tijd leveren een geschikt aantal metingen op over een behandelingsperiode van vier uur en laten toch voldoende tijd tussen twee metingen voor de vereiste waarnemingen voor alle ogen.

De eindpuntbeoordelingen zijn corneale troebelheid, zwelling, fluoresceïne-retentie en morfologische effecten (bv. kuilvorming of loskomen van de epitheellaag). Alle eindpunten, met uitzondering van de fluoresceïne-retentie (die enkel wordt bepaald vóór de behandeling en 30 minuten na blootstelling aan de teststof) worden bepaald op elk van de bovenvermelde tijdstippen.

Het nemen van foto's wordt aanbevolen als documentatie van corneale troebelheid, fluoresceïne-retentie, morfologische effecten en, indien uitgevoerd, histopathologie.

Na het laatste onderzoek, na vier uur, worden gebruikers aangespoord om de ogen te bewaren in het gepaste fixeermiddel (d.w.z. neutrale gebufferde formaldehyde) voor eventueel histopathologisch onderzoek (zie punt 14 en referentie (8) voor meer informatie).

Corneale zwelling wordt bepaald aan de hand van de diktemetingen van de cornea met een optische pachymeter op een spleetlampmicroscoop. Zij wordt uitgedrukt als percentage en wordt berekend vanuit de corneale diktemetingen volgens de volgende formule:

$$\left(\frac{\textit{corneale dikte op tijdstip } t - \textit{corneale dikte op tijdstip} = 0}{\textit{corneale dikte op tijdstip} = 0} \right) \times 100$$

Het gemiddelde percentage van corneale zwelling voor alle testogen wordt berekend voor alle waarnemingstijdstippen. Op basis van de hoogste gemiddelde score voor corneale zwelling, zoals die op elk tijdstip is waargenomen, wordt dan een algemene categoriescore toegekend aan elke teststof (zie punt 51).

De corneale troebelheid wordt beoordeeld aan de hand van het gebied van de cornea waar de troebelheid het dichtst is, zoals te zien in tabel 1. De gemiddelde waarde van de corneale troebelheid voor alle testogen wordt berekend voor alle waarnemingstijdstippen. Op basis van de hoogste gemiddelde score voor corneale troebelheid, zoals die op elk tijdstip is waargenomen, wordt dan een algemene categoriescore toegekend aan elke teststof (zie punt 51).

▼M7

Tabel 1

Corneale troebelheidsscores

Totale	Observatie
0	Geen troebelheid
0,5	Zeer zwakke troebelheid
1	Verspreide of diffuse gebieden; details van de iris zijn duidelijk zichtbaar
2	Gemakkelijk te onderscheiden doorschijnend gebied; details van de iris zijn enigszins vervaagd
3	Ernstige corneale troebelheid; details van de iris niet zichtbaar; omvang van de pupil nauwelijks zichtbaar
4	Volledige corneale troebelheid; iris onzichtbaar

De mate van fluoresceïne-retentie wordt enkel beoordeeld op het tijdstip van de 30e minuut, zoals te zien in tabel 2. De gemiddelde fluoresceïne-retentiewaarde voor alle testogen wordt vervolgens berekend voor het tijdstip van de 30e minuut en wordt gebruikt voor de algemene categoriescore die aan elke teststof wordt gegeven (zie punt 51).

Tabel 2

Fluoresceïne-retentiescores

Totale	Observatie
0	Geen fluoresceïne-retentie
0,5	Minieme enkelcellige verkleuring
1	Enkelcellige verkleuring verspreid over het behandelde oppervlak van de cornea
2	Geconcentreerde of samenvloeiende enkelcellige verkleuring
3	Samenvloeiende grotere oppervlakken van de cornea met fluoresceïne

Morfologische effecten zijn bijvoorbeeld „kuilvorming” van de corneale epitheelcellen, „loskomen” van de epitheellaag, „ongelijkmatig worden” van het corneale oppervlak en „kleven” van de teststof aan de cornea. Deze bevindingen kunnen in hevigheid variëren en kunnen eveneens gelijktijdig voorkomen. De indeling van deze bevindingen is subjectief naargelang de interpretatie van de onderzoeker.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de gegevens

Resultaten van corneale troebelheid, zwelling en fluoresceïne-retentie dienen afzonderlijk te worden beoordeeld om een ICE-klasse te genereren voor elk eindpunt. De ICE-klassen voor elk eindpunt worden daarna gecombineerd om een irritatieklasse voor elke teststof te genereren.

Beslissingscriteria

Na beoordeling van elk eindpunt kunnen ICE-klassen worden toegekend op basis van een vooraf vastgestelde reeks. Interpretatie van corneale zwelling (tabel 3), troebelheid (tabel 4) en fluoresceïne-retentie (tabel 5) aan de hand van vier ICE-klassen gebeurt volgens onderstaande schalen. Scores voor corneale zwelling zoals te zien in tabel 3 zijn enkel van toepassing indien de dikte gemeten wordt met een spleetlampmicroscoop (bijvoorbeeld Haag-Streit BP900) met een dieptemeetapparaat nr. 1 en spleetbreedte ingesteld op $9\frac{1}{2}$ gelijk aan 0,095 mm. Gebruikers dienen

▼M7

zich te realiseren dat spleetlampmicroscopen verschillende resultaten voor corneale dikte kunnen opleveren naargelang van de instelling van de breedte van de spleet.

Tabel 3

ICE-indelingscriteria voor corneale zwelling

Gemiddelde corneale zwelling (%) (*)	ICE-klasse
0 tot 5	I
> 5 tot en met 12	II
> 12 tot en met 18 (> 75 minuten na behandeling)	II
> 12 tot en met 18 (≤ 75 minuten na behandeling)	III
> 18 tot en met 26	III
> 26 tot en met 32 (> 75 minuten na behandeling)	III
> 26 tot en met 32 (≤ 75 minuten na behandeling)	IV
32	IV

(*) Hoogste gemiddelde score waargenomen op elk tijdstip

Tabel 4

ICE-indelingscriteria voor troebelheid

Maximale gemiddelde troebelheidsscore (*)	ICE-klasse
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Maximale gemiddelde score waargenomen op elk tijdstip (op basis van de troebelheidsscores zoals gedefinieerd in tabel 1).

Tabel 5

ICE-indelingscriteria voor gemiddelde fluoresceïne-retentie

Gemiddelde fluoresceïne-retentiescore 30 minuten na de behandeling (*)	ICE-klasse
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Op basis van scores zoals gedefinieerd in tabel 2.

De in-vitroclassificatie voor een teststof wordt beoordeeld door de GHS-classificatie te nemen die overeenkomt met de combinatie van de categorieën die werden verkregen voor corneale zwelling, corneale troebelheid en fluoresceïne-retentie zoals beschreven in tabel 6.

▼M7

Tabel 6

Totale in-vitroclassificaties

VN-GHS-classificatie	Combinaties van de 3 eindpunten
Geen categorie	3 x I 2 x I, 1 x II
Er kan geen voorspelling worden gedaan	Andere combinaties
Categorie 1	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II (*) 2 x IV, 1 x I (*) Corneale troebelheid ≥ 3 op 30 min (in ten minste 2 ogen) Corneale troebelheid = 4 op elk tijdstip (in ten minste 2 ogen) Ernstig loslaten van de epitheellaag (in ten minste 1 oog)

(*) Combinaties die zelden voorkomen.

Acceptatiecriteria van het onderzoek

Een test wordt aanvaardbaar geacht als de gelijktijdige negatieve controles of controles met medium/oplosmiddel en de gelijktijdige positieve controles respectievelijk zijn geïdentificeerd als GHS niet ingedeeld en GHS categorie 1.

Testverslag

Het testverslag dient de volgende informatie te bevatten, indien relevant voor het voeren van het onderzoek:

Teststof en controlestoffen

— Chemische benaming(en) zoals de gestructureerde benaming gebruikt door de Chemical Abstracts Service (CAS), gevolgd door andere benamingen indien bekend;

— het CAS-registratienummer (RN), indien bekend;

— Zuiverheid en samenstelling van de test-/controlestoffen (in percentage(s) per gewicht) voor zover deze informatie beschikbaar is;

— Fysisch-chemische eigenschappen zoals de fysische staat, vluchtigheid, pH, stabiliteit, scheikundige klasse, oplosbaarheid in water, die van belang zijn voor het voeren van het onderzoek;

— De behandeling van de test-/controlestoffen voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

— Stabiliteit, indien bekend.

Informatie met betrekking tot de opdrachtgever en de testinstallatie

— Naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de directeur van het onderzoek;

— Identificatie van de herkomst van de ogen (d.w.z. de plaats waar ze verzameld werden).

Omstandigheden van de testmethode

— Beschrijving van het gebruikte testsysteem;

▼M7

— Gebruikte spleetlampmicroscoop (bv. model) en de instellingen van de gebruikte spleetlampmicroscoop;

— Verwijzing naar historische resultaten van de negatieve en positieve controles en, indien mogelijk, historische gegevens waaruit blijkt dat de tegelijkertijd gemeten referentiecontrolebereiken aanvaardbaar zijn;

— De gebruikte procedure ter verzekering van de integriteit (d.w.z. nauwkeurigheid en betrouwbaarheid) van de testmethode in de tijd (bv. periodiek testen van de stoffen voor bekwaamheidstoetsing).

Verzameling en voorbereiding van de ogen

— Leeftijd en gewicht van het donordier en, indien mogelijk, andere specifieke kenmerken van de dieren waarvan de ogen werden verzameld (bv. geslacht, stam);

— Opslag- en transportomstandigheden van de ogen (bv. datum en tijdstip van de verzameling, tijdsinterval tussen het moment waarop de koppen van de kippen werden verzameld en het moment waarop de verwijderde ogen in de superfusiekamer werden geplaatst);

— Voorbereiding en aanbrenging van de ogen met inbegrip van verklaringen betreffende hun kwaliteit, temperatuur van de oogkamers, en criteria voor de selectie van de voor de tests gebruikte ogen.

Testprocedure

— Aantal gebruikte duplo's;

— Identificatiegegevens van de gebruikte negatieve en positieve controles (indien van toepassing, ook het oplosmiddel en de referentiecontroles);

— De gehanteerde dosis van de teststoffen en de gebruikte toedienings- en blootstellingstijd;

— Waarnemingstijdstippen (voor en na behandeling);

— Een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;

— Een beschrijving van de gebruikte criteria voor de aanvaardbaarheid van tests;

— Een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure.

Resultaten

— Een tabel met de scores voor corneale zwelling, troebelheid en fluoresceïneretentie die werden verkregen voor elk afzonderlijk oog en op elk waarnemingstijdstip, met inbegrip van de gemiddelde scores voor alle geteste ogen op elk waarnemingstijdstip;

— De hoogst waargenomen gemiddelde scores voor corneale zwelling, troebelheid en fluoresceïne-retentie (op eender welk waarnemingstijdstip) en de bijbehorende ICE-klasse;

— Een beschrijving van eventuele andere waargenomen effecten;

— De afgeleide in-vitro-GHS-classificatie;

— Indien van toepassing, foto's van het oog.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

▼**M7**

LITERATUUR

(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 nr. 07-4517. Beschikbaar op: 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. Beschikbaar op: 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 nr. 10-7553A. Beschikbaar op: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(4) Verenigde Naties (VN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, VN New York en Genève, 2011. Beschikbaar op: 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 (deel 1 en deel 2), OESO, Parijs.

(6) Hoofdstuk B.5 van deze bijlage, Acute oogirritatie/-corrosie.

(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) OESO (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, OESO, Parijs.

(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 nr. 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Beschikbaar op: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

(10) Prinsen, M.K. and 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, 13blz. Beschikbaar op: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼M7

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

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

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Beschikbaar op: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

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

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid.

Bewijskracht(proces): het proces waarbij de sterke en zwakke punten van verschillende gegevens worden onderzocht bij het komen tot en ondersteunen van een conclusie met betrekking tot het gevarenpotentieel van een stof.

Bottom-upbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een chemische stof waarvan wordt vermoed dat classificatie voor oogirritatie of ernstig oogletsel niet nodig is, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen waarvoor classificatie niet nodig is (negatief resultaat) van andere chemische stoffen (positief resultaat).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Cornea: het doorschijnende gedeelte van het voorste deel van de oogbal dat de iris en pupil bedekt en licht naar binnen toelaat.

Corneale troebelheid: meting van de mate van troebelheid van de cornea na blootstelling aan een teststof. Verhoogde corneale troebelheid is een aanwijzing voor schade aan de cornea.

Corneale zwelling: een objectieve meting in de ICE-test van de mate van uitzetting van de cornea na blootstelling aan een teststof. Dit wordt uitgedrukt als percentage en wordt berekend vanaf de referentiedikte van de cornea (vóór dosering) en de dikte opgetekend op regelmatige intervallen na blootstelling aan de teststof in de ICE-test. De mate van corneale zwelling is een aanwijzing voor schade aan de cornea.

Ernstig oogletsel: veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging. Verwisselbaar met „Irreversibele effecten op ogen” en met „VN-GHS-categorie 1” (4).

Fluoresceïne-retentie: een subjectieve meting in de ICE-test van de hoeveelheid natriumfluoresceïne die wordt weerhouden door de epitheelcellen in de cornea na blootstelling aan een teststof. De mate van fluoresceïne-retentie is een aanwijzing voor schade aan de corneale epitheellaag.

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Gevalideerde testmethode: een testmethode waarvoor valideringsstudies werden gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er dient te worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (4).

Ijkstof: een chemische stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: (i) (een) constante en betrouwbare bron(nen); (ii) een structurele en functionele gelijkenis met de klasse chemische stoffen die getest wordt; iii) bekende fysisch-chemische kenmerken; (iv) ondersteunende gegevens over bekende effecten; en (v) een bekende werkzaamheid binnen het bereik van de gewenste respons.

▼M7

Irreversibele effecten op ogen: zie „ernstig oogletsel” en „VN-GHS-categorie 1”.

Medium-/oplosmiddelcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of medium, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of medium opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten negatieve controle, toont het ook aan of het oplosmiddel of medium met het testsysteem interageert.

Mengsel: een mengsel of een oplossing bestaande uit twee of meer stoffen waarin deze stoffen geen reactie met elkaar aangaan (4).

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie”. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt.

Negatieve controle: een onbehandeld monster dat alle bestanddelen van een testsysteem bevat. Dit monster wordt tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt om te bepalen of het oplosmiddel interageert met het testsysteem.

Niet ingedeeld: stoffen die niet zijn geclassificeerd voor oogirritatie (VN-GHS-categorie 2) of ernstig oogletsel (VN-GHS-categorie 1). Verwisselbaar met „VN-GHS Geen categorie”.

Oogirritatie: het ontstaan van veranderingen in het oog na het aanbrengen van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog, die binnen 21 dagen na het aanbrengen volledig reversibel zijn. Verwisselbaar met „Reversibele effecten op ogen” en met „VN-GHS-categorie 2” (4).

Oppervlakteactieve stof: ook genoemd „agens dat inwerkt op de oppervlakte”; dit is een stof, zoals een detergent, die de oppervlaktespanning van een vloeistof kan verlagen en het zo mogelijk maakt dat de vloeistof gaat schuimen of in vaste stoffen doordringt; ook bekend als een bevochtigingsmiddel.

Percentage vals-negatieve uitslagen: het percentage van alle positieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Percentage vals-positieve uitslagen: het percentage van alle negatieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een chemische stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positieve-controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de „hevige irritatie”-respons niet buitensporig zijn.

▼M7

Reversibele effecten op de ogen: zie „oogirritatie” en „VN-GHS-categorie 2”.

Spleetlampmicroscoop: een instrument dat wordt gebruikt om het oog rechtstreeks te onderzoeken met een binoculaire microscoop die een driedimensionaal, rechtopstaand beeld oplevert. In de ICE-testmethode wordt dit instrument gebruikt om de voorste structuren van het kippenoog te zien alsook om de corneale dikte objectief te kunnen meten met een aangehechte dieptemeter.

Stof: chemische elementen en verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het product en alle onzuiverheden ten gevolge van het productieprocédé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd (4).

Teststof: Alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

Top-downbenadering: een trapsgewijze benadering die gebruikt wordt voor een chemische stof waarvan wordt vermoed dat deze ernstig oogletsel veroorzaakt, die begint met het onderscheiden van chemische stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken (positief resultaat) van andere chemische stoffen (negatief resultaat).

Trapsgewijze teststrategie: een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende tests niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze sequentiële testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

VN-GHS-categorie 1: zie „ernstig oogletsel” en/of „irreversibele effecten op ogen”.

VN-GHS-categorie 2: zie „oogirritatie” en/of „reversibele effecten op het oog”.

VN-GHS Geen categorie: Stoffen die niet voldoen aan de voorwaarden voor indeling in VN-GHS-categorie 1 of 2 (2A of 2B). Verwisselbaar met „Niet ingedeeld”.

▼M7

Aanhangsel 2

CHEMISCHE STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING VOOR DE ICE-TESTMETHODE

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van een testmethode die deze testmethode volgt, moeten laboratoria hun technische bekwaamheid aantonen door een correcte identificatie van de gevarenclassificatie voor de ogen van de 13 chemische stoffen die in tabel 1 worden aangeraden. Deze chemische stoffen werden geselecteerd om de mogelijke responsen voor gevaren voor de ogen weer te geven, op basis van de resultaten van de in-vivo-oogtest bij konijnen (TG 405) en het VN-GHS-classificatiesysteem (bv. VN-GHS-categorieën 1, 2A, 2B of geen categorie) (4) (6). Andere selectiecriteria waren dat stoffen commercieel beschikbaar zijn, dat er in-vivoreferentiegegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn, en dat er gegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn van de ICE-in-vitromethode. Er zijn referentiegegevens beschikbaar in het SSD (5) en in de Background Review Documents van het ICCVAM voor de ICE-testmethode (9).

Tabel 1

Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met ICE

Chemische stof	CAS RN	Chemische klasse ([1])	Fysische vorm	In-vivoclassificatie ([2])	In-vitroclassificatie ([3])
Benzalkoniumchloride (5 %)	8001-54-5	Onium-verbinding	Vloeistof	Categorie 1	Categorie 1
Chloorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	Vaste stof	Categorie 1	Categorie 1
Dibenzoyl-L-wijnsteenzuur	2743-38-6	Carbonzuur, ester	Vaste stof	Categorie 1	Categorie 1
Imidazool	288-32-4	Heterocyclisch	Vaste stof	Categorie 1	Categorie 1
Trichloorazijn-zuur (30 %)	76-03-9	Carbonzuur	Vloeistof	Categorie 1	Categorie 1
2,6-Dichloor-benzoylchloride	4659-45-4	Acylhalogenide	Vloeistof	Categorie 2A	Er kunnen geen voorspellingen worden gedaan ([4])
Ammoniumnitraat	6484-52-2	Anorganisch zout	Vaste stof	Categorie 2A ([5])	Er kunnen geen voorspellingen worden gedaan ([4])
Ethyl-2-methylacetoacetaat	609-14-3	Keton, ester	Vloeistof	Categorie 2B	Er kunnen geen voorspellingen worden gedaan ([4])
Dimethylsulfoxide	67-68-5	Organische zwavelverbinding	Vloeistof	Geen categorie	Geen categorie
Glycerol	56-81-5	Alcohol	Vloeistof	Geen categorie	Geen categorie (grensgeval)
Methylcyclopentaan	96-37-7	Koolwaterstof (cyclisch)	Vloeistof	Geen categorie	Geen categorie
n-Hexaan	110-54-3	Koolwaterstof (acyclisch)	Vloeistof	Geen categorie	Geen categorie

▼M7

Chemische stof	CAS RN	Chemische klasse (1)	Fysische vorm	In-vivoclassificatie (2)	In-vitroclassificatie (3)
Triacetine	102-76-1	Lipiden	Vloeistof	Niet ingedeeld	Geen categorie

Afkortingen: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number.

(1) Scheikundige klassen werden toegekend aan elke teststof aan de hand van een standaard classificatieschema, gebaseerd op het classificatiesysteem National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (beschikbaar op: http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Gebaseerd op de resultaten van de in-vivo-oogtest op konijnen (OESO TG 405) en aan de hand van de VN-GHS (4) (6).

(3) Op basis van de resultaten in ICE zoals beschreven in tabel 6.

(4) Combinatie van ICE-scores met uitzondering van die scores die zijn beschreven in tabel 6 voor de identificatie van GHS Geen categorie en GHS-categorie 1 (zie tabel 6).

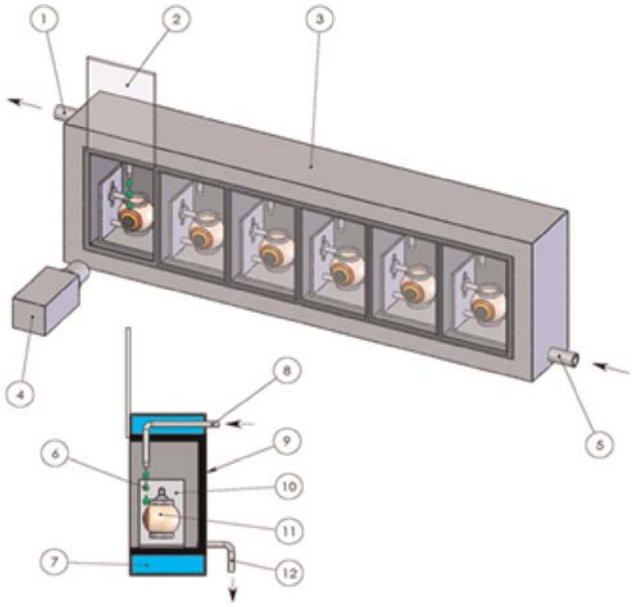
(5) Indeling in categorie 2A of 2B hangt af van de interpretatie van het VN-GHS-criterium voor het onderscheiden van deze twee categorieën, d.w.z. 1 van 3 of 2 van 3 dieren met effecten op dag 7 nodig voor indeling in categorie 2A. Het in-vivo-onderzoek omvatte 3 dieren. Alle eindpunten behalve roodheid van de conjunctiva in één dier herstelden tot een score van nul op dag 7 of eerder. Het ene dier dat op dag 7 niet volledig was hersteld, had een score van 1 (op dag 7) voor de roodheid van de conjunctiva, die volledig was hersteld op dag 10.

▼M7

Aanhangsel 3

DIAGRAMMEN VAN HET ICE-SUPERFUSIEAPPARAAT EN DE OOGKLEMMEN

(Zie Burton et al. (18) voor aanvullende algemene beschrijvingen van het superfusieapparaat en de oogklem)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Item nr.	Beschrijving	Item nr.	Beschrijving
1	Warmwaterafvoer	9	Compartiment
2	Schuifdeur	10	Ooghouder
3	Superfusieapparaat	11	Kippenoog
4	Optisch meetinstrument	12	Afvoer zoutoplossing
5	Warmwatertoevoer	13	Stelschroef
6	Zoutoplossing	14	Verstelbare bovenarm
7	Warm water	15	Vaste onderarm
8	Toevoer zoutoplossing		

▼M7

B.49. IN-VITROMICRONUCLEUSTEST BIJ ZOOGDIERCELLEN

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 487 (2016) van de OESO. Zij maakt deel uit van een reeks testmethoden op het gebied van de genetische toxicologie. Er is een OESO-document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van deze testrichtlijnen (1).

De in-vitromicronucleustest (MNvit) is een genotoxiciteitstest waarmee micronuclei (MN) in het cytoplasma van interfasecellen worden opgespoord. Micronuclei kunnen ontstaan uit acentrische chromosoomfragmenten (d.w.z. zonder centromeer) of volledige chromosomen die tijdens het anafasestadium van de celdeling niet naar de polen kunnen migreren. De MNvit-test is dan ook een in-vitromethode die een omvattende basis biedt om het potentieel voor chromosoombeschadiging te onderzoeken in vitro, omdat zowel aneugenen als clastogenen kunnen worden opgespoord (2) (3) in cellen die tijdens of na blootstelling aan de teststof celdeling hebben ondergaan (zie punt 13 voor meer informatie). Micronuclei vertonen schade die is doorgegeven aan dochtercellen, terwijl in metafasecellen gescoorde chromosoomafwijkingen mogelijk niet doorgegeven worden. In beide gevallen zijn de veranderingen mogelijk niet verenigbaar met het overleven van de cellen.

Bij deze testmethode (TM) mogen protocollen met en zonder de actinepolymerisatieremmer cytochalasine B (cytoB) worden gebruikt. De toevoeging van cytoB voor de mitose, maakt identificatie en analyse mogelijk van de micronuclei in cellen die één mitose hebben voltooid, omdat dergelijke cellen binucleair zijn (4) (5). Met deze testmethode is het ook mogelijk protocollen zonder cytokineseblokkering te gebruiken op voorwaarde dat er bewijzen zijn dat de geanalyseerde celpopulatie mitose heeft ondergaan.

De MNvit-test kan niet alleen worden gebruikt om chemische stoffen te identificeren die micronuclei induceren, maar het gebruik van de immunochemische labeling van kinetochoren of hybridisatie met centromere/telomere proben (fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)) kan ook informatie verstrekken over de mechanismen van chromosoombeschadiging en de vorming van micronuclei (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Deze labeling- en hybridisatieprocedures kunnen worden gebruikt wanneer sprake is van een toename van micronucleivorming en de onderzoeker wenst te bepalen of die toename het gevolg is van clastogene en/of aneugene gebeurtenissen.

Omdat micronuclei in interfasecellen op relatief objectieve wijze kunnen worden beoordeeld, hoeft het laboratoriumpersoneel alleen het aantal binucleaire cellen — wanneer cytoB wordt gebruikt — en het aantal cellen met micronuclei — in alle gevallen — na te gaan. Bijgevolg kunnen de objectglaasjes vrij snel worden gescoord en kan de analyse worden geautomatiseerd. Zo wordt het in de praktijk mogelijk om niet honderden, maar duizenden cellen per behandeling te scoren, hetgeen de test krachtiger maakt. Aangezien micronuclei kunnen ontstaan uit achtergebleven chromosomen, is het tot slot mogelijk om stoffen op te sporen die aneuploïdie induceren en die moeilijk onderzocht kunnen worden in conventionele tests op chromosoomafwijkingen, bv. hoofdstuk B.10 van deze bijlage (18). Aan de hand van de MNvit-test is het zonder bijzondere technieken, zoals de in punt 4 beschreven FISH, echter niet mogelijk te differentiëren tussen stoffen die veranderingen in het aantal chromosomen en/of polyploïdie induceren en stoffen die clastogeniciteit induceren.

De MNvit-test is robuust en kan worden uitgevoerd in verschillende celtypen en in de aanwezigheid of afwezigheid van cytoB. Er zijn uitgebreide gegevens beschikbaar die de validiteit van de MNvit-test met behulp van diverse celtypen (culturen van cellijnen of primaire celculturen van knaagdieren) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Hieronder zijn met name begrepen de internationale valideringsstudies die zijn gecoördineerd door de Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19)

▼M7

(20) (21) (22) (23) en de verslagen van de International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). De beschikbare gegevens zijn ook opnieuw beoordeeld tijdens een retrospectieve valideringsstudie naar het gewicht van de evidentie door het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM) van de Europese Commissie, en de testmethode is door het Raadgevend wetenschappelijk comité van het ECVAM bekrachtigd als wetenschappelijk geldig (37) (38) (39).

Bij de MNvit-test op zoogdiercellen kunnen culturen van cellijnen of primaire celculturen van menselijke cellen of knaagdiercellen worden gebruikt. Omdat de achtergrondfrequentie van micronuclei van invloed zal zijn op de gevoeligheid van de test, wordt aanbevolen dat celtypen met een stabiele, vastgestelde achtergrondfrequentie van micronucleusvorming worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van hun groeivermogen in een cultuur, de stabiliteit van het karyotype (met inbegrip van het aantal chromosomen) en de frequentie van spontane micronuclei (40). Momenteel kunnen op basis van de beschikbare gegevens geen harde aanbevelingen worden gedaan, maar de gegevens wijzen erop dat het belangrijk is om bij de beoordeling van chemische gevaren rekening te houden met de *p53*-status, de genetische (karyotype) stabiliteit, het herstellend vermogen van het DNA en de oorsprong (knaagdier *versus* mens) van de voor de test geselecteerde cellen. De gebruikers van deze testmethode worden dan ook aangemoedigd om rekening te houden met de invloed van deze en andere celkenmerken op de prestaties van een cellijn bij het opsporen van de inductie van micronuclei, aangezien de kennis op dit gebied voortschrijdt.

Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt, tenzij de cellen qua metabolisme competent zijn met betrekking tot de teststoffen. Het exogene metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in vivo niet volledig nabootsen. Omstandigheden die zouden kunnen leiden tot artefactuele positieve resultaten die de genotoxiciteit van de teststoffen niet weerspiegelen, moeten worden vermeden. Het gaat dan onder meer om veranderingen in de pH (41) (42) (43) of de osmolaliteit, wisselwerking met het celkweekmedium (44) (45) of een te sterke cytotoxiciteit (zie punt 29).

Om de inductie van micronuclei te analyseren, is het van essentieel belang dat zowel in de behandelde als de onbehandelde culturen mitose heeft plaatsgevonden. Het meest informatieve stadium voor het scoren van micronuclei is in cellen die één mitose voltooid hebben tijdens of na de behandeling met de teststof. Voor gefabriceerde nanomaterialen zijn specifieke aanpassingen van deze testmethode nodig die niet in de testmethode zijn beschreven.

Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

PRINCIPE VAN DE TEST

Culturen van menselijke cellen of andere zoogdiercellen worden blootgesteld aan de teststof met en zonder een exogene metabole activeringsbron, tenzij cellen met een toereikende metaboliseringscapaciteit worden gebruikt (zie punt 19).

Tijdens of na blootstelling aan de teststof worden de cellen gekweekt gedurende een periode die lang genoeg is om ervoor te zorgen dat chromosoombeschadiging of andere effecten op de celcyclus/celdeling leiden tot de vorming van micronuclei in interfasecellen. Voor de inductie van aneuploïdie moet de teststof gewoon aanwezig zijn tijdens mitose. Geoogste en gekleurde interfasecellen worden onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei. Idealiter mogen micronuclei alleen worden gescoord in de cellen die de mitose hebben voltooid tijdens blootstelling aan de teststof of tijdens de periode na de behandeling, als een dergelijke periode wordt toegepast. In culturen die behandeld zijn met een cytokineseblokker wordt dit eenvoudig bereikt door uitsluitend binucleaire cellen te scoren. Wanneer geen

▼M7

cytokineseblokker wordt gebruikt, is het belangrijk aan te tonen dat de onderzochte cellen wellicht celdeling hebben ondergaan tijdens of na de blootstelling aan de teststof, op basis van een toename van de celpopulatie. Het is belangrijk dat alle protocollen aantonen dat celproliferatie zich zowel in de controleculturen als de behandelde culturen heeft voorgedaan, en de mate van door de teststof geïnduceerde cytoxiciteit of cytostase moet worden beoordeeld in alle culturen die voor micronuclei gescoord zijn.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Cellen

Er kunnen gekweekte primaire menselijke of van andere zoogdieren afkomstige perifere bloedlymfocyten (7) (20) (46) (47) en een aantal cellijnen van knaagdieren, zoals CHO, V79, CHL/IU en L5178Y-cellen of menselijke cellijnen zoals TK6 worden gebruikt (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (zie punt 6). Andere cellijnen zoals HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2-cellen (52) (53), A549 en primaire embryocellen van de Syrische hamster (54) zijn gebruikt bij micronucleustesten, maar zijn tot nog toe niet uitgebreid gevalideerd. Het gebruik die cellijnen en celtypen dient daarom te worden verantwoord op basis van hun aangetoonde prestaties in de test, zoals beschreven in het hoofdstuk over aanvaardbaarheidscriteria. Cyto B zou van invloed kunnen zijn op de celgroei van L5178Y en wordt daarom niet aanbevolen voor deze cellijn (23). Wanneer primaire cellen worden gebruikt moet met het oog op het dierenwelzijn worden overwogen om waar mogelijk cellen van menselijke oorsprong te gebruiken en te bemonsteren in overeenstemming met de ethische beginselen en regelgeving voor mensen.

Menselijke lymfocyten uit perifeer bloed dienen te worden verkregen van jonge (ongeveer 18-35 jaar oud) niet-rokers zonder bekende ziekten, die voor zover bekend onlangs niet zijn blootgesteld aan genotoxische stoffen (bv. chemische stoffen of ioniserende straling) op een niveau dat het aantal cellen met micronuclei dat op de achtergrond aanwezig is, zou verhogen. Dit zorgt ervoor dat de aanwezigheid van cellen met micronuclei op de achtergrond beperkt en constant blijft. Het aantal cellen met micronuclei dat standaard aanwezig is, neemt toe met de leeftijd, en deze trend is meer uitgesproken bij vrouwen dan bij mannen (55). Indien cellen van meer dan één donor voor gebruik worden gepoold, moet het aantal donors aangegeven worden. Er moet worden aangetoond dat de cellen zich vanaf het begin van de behandeling met de teststof tot aan de bemonstering van de cellen hebben gedeeld. De celculturen worden in een fase van exponentiële groei (cellijnen) gehouden of worden gestimuleerd om zich te delen (primaire culturen van lymfocyten), om de cellen in verschillende stadia van de celcyclus bloot te stellen, aangezien de gevoeligheid van de verschillende celstadia voor de teststoffen mogelijk niet bekend is. De primaire cellen die met mitogene middelen moeten worden gestimuleerd om zich te delen, zijn doorgaans niet meer gesynchroniseerd tijdens de blootstelling aan de teststof (bv. menselijke lymfocyten na 48 uur mitogene stimulatie). Het gebruik van gesynchroniseerde cellen tijdens de behandeling met de teststof wordt niet aangeraden, maar kan aanvaardbaar zijn, mits het naar behoren wordt gemotiveerd.

Media en cultuuromstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden voor de culturen (kweekvaten, vochtige atmosfeer van 5 % CO_2 indien passend, temperatuur van 37 °C). De cellijnen moeten geregeld worden gecontroleerd om na te gaan of het modale aantal chromosomen stabiel is en er geen besmetting met *mycoplasma* heeft plaatsgevonden. Indien er wel een besmetting heeft plaatsgevonden of indien het modale aantal chromosomen gewijzigd is, mogen de cellen niet worden gebruikt. De normale tijd voor de celcyclus bij de in het testlaboratorium gebruikte cellijnen of primaire culturen moet worden vastgesteld en moet overeenkomen met de gepubliceerde celkenmerken.

▼M7

Prepareren van de culturen

Cellijnen: cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de cellen in suspensies of in monolagen tot de oogsttijd exponentieel zullen blijven groeien (voor cellen die in monolagen groeien, moet bijvoorbeeld samenvloeiing worden voorkomen).

Lymfocyten: met een stollingsremmer (bv. heparine) behandeld volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten worden gekweekt (bv. 48 uur voor menselijke lymfocyten) in aanwezigheid van een mitogeen (bv. fytohemagglutinine (PHA) voor menselijke lymfocyten) om celdeling te induceren voordat ze aan de teststof en cytoB worden blootgesteld.

Metabolische activering

Exogene metabole activeringssystemen moeten worden gehanteerd bij het gebruik van cellen met ontoereikende endogene metabole capaciteit. Het meest gebruikte systeem dat standaard wordt aanbevolen, tenzij een ander systeem gerechtvaardigd is, is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren (gewoonlijk ratten) die zijn behandeld met enzyminducerende stoffen als Aroclor 1254 (56) (57) of een combinatie van fenobarbiton en b-naftoflavon (58) (59) (60). De laatste combinatie druist niet in tegen het Verdrag van Stockholm inzake persistente organische verontreinigende stoffen (61). Bovendien is aangetoond dat zij even effectief is als Aroclor 1254 voor de inducering van oxidasen met gemengde functie (58) (59) (60). De S9-fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1 tot 2 % (v/v), maar mag worden verhoogd tot 10 % (v/v) in het uiteindelijke testmedium. Het gebruik van producten die de mitotische index verlagen, en met name van calciumcomplex-vormende producten (62), dient te worden vermeden tijdens de behandeling. De keuze van het type en de concentratie van het exogene metabole activeringssysteem dat of de metabole inductor die wordt gebruikt, kan worden beïnvloed door de klasse van de te testen chemische stof.

Teststofbereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden bereid en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen direct aan het testsysteem worden toegevoegd en/of worden verdund vóór de behandeling van het testsysteem. Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moeten geschikte aanpassingen van de standaardprotocollen worden gevolgd, zoals de behandeling in gesloten vaten (63) (64) (65). Preparaten van de teststof moeten worden bereid vlak vóór de behandeling, tenzij met stabiliteitsgegevens is aangetoond dat bewaren van het preparaat aanvaardbaar is.

Testomstandigheden

Oplosmiddelen

Het oplosmiddel wordt zo gekozen dat het de oplosbaarheid van de te testen chemische stoffen vergroot zonder een negatieve invloed te hebben op het verloop van de test, bv. door veranderingen in de celgroei, aantasting van de integriteit van de teststof, reacties met kweekvaten, belemmering van het metabole activeringssysteem. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel (of kweekmedium) te overwegen. Gangbare oplosmiddelen zijn water of dimethylsulfoxide (DMSO). Over het algemeen mag de concentratie organische oplosmiddelen niet meer dan 1 % (v/v) bedragen. Als cytoB wordt opgelost in DMSO, mag de totale concentratie organisch oplosmiddel die wordt gebruikt voor zowel de teststof als cytoB niet meer dan 1 % (v/v) bedragen. Is dat niet het geval, dan moeten onbehandelde controlestoffen worden gebruikt om na te gaan of het percentage organisch oplosmiddel geen ongewenste effecten heeft. De concentratie waterige oplosmiddelen (zoutoplossing of water) mag niet meer dan 10 % (v/v) bedragen in het uiteindelijke behandelmedium. Als er andere dan de gangbare oplosmiddelen (bv. ethanol of aceton) worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze verenigbaar zijn met de teststof en het testsysteem en dat zij geen genetische toxiciteit vertonen in de gebruikte concentratie. Als die gegevens ontbreken, is

▼M7

het belangrijk ook onbehandelde controlestoffen op te nemen (zie aanhangsel 1) en om controleoplosmiddelen te gebruiken om aan te tonen dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of chromosomale effecten (zoals aneuploïdie of clastogeniciteit) induceert.

Gebruik van cytoB als cytokineseblokker

Een van de belangrijkste overwegingen bij de uitvoering van de MNvit-test is ervoor te zorgen dat de cellen die worden gescoord tijdens de behandeling of de incubatieperiode na de behandeling, als deze wordt toegepast, de mitose hebben voltooid. Micronucleusscoring dient daarom te worden beperkt tot cellen die tijdens of na behandeling mitose hebben ondergaan. CytoB is de stof die het meest wordt gebruikt om cytokinese te blokkeren, omdat zij de samenstelling van actine afremt en derhalve de scheiding van dochtercellen na mitose voorkomt, wat leidt tot de vorming van binucleaire cellen (6) (66) (67). Tegelijkertijd kan het effect van de teststof op de celproliferatiekinetiek worden gemeten bij het gebruik van cytoB. CytoB dient als cytokineseblokker te worden gebruikt wanneer menselijke lymfocyten worden gebruikt omdat de tijden voor de celcyclus tussen de donors variabel zullen zijn en omdat niet alle lymfocyten op PHA-stimulatie zullen reageren. CytoB is niet verplicht voor andere celtypen als kan worden vastgesteld dat zij deling hebben ondergaan zoals beschreven in punt 27. Bovendien wordt cytoB gewoonlijk niet gebruikt wanneer monsters met behulp van flowcytometriemethoden worden beoordeeld op micronuclei.

De geschikte cytoB-concentratie dient door het laboratorium voor elk celtype te worden bepaald om de optimale frequentie van binucleaire cellen te verkrijgen in de culturen van de oplosmiddelcontrole en de concentratie dient aantoonbaar een goede opbrengst op te leveren van binucleaire cellen die vervolgens kunnen worden gescoord. De geschikte cytoB-concentratie is doorgaans tussen 3 en 6 μg/ml (19).

Meting van celproliferatie en cytotoxiciteit en keuze van behandelingsconcentraties

Bij de bepaling van de hoogste te testen concentratie van de teststof moeten concentraties worden vermeden die kunnen leiden tot artefactuele positieve reacties, zoals reacties die bovenmatige cytotoxiciteit (zie punt 29) voortbrengen, neerslag in het cultuurmedium (zie punt 30) of uitgesproken wijzigingen in pH of osmolaliteit (zie punt 9). Indien de teststof op het ogenblik van toevoeging een uitgesproken wijziging in de pH van het medium veroorzaakt, kan de pH worden aangepast door het uiteindelijke behandelingsmedium te bufferen zodat artefactuele positieve reacties worden vermeden en passende kweekomstandigheden in stand worden gehouden.

Metingen van celproliferatie worden verricht om ervoor te zorgen dat voldoende behandelde cellen tijdens de test mitose hebben ondergaan en dat de behandelingen worden uitgevoerd met de passende mate van cytotoxiciteit (zie punt 29). Cytotoxiciteit dient te worden bepaald in het hoofdexperiment, met en zonder metabole activering, aan de hand van een passende indicatie van de celdood en -groei (zie punten 26 en 27). Hoewel een beoordeling van de cytotoxiciteit bij een eerste verkennende test nuttig kan zijn om nauwkeuriger te kunnen bepalen welke concentraties moeten worden gebruikt bij het hoofdexperiment, is een dergelijke eerste test niet verplicht. Indien deze wel wordt uitgevoerd, mag deze de meting van cytotoxiciteit in het hoofdexperiment niet vervangen.

De behandeling van culturen met cytoB en de meting van de relatieve frequenties van mononucleaire, binucleaire en multinucleaire cellen in de cultuur verschaft een nauwkeurige methode om het effect van een behandeling op de celproliferatie en de cytotoxische of cytostatische activiteit te kwantificeren (6) en zorgt ervoor dat alleen cellen microscopisch worden gescoord die zich tijdens of na de behandeling hebben gedeeld. De cytokineseblokproliferatie-index (CBPI) (6) (27)

▼M7

(68) of de replicatie-index (RI) van minstens 500 cellen per cultuur (zie aanhangsel 2 voor formules) wordt aanbevolen om de cytotoxische of cytostatische activiteit van een behandeling te ramen door de waarden in de behandelde en de controleculturen te vergelijken. De beoordeling van andere cytotoxiciteitsmarkers (bv. celintegriteit, apoptose, necrose, metafasetelling, celcyclus) kan nuttige informatie opleveren, maar mag de CBPI of RI niet vervangen.

In studies zonder cytoB moet worden aangetoond dat de cellen in de cultuur deling hebben ondergaan, opdat een significant deel van de gescoorde cellen deling heeft ondergaan tijdens of na de behandeling met de teststof, anders kunnen er vals-negatieve reacties worden gegenereerd. De meting van de relatieve populatieverdubbeling (RPD) of relatieve toename van de celpopulatie (RICC) wordt aanbevolen om de cytotoxische of cytostatische activiteit van een behandeling te ramen (17) (68) (69) (70) (71) (zie aanhangsel 2 voor formules). Bij verlengde bemonsteringstijden (bv. behandeling gedurende 1,5-2 maal de normale lengte van een celcyclus en oogst na nog eens 1,5-2 maal de normale lengte van een celcyclus, waardoor de bemonsteringstijden in het totaal langer zijn dan 3-4 maal de normale lengte van een celcyclus, zoals beschreven in de punten 38 en 39) kan de geraamde cytotoxiciteit te laag zijn bij RPD (71). Onder deze omstandigheden zou RICC een betere maat kunnen zijn of zou de evaluatie van de cytotoxiciteit na 1,5-2 maal de normale lengte van een celcyclus een bruikbare schatting kunnen zijn. De beoordeling van andere cytotoxiciteitsmarkers (bv. celintegriteit, apoptose, necrose, metafasetelling, proliferatie-index (PI), celcyclus, nucleoplasmatische bruggen of nucleaire knoppen) kan nuttige informatie opleveren, maar mag de RPD of RICC niet vervangen.

Er moeten ten minste drie testconcentraties (exclusief het oplosmiddel en positieve controles) die voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria (passende mate van cytotoxiciteit, aantal cellen enz.) worden geëvalueerd. Ongeacht het type cellen (cellijnen of primaire culturen van lymfocyten) kan bij elke geteste concentratie één behandelde cultuur worden gebruikt, maar ook duploculturen. Hoewel het gebruik van duploculturen raadzaam is, is het gebruik van één cultuur ook aanvaardbaar, mits voor één cultuur en duploculturen hetzelfde totale aantal cellen wordt gescoord. Het gebruik van één cultuur is in het bijzonder relevant wanneer meer dan 3 concentraties worden beoordeeld (zie punten 44-45). Voor de gegevensanalyse kunnen de resultaten verkregen op basis van de onafhankelijke duploculturen bij een gegeven concentratie worden gepoold. Voor teststoffen die weinig of geen cytotoxiciteit vertonen, zijn intervallen tussen de testconcentraties van ongeveer een factor 2 tot 3 doorgaans passend. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten de geselecteerde testconcentraties een interval bestrijken van een concentratie waarbij cytotoxiciteit optreedt zoals beschreven in punt 29, tot en met concentraties waarbij er matige en geen of vrijwel geen cytotoxiciteit is. Veel teststoffen vertonen een steile concentratie-responscurve, en om gegevens bij lage en matige cytotoxiciteit te verkrijgen of om in detail de dosis-responsrelatie te bestuderen zullen dichter bij elkaar liggende concentraties en/of meer dan drie concentraties moeten worden gebruikt (één cultuur of duplobepalingen), in het bijzonder in situaties waarin een herhalingsexperiment vereist is (zie punt 60).

Als de maximumconcentratie is gebaseerd op de cytotoxiciteit, moet bij de hoogste concentratie worden gestreefd naar 55 ± 5 % cytotoxiciteit, gebruikmakend van de aanbevolen cytotoxiciteitsparameters (d.w.z. een verlaging bij RICC en RPD voor cellijnen wanneer geen cytoB wordt gebruikt en een verlaging bij CBPI en RI wanneer cytoB wordt gebruikt, naar 45 ± 5 % van de tegelijkertijd gemeten negatieve controle) (72). Bij de interpretatie van positieve resultaten moet ervoor worden gezorgd dat deze niet alleen worden gevonden in het hogere deel van dit 55 ± 5 % cytotoxiciteitsbereik (71).

▼M7

Voor slecht oplosbare teststoffen die bij lagere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens niet cytotoxisch zijn, moet de hoogste geanalyseerde concentratie troebelheid of een met het oog of met behulp van een omgekeerde microscoop aan het eind van de behandeling met de teststof zichtbaar neerslag opleveren. Zelfs indien cytotoxiciteit optreedt boven de oplosbaarheidsgrens, is het raadzaam de test uit te voeren bij slechts één concentratie die troebelheid of een zichtbaar neerslag oplevert, omdat het neerslag kan leiden tot artefactuele effecten. Bij de concentratie die neerslag oplevert, moet ervoor worden gezorgd dat het neerslag de uitvoering van de test (bv. kleuring of scoring) niet verstoort. Het kan nuttig zijn om voorafgaand aan het experiment de oplosbaarheid in het kweekmedium te bepalen.

Indien geen neerslag of beperkende cytotoxiciteit wordt waargenomen, moet de hoogste testconcentratie overeenkomen met de laagste van de volgende waarden: 10 mM, 2 mg/ml of 2 µl/ml (73) (74) (75). Wanneer de samenstelling van de teststof niet vastgesteld is, bv. in geval van een stof van onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten of biologische materialen (UVCB) (76), een milieu-extract enz., moet de hoogste concentratie bij het ontbreken van voldoende cytotoxiciteit mogelijk hoger zijn (bv. 5 mg/ml) om de concentratie van elk van de componenten te verhogen. Er zij echter opgemerkt dat deze eisen voor geneesmiddelen voor menselijk gebruik anders kunnen zijn (93).

Controles

Voor elk oogsttijdstip dienen gelijktijdige negatieve controles (zie punt 21) in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel wordt toegediend en die verder op dezelfde manier worden behandeld als de culturen met teststof.

Gelijktijdige positieve controles zijn nodig om aan te tonen dat het laboratorium in staat is om onder de omstandigheden van het gebruikte testprotocol en de doeltreffendheid van het exogene metabole activeringssysteem, indien van toepassing, clastogenenen aneugenen te identificeren. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen worden gegeven in tabel 1 hieronder. Er kunnen ook alternatieve positieve controlestoffen worden gebruikt, indien dat wordt gemotiveerd.

Op dit ogenblik zijn er geen aneugenen bekend die metabole activering nodig hebben voor hun genotoxische activiteit (17). Omdat in-vitrogenotoxiciteitstests op zoogdiercellen voldoende gestandaardiseerd zijn voor de korte behandelingen die gelijktijdig met en zonder metabole activering met dezelfde behandelingsduur worden toegepast, kan het gebruik van positieve controles worden beperkt tot een clastogeen dat metabole activering nodig heeft. In dat geval zal een enkele clastogene positieve controlerespons zowel de werking van het metabole activeringssysteem als het reactievermogen van het testsysteem aantonen. Een langlopende behandeling (zonder S9) moet echter haar eigen positieve controle hebben, omdat de behandelingsduur zal afwijken van de test waarbij metabole activering wordt toegepast. Als een clastogeen wordt geselecteerd als enige positieve controle voor een korte behandeling met en zonder metabole activering, dient een aneugeen te worden geselecteerd voor de langdurige behandeling zonder metabole activering. In cellen die qua metabolisme competent zijn en geen S9 nodig hebben, dienen positieve controles voor zowel clastogeniciteit als aneugeniciteit te worden gebruikt.

Elke positieve controle moet worden gebruikt bij een of meer concentraties waarvoor een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht, om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen (d.w.z. de effecten zijn duidelijk maar de gecodeerde objectglaasjes zijn niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar), en de respons dient niet in het gedrang te komen door een mate van cytotoxiciteit die de in deze testmethode gespecificeerde grenzen overschrijdt.

▼M7

Tabel 1

Aanbevolen referentiestoffen voor het beoordelen van de bekwaamheid van laboratoria en voor het selecteren van positieve controles

Categorie	Chemische stof	CAS RN
1. **Clastogenen werkzaam zonder metabolische activering**		
	Methylmethaansulfonaat	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	4-Nitrochinoline-N-oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. **Clastogenen waarvoor metabolische activering vereist is**		
	Benzo(a)pyreen	50-32-8
	Cyclofosfamide	50-18-0
3. **Aneugenen**		
	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9

PROCEDURE

Behandelingsschema

Voor een maximale kans op detectie van een aneugeen of clastogeen dat actief is in een specifiek stadium in de celcyclus, is het belangrijk dat voldoende aantallen cellen tijdens alle stadia van hun celcyclus met de teststof worden behandeld. Alle behandelingen dienen te beginnen en te eindigen terwijl de cellen exponentieel groeien en de cellen dienen te blijven groeien tot op het moment van bemonstering. Het behandelingsschema voor cellijnen en primaire celculturen kan daarom enigszins afwijken van dat voor lymfocyten, die mitogene stimulatie nodig hebben om hun celcyclus te starten (17). Voor lymfocyten is het het meest doeltreffend om met de behandeling met de teststof te starten 44-48 uur na de PHA-stimulatie, wanneer de cellen asynchroon delen (6).

Uit gepubliceerde gegevens (19) is gebleken dat de meeste aneugenen en clastogenen worden gedetecteerd na een korte behandelingsperiode van 3 tot 6 uur in aanwezigheid en in afwezigheid van S9, waarna de teststof wordt verwijderd en monsters worden genomen na een periode die overeenkomt met ongeveer 1,5 tot 2,0 maal de normale lengte van een celcyclus vanaf het begin van de behandeling (7).

Voor een gedegen evaluatie, die nodig is om een negatief resultaat vast te stellen, moet het experiment onder elk van de drie volgende omstandigheden worden verricht, met een kortlopende behandeling zowel met als zonder metabole activering en een langlopende behandeling zonder metabole activering (zie de punten 56, 57 en 58):

— Cellen worden gedurende 3-6 uur blootgesteld aan de teststof zonder metabole activering en bemonsterd op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5 tot 2,0 maal de normale lengte van een celcyclus na het begin van de behandeling (19),

— Cellen worden gedurende 3-6 uur blootgesteld aan de teststof met metabole activering en bemonsterd op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5 tot 2,0 maal de normale lengte van een celcyclus na het begin van de behandeling (19),

▼M7

— Cellen worden onafgebroken blootgesteld zonder metabole activering tot de bemonstering op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5 tot 2,0 maal de normale lengte van een celcyclus.

Indien een van de hierboven genoemde experimentele omstandigheden tot een positieve respons leidt, hoeven een of meer van de andere behandelingsregimes mogelijk niet te worden onderzocht.

Als geweten is of vermoed wordt dat de teststof de duur van de celcycli beïnvloedt (bv. bij het testen van nucleosideanalogen), in het bijzonder bij p53-competente cellen (35) (36) (77), kunnen de bemonsterings- of hersteltijden worden verlengd met maximaal 1,5 tot 2,0 maal de normale lengte van een celcyclus (*d.w.z.* tot een totaal van 3,0 tot 4,0 maal de normale lengte van een celcyclus vanaf het begin van de korte en langdurige behandelingen). Deze keuzes zijn bedoeld voor situaties waarin ongerustheid kan bestaan over mogelijke interacties tussen de teststof en cytoB. Wanneer verlengde bemonsteringstijden (d.w.z. een kweektijd van 3,0 tot 4,0 maal de normale lengte van een celcyclus) worden gehanteerd, dient ervoor te worden gezorgd dat de cellen nog steeds actief delen. Voor lymfocyten kan de exponentiële groei bijvoorbeeld afnemen 96 uur na de stimulatie en kunnen cellen in monolaagculturen confluent worden.

De voorgestelde celbehandelingsschema's zijn samengevat in tabel 2. Deze algemene behandelingsschema's kunnen worden gewijzigd (en moeten worden gemotiveerd) afhankelijk van de stabiliteit of reactiviteit van de teststof of de bijzondere groeikenmerken van de gebruikte cellen.

Tabel 2

Celbehandeling en oogsttijdstippen voor de MNvit-test

Lymfocyten, primaire cellen en cellijnen behandeld met cytoB	+ S9 Korte behandeling	3-6 uur behandelen in aanwezigheid van S9; de S9 en het behandelingsmedium verwijderen; vers medium en cytoB toevoegen; oogsten op 1,5 tot 2,0 maal de normale lengte van een celcyclus vanaf het begin van de behandeling.
	– S9 Korte behandeling	3-6 uur behandelen; het behandelingsmedium verwijderen; vers medium en cytoB toevoegen; oogsten op 1,5 tot 2,0 maal de normale lengte van een celcyclus vanaf het begin van de behandeling.
	– S9 Verlengde behandeling	Gedurende 1,5 tot 2 normale celcycli behandelen in aanwezigheid van cytoB; oogsten aan het einde van de behandelingsperiode.
Cellijnen behandeld zonder cytoB (Identiek aan de hierboven geschetste behandelingsschema's met de uitzondering dat geen cytoB wordt toegevoegd)		

In monolaagculturen kunnen aan het einde van de 3-6 uur durende behandeling mitotische cellen (herkenbaar aan hun ronde vorm en het feit dat ze loslaten van het oppervlak) aanwezig zijn. Omdat deze mitotische cellen gemakkelijk loskomen, kunnen ze verloren gaan wanneer het medium met de teststof wordt verwijderd. Als er aanwijzingen zijn voor een aanzienlijke toename van het aantal mitotische cellen vergeleken met de controlegroepen, wat een aanwijzing is voor het waarschijnlijk plotseling stoppen van de mitose, moeten de cellen door centrifugering worden verzameld en opnieuw aan de cultuur worden toegevoegd, opdat er geen cellen die in mitose zijn, en die gevaar voor micronuclei/chromosoomafwijking lopen, op het oogsttijdstip verloren gaan.

▼M7

Oogsten van de cellen en bereiding van de objectglaasjes

Elke cultuur dient afzonderlijk te worden geoogst en verwerkt. Het prepareren van de cellen kan een hypotone behandeling inhouden, maar deze stap is niet nodig als op een andere manier toereikende cellenspreiding wordt gerealiseerd. Verschillende technieken kunnen worden gebruikt bij de bereiding van de objectglaasjes op voorwaarde dat er voor het scoren hoogwaardige celpreparaten worden verkregen. Cellen met een intact celmembraan en intact cytoplasma dienen te worden bewaard om de detectie van micronuclei en (bij de methode met cytokineseblokker) een betrouwbare identificatie van binucleaire cellen mogelijk te maken.

De objectglaasjes kunnen worden gekleurd met behulp van diverse methoden, zoals Giemsa of fluorescerende DNA-specifieke kleurstoffen. Door het gebruik van gepaste fluorescerende kleurstoffen (bv. acridine oranje (78) of Hoechst 33258 plus pyronine-Y (79)) kunnen sommige artefacten die zich bij het gebruik van niet voor DNA specifieke kleurstoffen kunnen voordoen, worden voorkomen. Antikinetochore antilichamen, FISH met pancentromere DNA-proben of geprepareerde in situ labeling met pancentromeer-specifieke primers, samen met de passende DNA-tegenkleuring, kunnen worden gebruikt om de inhoud (volledige chromosoom worden gekleurd, acentrische chromosoomfragmenten niet) van micronuclei te identificeren indien de mechanistische informatie over hun vorming van belang is (16) (17). Andere methoden voor differentiatie tussen clastogenen en aneugenen kunnen worden gebruikt indien is aangetoond dat zij doeltreffend zijn en indien zij zijn gevalideerd. Zo kan de meting van sub-2N-nuclei als hypodiploïde voorvallen met behulp van technieken zoals beeldanalyse, laserscanningcytometrie of flowcytometrie eveneens nuttige informatie opleveren voor bepaalde cellijnen (80) (81) (82). Ook morfologische waarnemingen van nuclei zouden aanwijzingen kunnen opleveren voor mogelijke aneuploïdie. Voorts zou ook een test voor chromosoomafwijkingen tijdens de metafase kunnen worden verricht, bij voorkeur op hetzelfde celtype en volgens een protocol met een vergelijkbare gevoeligheid, als nuttig instrument om te bepalen of micronuclei te wijten zijn aan chromosoombreuken (wetende dat chromosoomverlies niet zou worden opgemerkt in de test op chromosoomafwijkingen).

Analyse

Alle objectglaasjes, ook die van het oplosmiddel en de onbehandelde en (indien van toepassing) positieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Wanneer een automatisch scoringsysteem wordt gehanteerd, zoals flowcytometrie, laserscanningcytometrie of beeldanalyse, moeten passende technieken worden gebruikt om vertekening of verschuiving te beperken. Ongeacht het automatische platform dat wordt gebruikt om de micronuclei te tellen, CBPI, RI, RPD of RICC, dient er een gelijktijdige beoordeling plaats te vinden.

In met cytoB behandelde culturen moeten de micronucleusfrequenties worden geanalyseerd in ten minste 2 000 binucleaire cellen per concentratie en controle (83), gelijk verdeeld over de culturen, indien er meerdere culturen worden gebruikt. Indien er één cultuur per dosis wordt gebruikt (zie punt 28), moeten ten minste 2 000 binucleaire cellen per cultuur (83) worden gescoord in deze ene cultuur. Als er in elke concentratie aanzienlijk minder dan 1 000 binucleaire cellen per cultuur (voor meerdere culturen), of 2 000 bij gebruik van één cultuur, beschikbaar zijn voor scoring, en als er geen aanzienlijke toename van micronuclei wordt gedetecteerd, moet de test worden herhaald met behulp van meer cellen, of met minder cytotoxische concentraties, naargelang het geval. Er moet gezorgd worden dat er geen binucleaire cellen met onregelmatige vorm worden gescoord of cellen waarvan de twee nuclei sterk in grootte verschillen; ook mogen binucleaire cellen niet worden verward met slecht verspreide multinucleaire cellen. Cellen die meer dan twee hoofdnuclei bevatten, mogen niet op micronuclei worden geanalyseerd, aangezien de basismicronucleusfrequentie in deze cellen hoger kan zijn (84). Het scoren van mononucleaire cellen is aanvaardbaar indien is aangetoond dat de teststof de cytoB-activiteit verstoort. Een

▼M7

nieuwe test zonder cytoB kan in dergelijke gevallen nuttig zijn. Naast binucleaire cellen ook mononucleaire cellen scoren kan nuttige informatie opleveren (85) (86), maar is niet verplicht.

In niet met cytoB behandelde cellijnen moeten de micronuclei worden gescoord in ten minste 2 000 cellen per testconcentratie en controle (83), gelijk verdeeld over de culturen, indien er meerdere culturen worden gebruikt. Indien één cultuur per concentratie wordt gebruikt (zie punt 28), moeten ten minste 2 000 cellen per cultuur worden gescoord in deze ene cultuur. Als er in elke concentratie aanzienlijk minder dan 1 000 cellen per cultuur (voor meerdere culturen), of 2000 bij gebruik van één cultuur, beschikbaar zijn voor scoring, en als er geen aanzienlijke toename van micronuclei wordt gedetecteerd, moet de test worden herhaald met behulp van meer cellen, of met minder cytotoxische concentraties, naargelang het geval.

Wanneer cytoB wordt gebruikt, moet een CBPI of een RI worden vastgesteld om de celproliferatie te beoordelen (zie aanhangsel 2) met behulp van ten minste 500 cellen per cultuur. Wanneer de behandelingen worden uitgevoerd zonder cytoB, is het essentieel dat er bewijs wordt geleverd dat de cellen in de cultuur hebben gedeeld, zoals besproken in punten 24-28.

Bekwaamheid van het laboratorium

Om voldoende ervaring met de test op te bouwen vooraleer wordt overgegaan tot routinematig gebruik, dient het laboratorium een reeks experimenten te hebben verricht met positieve controlestoffen die via verschillende mechanismen werken (ten minste één met en één zonder metabole activering en één die via aneugeen mechanisme werkt, gekozen uit de stoffen die zijn opgesomd in tabel 1) en met verschillende negatieve controles (waaronder onbehandelde culturen en verschillende oplosmiddelen/media). Deze positieve en negatieve controleresponsen moeten in overeenstemming zijn met de literatuur. Dit geldt niet voor laboratoria die ervaring hebben, d.w.z. die beschikken over referentiegegevens uit het verleden zoals omschreven in de punten 49-52.

Om te bewijzen dat het laboratorium bekwaam is om clastogene en aneugene stoffen op te sporen, de doeltreffendheid van het metabole activeringssysteem te bepalen en de geschiktheid van de scoringsprocedures (visuele microscopische analyse, flowcytometrie, laserscanningcytometrie of beeldanalyse) aan te tonen, dient een selectie positieve controlestoffen (zie tabel 1) te worden onderzocht met korte en langdurige behandelingen zonder metabole activering en met een korte behandeling met metabole activering. Er moet een bereik van concentraties van de geselecteerde chemische stoffen worden gekozen dat reproduceerbare en concentratiegerelateerde stijgingen tot boven het achtergrondniveau oplevert, om de gevoeligheid en het dynamisch bereik van het testsysteem aan te tonen.

Controlegegevens uit het verleden

Het laboratorium stelt vast:

— een historisch bereik en historische spreiding voor de positieve controles;

— een historisch bereik en historische spreiding voor de negatieve controles (met onbehandelde controlestoffen of oplosmiddelen).

Wanneer voor het eerst gegevens worden vergaard voor een historische spreiding voor negatieve controles, dienen gelijktijdige negatieve controles te stroken met eventuele gepubliceerde gegevens over negatieve controles. Naarmate meer gegevens uit experimenten aan de controlespreiding worden toegevoegd, dienen gelijktijdige negatieve controles idealiter binnen de controlegrens van 95 % voor die spreiding te vallen (87) (88). De databank met gegevens over negatieve controles uit het verleden van het laboratorium dient aanvankelijk te worden samengesteld op basis van minimaal 10 experimenten, maar bestaat bij voorkeur uit ten minste 20 experimenten die onder vergelijkbare testomstandigheden werden uitgevoerd. Laboratoria dienen methoden voor kwaliteitscontrole, zoals regelkaarten (bv. C-kaart of X-kaart (88)), te gebruiken om na te gaan hoe variabel hun gegevens over positieve en negatieve controles zijn en om aan te tonen dat

▼M7

zij de methodologie „onder controle” hebben (83). Verdere aanbevelingen voor het samenstellen en gebruiken van de gegevens uit het verleden (d.w.z. criteria voor het opnemen van gegevens in en het uitsluiten ervan uit de historische gegevens en de aanvaardbaarheidscriteria voor een gegeven experiment) zijn te vinden in de literatuur (87).

Eventuele aanpassingen van het testprotocol moeten worden bekeken vanuit het oogpunt van de samenhang van de gegevens met de bestaande historische controledatabanken van het laboratorium. Eventuele grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens.

Negatieve controlegegevens moeten bestaan uit de incidentie van cellen met micronuclei uit één cultuur of de som van de duploculturen zoals beschreven in punt 28. Gelijktijdige negatieve controles liggen idealiter binnen de 95 %-controlegrenzen van de verdeling van de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium (87) (88). Wanneer gegevens van gelijktijdige negatieve controles buiten de 95 %-controlegrenzen vallen, kan opneming ervan in de historische controleverdeling toch aanvaardbaar zijn, zolang deze gegevens geen extreme uitschieters zijn en er bewijs is dat het testsysteem 'onder controle' is (zie punt 50) en geen bewijs van technisch of menselijk falen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Presentatie van de resultaten

Als de techniek met de cytokineseblokker wordt gebruikt, worden alleen de frequenties van binucleaire cellen met micronuclei (onafhankelijk van het aantal micronuclei per cel) gebruikt bij de evaluatie van micronucleusinductie. De scoring van de aantallen cellen met een, twee of meer micronuclei kan afzonderlijk worden beschreven en kan nuttige informatie opleveren, maar is niet verplicht.

Gelijktijdige metingen van de cytotoxiciteit en/of cytostase voor alle behandelde, negatieve en positieve controleculturen dienen te worden vastgesteld (16). De CBPI of RI moeten worden berekend voor alle behandelde en controleculturen als meting van celcyclusvertraging wanneer de methode met de cytokineseblokker wordt gebruikt. Als er geen cytoB wordt gebruikt, moeten de RPD of de RICC worden gebruikt (zie aanhangsel 2).

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden gegeven.

Aanvaardbaarheidscriteria

Aanvaarding van een test geschiedt aan de hand van de volgende criteria:

— Toevoeging van de gelijktijdige negatieve controle aan de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium zoals beschreven in punt 50 wordt aanvaardbaar geacht.

— Gelijktijdige positieve controles (zie punt 50) moeten reacties induceren die verenigbaar zijn met de reacties in de databank met historische positieve controlegegevens van het laboratorium en moeten een statistisch significante toename opleveren vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle.

— Er moet zijn voldaan aan de criteria voor celproliferatie in de oplosmiddelcontrole (punten 25-27).

— Alle experimentele omstandigheden werden getest tenzij er één positieve resultaten opleverde (punten 36-40).

— Er kan een afdoend aantal cellen en concentraties worden geanalyseerd (punten 28 en 44-46).

▼M7

— De criteria voor de selectie van de hoogste concentratie zijn consistent met de criteria beschreven in de punten 24-31.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk positief beschouwd als in een of meer van de onderzochte experimentele omstandigheden (zie punten 36-39):

— ten minste één van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle (89);

— de stijging verband houdt met de dosis in ten minste een experimentele omstandigheid bij beoordeling met een passende trendtoets (zie punt 28);

— een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen; zie punt 52).

Wanneer aan al deze criteria is voldaan, wordt de teststof geacht chromosoombreuken en/of -winst of -verlies te kunnen veroorzaken in dit testsysteem. In de literatuur zijn eveneens aanbevelingen te vinden voor de meest geschikte statistische methoden (90) (91) (92).

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt de teststof als duidelijk negatief beschouwd als in alle onderzochte experimentele omstandigheden (zie punten 36-39):

— geen van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

— er geen concentratiegerelateerde toename is bij evaluatie met een geschikte trendtoets,

— alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens vallen (bv. op Poisson-verdeling gebaseerde 95 %-controlegrenzen; zie punt 52).

De teststof wordt in dat geval geacht geen chromosoombreuken en/of -winst of -verlies te kunnen veroorzaken in dit testsysteem. In de literatuur zijn eveneens aanbevelingen te vinden voor de meest geschikte statistische methoden (90) (91) (92).

Een duidelijk positieve of negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

Indien de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is zoals hierboven beschreven, en/of om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen, moeten de gegevens door een deskundige en/of nader onderzoek worden beoordeeld. Het scoren van aanvullende cellen (indien van toepassing) of het uitvoeren van een herhalingsexperiment onder mogelijk aangepaste experimentele omstandigheden (bv. concentratie-intervallen, andere omstandigheden bij metabole activering [d.w.z. S9-concentratie of S9-herkomst]) kan nuttig zijn.

In zeldzame gevallen zal de gegevensreeks zelfs na bijkomend onderzoek geen definitief positief of negatief resultaat opleveren en moet worden besloten dat het resultaat twijfelachtig is.

Teststoffen die micronuclei in de MNvit-test induceren, kunnen dit doen omdat ze chromosoombreuken, chromosoomverlies of een combinatie van beide induceren. Verdere analyse aan de hand van antikinetochore antilichamen, centromeerspecifieke in-situproben of andere methoden mogen worden gebruikt om vast te stellen of het mechanisme van micronucleusinductie te wijten is aan clastogene en/of aneugene activiteit.

▼M7

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— bron, partijnummer, uiterste gebruiksdatum, indien beschikbaar;

— stabiliteit van de teststof, indien bekend;

— reactiviteit van de teststoffen met het oplosmiddel/medium of de celcultuurmedia;

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel, indien bekend;

— meting van pH, osmolaliteit en neerslag in het kweekmedium waaraan de teststof werd toegevoegd, indien van toepassing.

Stof die uit één component bestaat:

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Oplosmiddel:

— motivering van de keuze van het oplosmiddel;

— percentage oplosmiddel in het uiteindelijke kweekmedium.

Cellen:

— type en bron van de gebruikte cellen;

— bruikbaarheid van het gebruikte celtype;

— voor cellijnen, afwezigheid van mycoplasma;

— voor cellijnen, informatie over lengte van de celcyclus of proliferatie-index;

— wanneer lymfocyten worden gebruikt, het geslacht van de bloeddonoren, de leeftijd en andere relevante informatie over de donor, volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten, gebruikt mitogeen;

— normale tijd voor de celcyclus (negatieve controle);

— voor cellijnen, aantal overentingen, indien beschikbaar;

— voor cellijnen, methoden om de celculturen in leven te houden;

— voor cellijnen, modaal aantal chromosomen.

▼M7

Testomstandigheden:

— naam van de cytokineseblokker (bv. cytoB), indien gebruikt, de concentratie ervan en de blootstellingsduur;

— concentratie van de teststof, uitgedrukt als uiteindelijke concentratie in het kweekmedium (bv. μg of mg/ml, of mM van het kweekmedium);

— achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, met inbegrip van gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid;

— samenstelling van het medium en CO_2-concentratie, indien van toepassing, vochtigheidsgraad;

— toegevoegde concentratie (en/of volume) van het oplosmiddel en de teststof in het kweekmedium;

— incubatietemperatuur en -tijd;

— duur van de behandeling;

— oogsttijdstip na behandeling;

— celdichtheid bij het enten, indien van toepassing;

— aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem (bron van S9, methode voor de bereiding van de S9-mix, de concentratie of het volume van de S9-mix en S9 in het uiteindelijke kweekmedium, kwaliteitscontroles van S9 (zoals enzymactiviteit, steriliteit, metaboliseringscapaciteit));

— positieve en negatieve controlestoffen, uiteindelijke concentraties, omstandigheden en duur van de behandeling en de herstelperiode;

— gebruikte methoden voor de bereiding van de objectglaasjes en kleuringstechniek;

— criteria voor het scoren van cellen met micronuclei (selectie van analyseerbare cellen en micronucleusidentificatie);

— aantal geanalyseerde cellen;

— methoden voor de meting van de cytotoxiciteit;

— eventuele aanvullende informatie die betrekking heeft op de cytotoxiciteit en gebruikte methode;

— criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;

— toegepaste methode(n) van statistische analyse;

— methoden, zoals gebruik van antikinetochore antilichamen of specifieke pancentromere proben, om te bepalen of micronuclei hele chromosomen of chromosoomfragmenten bevatten, indien van toepassing;

— gebruikte methoden voor het bepalen van de pH, osmolaliteit en neerslag.

Resultaten:

— definitie van aanvaardbare cellen voor analyse;

— als er geen cytoB wordt gebruikt, het aantal behandelde cellen en het aantal geoogste cellen voor elke cultuur in het geval van cellijnen;

▼M7

— metingen van de gebruikte cytotoxiciteit, zoals CBPI of RI in het geval van de methode met cytokineseblokker; RICC of RPD wanneer er geen methode met cytokineseblokker wordt gebruikt; eventuele andere waarnemingen (bv. confluentie van cellen, apoptose, necrose, metafasetelling, frequentie van binucleaire cellen);

— tekenen van neerslag en tijdstip van de bepaling;

— gegevens over de pH en de osmolaliteit van het behandelingsmedium, indien bepaald;

— distributie van mono-, bi- en multinucleaire cellen indien een methode met cytokineseblokker wordt toegepast;

— aantal cellen met micronuclei, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur, en bepaling of deze behoren tot binucleaire of mononucleaire cellen, indien van toepassing;

— indien mogelijk het verband tussen concentratie en respons;

— gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles (concentraties en oplosmiddelen);

— gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking en 95 %-controlegrenzen voor de verdeling, alsook het aantal gegevens;

— statistische analyses; eventuele p-waarden;

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

LITERATUUR

(1) OESO (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OESO, Parijs.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, blz. 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, blz. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, blz. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, blz. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, blz. 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, blz. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, blz. 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, blz. 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, blz. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, blz. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, blz. 153-163.

(18) Hoofdstuk B.10 van deze bijlage: *in-vitrotest op chromosoomafwijkingen in zoogdiercellen*,.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, blz. 13-36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, blz. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, blz. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, blz. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, blz. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, blz. 187-208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, blz. 45-59.

▼M7

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, blz. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, blz. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, blz. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, blz. 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, blz. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, blz. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, blz. 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, blz. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, blz. 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, blz. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, blz. 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 25th meeting, 16-17 november 2006, beschikbaar op: 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. Beschikbaar op: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, blz. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from CPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, blz. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, blz. 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, blz. 789-886.

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

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, blz. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, blz. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, blz. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, blz. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, blz. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, blz. 555-560.

(51) Bazin, E. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, blz. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, blz. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, blz. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, blz. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 37/1, blz. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, blz. 173-215.

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

▼**M7**

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, blz. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, blz. 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, blz. 51-59.

(61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Beschikbaar op: 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, blz. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, blz. 91-103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, blz. 795-801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, blz. 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, blz. 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, blz. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, blz. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, blz. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, blz. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, blz. 101-107.

(73) OESO (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Beschikbaar op aanvraag.

▼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, blz. 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, blz. 36-43.

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

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, blz. 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, blz. 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, blz. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, blz. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, blz. 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, blz. 33-40.

(83) OESO (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, nr. 198, OECD Publishing, Parijs.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, blz. 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, blz. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, blz. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, blz. 87-90.

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

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, blz. 463-467.

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

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

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, blz. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Aneugeen: elke chemische stof die of elk proces dat leidt tot aneuploïdie in cellen of organismen door de wisselwerking met componenten van de mitose en meiose in de celdelingscyclus.

Aneuploïdie: elke afwijking van het normale diploïde (of haploïde) aantal chromosomen met één chromosoom of meer dan één chromosoom, maar niet met (een) volledige reeks(en) chromosomen (polyploïdie).

Apoptose: geprogrammeerde celdood, gekenmerkt door een reeks stappen die leiden tot de afbraak van cellen in door membraan samengehouden deeltjes die vervolgens worden geëlimineerd door fagocytose of door verwijdering.

Celproliferatie: toename van het aantal cellen als gevolg van mitose.

Centromeer: DNA-plek van een chromosoom waar beide chromatiden worden samengehouden en waar beide kinetochoren zij aan zij zijn aangehecht.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Concentraties: verwijzen naar uiteindelijke concentraties van de teststof in het kweekmedium.

Clastogeen: elke chemische stof die of elk proces dat structurele chromosoomafwijkingen veroorzaakt in populaties van cellen of eukaryotische organismen.

Cytokinese: deling van de cel onmiddellijk na de mitose, waarbij twee dochtercellen worden gevormd die elk één nucleus bevatten.

Cytokineseblokproliferatie-index (CBPI): de verhouding cellen na tweede deling in de behandelde populatie ten opzichte van de onbehandelde controlegroep (zie aanhangsel 2 voor formule).

Cytostase: afremming van celgroei (zie aanhangsel 2 voor formule).

Cytotoxiciteit: voor de bepalingen die aan bod komen in testmethode uitgevoerd in aanwezigheid van cytochalasine B, wordt de cytotoxiciteit geïdentificeerd als een daling van de cytokineseblokproliferatie-index (CBPI) of replicatie-index (RI) van de behandelde cellen in vergelijking met de negatieve controle (zie punt 26 en aanhangsel 2).

Voor de bepalingen die aan bod komen in testmethode uitgevoerd in afwezigheid van cytochalasine B, wordt de cytotoxiciteit geïdentificeerd als een daling van de relatieve populatieverdubbeling (RPD) of relatieve toename van de celpopulatie (RICC) van de behandelde cellen in vergelijking met de negatieve controle (zie punt 27 en aanhangsel 2).

Genotoxisch: een algemene term die alle typen DNA- of chromosoombeschadiging omvat, waaronder breuken, deleties, adducten, veranderingen en bindingen van nucleotiden, herschikkingen, genmutaties, chromosoomafwijkingen en aneuploïdie. Niet alle soorten genotoxische effecten leiden tot mutaties of stabiele chromosoombeschadiging.

Interfasecellen: cellen die zich niet in het stadium van de mitose bevinden.

Kinetochoor: een hoofdzakelijk uit eiwitten bestaande structuur die zich assembleert nabij het centromeer van een chromosoom en waar tijdens de celdeling de spoeldraden aan vastzitten, zodat de verplaatsing van de dochterchromosomen naar de polen van de dochtercellen regelmatig kan verlopen.

▼M7

Micronucleus: kleine kern die buiten en naast de hoofdkern van cellen tijdens de telofase van de mitose of meiose ontstaat door achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Mitose: deling van de celkern die doorgaans wordt ingedeeld in profase, prometafase, metafase, anafase en telofase.

Mitotische index: de verhouding tussen het aantal cellen in de metafase en het totale aantal cellen in een populatie; deze index geeft een indicatie van de snelheid waarmee deze populatie groeit.

Mutageen: produceert een erfelijke wijziging van DNA-basepaarsequentie(s) in genen of van de structuur van chromosomen (chromosoomafwijkingen).

Non-disjunctie: het feit dat de chromatiden niet uit elkaar gaan en niet afzonderlijk overgaan in de dochtercellen in ontwikkeling, wat leidt tot dochtercellen met abnormale chromosoomaantallen.

Onbehandelde controle: culturen die geen behandeling ondergaan (d.w.z. geen teststof en geen oplosmiddel) maar gelijktijdig met en op dezelfde wijze worden verwerkt als de culturen die de teststof ontvangen.

Oplosmiddelcontrole: algemene term om de controleculturen aan te duiden die uitsluitend het oplosmiddel ontvangen dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen.

p53-status: Het proteïne p53 is betrokken bij de regulering van de celcyclus, apoptose en het herstel van het DNA. Cellen met een deficiëntie aan functioneel proteïne p53, die niet in staat zijn om in antwoord op beschadigingen van het DNA de celcyclus tegen te houden of beschadigde cellen te elimineren via apoptose of andere mechanismen (bv. inductie van DNA-herstel) die verband houden met p53-functies, zouden in theorie vatbaarder moeten zijn voor genmutaties of chromosoomafwijkingen.

Polyploïdie: afwijkingen in het aantal chromosomen in cellen of organismen waarbij (een) volledige reeks(en) van chromosomen betrokken is (zijn), in tegenstelling tot een afzonderlijk chromosoom of afzonderlijke chromosomen (aneuploïdie).

Proliferatie-index (PI): methode voor cytotoxiciteitsmeting wanneer geen cytoB wordt gebruikt (zie aanhangsel 2 voor formule).

Relatieve populatieverdubbeling (RPD): methode voor cytotoxiciteitsmeting wanneer geen cytoB wordt gebruikt (zie aanhangsel 2 voor formule).

Relatieve toename van de celpopulatie (RICC): methode voor cytotoxiciteitsmeting wanneer geen cytoB wordt gebruikt (zie aanhangsel 2 voor formule).

Replicatie-index (RI): de verhouding tussen het aantal voltooide celdelingscycli in een behandelde cultuur en het aantal voltooide celdelingscycli in de onbehandelde controlecultuur, tijdens de blootstellingsperiode en het herstel (zie aanhangsel 2 voor formule).

S9-leverfractie: supernatant van leverhomogenaat na centrifugering bij 9000 g, d.w.z. ruw leverextract.

S9-mix: mix van de S9-leverfractie en cofactoren die nodig zijn voor de metabole enzymactiviteit.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M7

Aanhangsel 2

FORMULES VOOR BEOORDELING VAN DE CYTOTOXICITEIT

Wanneer cytoB wordt gebruikt, moet de evaluatie van de cytotoxiciteit uitgaan van de **cytokineseblokproliferatie-index (CBPI)** of **replicatie-index (RI)** (17) (69). De CBPI geeft het gemiddelde aantal nuclei per cel aan en kan worden gebruikt om de celproliferatie te berekenen. De RI geeft het relatieve aantal celcycli per cel in behandelde culturen tijdens de periode van blootstelling aan cytoB aan in vergelijking met controleculturen en kan worden gebruikt om het % cytostase te berekenen:

$$\% \text{ cytostase} = 100\text{-}100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

en:

T = cultuur behandeld met teststof

C = controleculturen

waarbij:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{aantal mononucl. cellen}) + (2 \times \text{aantal binucl.cellen}) + (3 \times \text{aantal multinucl.cellen}))}{(\text{totaal aantal cellen})}$$

Zo is een CBPI van 1 (alle cellen zijn mononucleair) gelijk aan 100 % cytostase.

Cytostase = 100 — RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{aantal binucl.cellen}) + (2 \times \text{aantal multinucl.cellen}))/(\text{Totaal aantal cellen})_T}{((\text{aantal binucl.cellen}) + (2 \times \text{aantal multinucl.cellen}))/(\text{Totaal aantal cellen})_C} \times 100$$

T = behandelde culturen

C = controleculturen

Zo betekent een RI van 53 % dat, in vergelijking met het aantal cellen van de controlecultuur die zich gedeeld hebben om binucleaire en multinucleaire cellen te vormen, slechts 53 % van dit aantal in de behandelde cultuur zich heeft gedeeld, d.w.z. 47 % cytostase.

Wanneer geen cytoB wordt gebruikt, wordt aanbevolen om de cytotoxiciteit te beoordelen op basis van de **relatieve toename van de celpopulatie (RICC)** of de **relatieve populatieverdubbeling (RPD)** (69), aangezien beide rekening houden met het percentage van de celpopulatie dat zich gedeeld heeft.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{toename aantal cellen in behandelde culturen}(\text{eind} - \text{begin}))}{(\text{toename aantal cellen in controleculturen}(\text{eind} - \text{begin}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{aantal populatieverdubbelingen in behandelde culturen})}{(\text{aantal populatieverdubbelingen in controleculturen})} \times 100$$

waarbij:

Populatieverdubbeling = [log (aantal cellen na behandeling ÷ aanvankelijk aantal cellen)] ÷ log 2

Zo geeft een RICC of een RPD van 53 % aan dat de cytotoxiciteit/cytostase 47 % bedraagt.

▼**M7**

Met behulp van een **proliferatie-index (PI)** kan de cytotoxiciteit worden beoordeeld door het aantal klonen te tellen dat bestaat uit 1 cel (cl1), 2 cellen (cl2), 3 tot 4 cellen (cl4) en 5 tot 8 cellen (cl8).

$$\mathrm{PI} = \frac{((1 \times \mathrm{cl1}) + (2 \times \mathrm{cl2}) + (3 \times \mathrm{cl4}) + (4 \times \mathrm{cl8}))}{(\mathrm{cl1} + \mathrm{cl2} + \mathrm{cl4} + \mathrm{cl8})}$$

De PI is ook toegepast als waardevolle en betrouwbare cytotoxiciteitsparameter voor in vitro gekweekte cellijnen in afwezigheid van cytoB (35) (36) (37) (38) en kan als nuttige aanvullende parameter worden beschouwd.

Hoe dan ook moet het aantal cellen voor behandeling hetzelfde zijn voor behandelde en negatieve controleculturen.

Terwijl RCC (d.w.z. aantal cellen in behandelde culturen / aantal cellen in controleculturen) in het verleden werd gebruikt als cytotoxiciteitsparameter, wordt dit niet langer aanbevolen, aangezien RCC de mate van cytotoxiciteit kan onderschatten.

Bij het gebruik van automatische scoringsystemen zoals flowcytometrie, laserscanningcytometrie of beeldanalyse kan het aantal cellen in de formule bijvoorbeeld worden vervangen door het aantal nuclei.

In de negatieve controleculturen dient verdubbeling van de populatie of de replicatie-index verenigbaar te zijn met de verplichting om cellen na behandeling te bemonsteren na een periode die overeenkomt met ongeveer 1,5 tot 2,0 normale celcycli.

▼M3

B.50. HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST: AA

INLEIDING

1. De OESO-richtlijnen inzake het testen van chemische stoffen (Guidelines for the Testing of Chemicals) en de daarop gebaseerde EU-testmethoden worden regelmatig herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, zich wijzigende behoeften aan regelgeving en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. De eerste testmethode (TM) (B.42) voor het bepalen van de huidsensibilisatie bij muizen, de lokale lymfkliertest (LLKT; OESO-testrichtlijn 429) is herzien (1). Er zijn publicaties verschenen met de gegevens over de validering van de LLKT en een overzicht van gerelateerd onderzoek (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). In de LLKT wordt radio-isotoop thymidine of jodium gebruikt om de proliferatie van de lymfocyten te meten en de test is daarom slechts beperkt bruikbaar indien de aankoop, het gebruik en de verwijdering van radioactief materiaal problematisch zijn. De LLKT: AA (afvoerend auriculair) (ontwikkeld door Daicel Chemical Industries, Ltd) is een niet-radioactieve aanpassing van de LLKT, waarin het adenosinetrifosfaat (ATP)-gehalte gemeten wordt via bioluminescentie, als indicator voor de proliferatie van lymfocyten. De LLKT: AA-testmethode werd door een internationaal panel voor collegiale toetsing gevalideerd, beoordeeld en aanbevolen als nuttig instrument om huidsensibiliserende en niet-huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen bepaalde beperkingen (10) (11) (12) (13). Deze TM werd ontworpen om de potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen (stoffen en mengsels) bij dieren te bepalen. In hoofdstuk B.6 van de bijlage en in OESO-testrichtlijn 406 worden proeven met cavia's gebruikt: de maximalisatietest en de Buehlertest (14). De LLKT (hoofdstuk B.42 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 429) en de twee niet-radioactieve aanpassingen, LLKT: AA (hoofdstuk B.50 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 A) en LLKT: BrdU-ELISA (hoofdstuk B.51 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 B), bieden allemaal een voordeel ten opzichte van de proeven met cavia's in B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (14) ten aanzien van een beperking en verfijning van het gebruik van dieren.

2. NET zoals de LLKT, bestudeert het LLKT: AA-onderzoek de inductiefase van huidsensibilisatie en levert kwantitatieve gegevens die voor een dosis/responsbepaling kunnen worden gebruikt. Bovendien neemt de mogelijkheid om huidsensibiliserende stoffen op te sporen zonder gebruik te maken van isotopenmerking voor DNA het risico op beroepsmatige blootstelling aan radioactiviteit en de problemen met afvalverwijdering weg. Dat maakt het dan weer mogelijk om vaker muizen te gebruiken om huidsensibiliserende stoffen op te sporen, waardoor het gebruik van cavia's in onderzoek naar huidsensibilisatie mogelijk beperkt kan worden (*i.e.* B.6; OESO-testrichtlijn 406) (14).

DEFINITIES

3. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

4. De LLKT: AA is een aangepaste LLKT-methode om potentiële huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen specifieke beperkingen. Dit houdt niet noodzakelijkerwijs in dat de LLKT: AA in alle gevallen in plaats van de LLKT of de proef met cavia's moet worden gebruikt, (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (14), maar veeleer dat de test gelijkwaardig is en als alternatief kan worden gebruikt, waarbij positieve en negatieve resultaten niet langer behoeven te worden bevestigd (10) (11). Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Die informatie zal de identiteit en de chemische structuur van de teststof bevatten; de fysisch-chemische eigenschappen ervan; de resultaten van andere in vitro of in vivo

▼M3

toxiciteitsproeven op de teststof; en toxicologische gegevens van chemische stoffen met een verwante structuur. Deze informatie moet in aanmerking genomen worden om te bepalen of de LLKT: AA geschikt is voor de teststof (gezien de incompatibiliteit van beperkte soorten chemische stoffen met de LLKT: AA [zie punt 5]) en om te helpen bij het bepalen van de dosis.

5. De LLKT: AA is een in-vivomethode en leidt er derhalve niet toe dat er bij de bepaling van allergische contactsensibilisatie geen dieren meer worden gebruikt. Deze methode kan het gebruik van dieren voor dit doel verminderen in vergelijking met de proeven met cavia's (B.6; OESO-testrichtlijn 406) (14). Bovendien wordt de manier waarop de dieren gebruikt worden voor het testen van allergische contactsensibilisatie aanzienlijk verfijnd (minder pijn en leed), aangezien er bij de LLKT: AA, in tegenstelling tot de B.6 en OESO-testrichtlijn 406, geen door provocatie geïnduceerde overgevoeligheidsreacties van de huid hoeven te worden opgewekt. Ondanks de voordelen van de LLKT: AA ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (14), zijn er bepaalde beperkingen waardoor het gebruik van B.6 of OESO-testrichtlijn 406 (bv. het testen van bepaalde metalen, valspositieve resultaten met bepaalde stoffen die de huid irriteren (zoals bepaalde oppervlakteactieve stoffen) (6) (1 en hoofdstuk B.42 van deze bijlage), oplosbaarheid van de teststof) nodig kan zijn. Daarnaast kan in het geval van chemische klassen of stoffen die functionele groepen bevatten waarvan is aangetoond dat ze als potentiële stoorfactoren (16) werken, het gebruik van proeven met cavia's nodig zijn (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406 (14). Het is aanbevolen om de beperkingen die voor de LLKT (1, en hoofdstuk B.42 van deze bijlage) werden vastgesteld, ook toe te passen op de LLKT: AA (10). Daarnaast is het gebruik van de LLKT: AA mogelijk niet geschikt om stoffen te testen die de ATP-waarden beïnvloeden (bv. stoffen met een ATP-remmende werking) of die de correcte meting van intracellulair ATP kunnen verstoren (bv. aanwezigheid van enzymen die ATP afbreken, aanwezigheid van extracellulair ATP in de lymfklier). Buiten die vastgestelde beperkingen dient de LLKT: AA toegepast te worden voor het testen van alle stoffen, tenzij die stoffen eigenschappen hebben die de nauwkeurigheid van de LLKT: AA kunnen beïnvloeden. Bovendien moet er rekening gehouden worden met mogelijke positieve grensgevallen bij de resultaten wanneer er stimuleringsindex (SI)-waarden tussen 1,8 en 2,5 verkregen worden (zie punten 31-32). Dit is gebaseerd op de valideringsdatabank van 44 stoffen, waarbij een SI ≥ 1,8 gehanteerd werd (zie punt 6) waarvoor de LLKT: AA alle 32 LLKT-sensibiliserende stoffen correct geïdentificeerd heeft, maar drie van de 12 niet-sensibiliserende stoffen uit de LLKT met SI-waarden tussen 1,8 en 2,5 onjuist geïdentificeerd heeft (d.w.z. positief grensgeval) (10). Aangezien dezelfde gegevensreeks gebruikt werd om de SI-waarden te bepalen en de voorspellende eigenschappen van de test te berekenen, kunnen de vermelde resultaten de werkelijke voorspellende eigenschappen echter overschatten.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

6. Het beginsel dat aan de LLKT: AA ten grondslag ligt, is dat sensibilisatoren induceren tot een proliferatie van lymfocyten in de lymfklieren die de afvoer verzorgen van de plaats waar de teststof wordt aangebracht. Deze proliferatie is evenredig met de dosis en de potentie van het aangebrachte allergeen en biedt een eenvoudige mogelijkheid om een kwantitatieve meting van de sensibilisering uit te voeren. De proliferatie wordt gemeten door de gemiddelde proliferatie in elke testgroep te vergelijken met de proliferatie in de met medium behandelde controlegroep (VC). De verhouding tussen de gemiddelde proliferatie in elke behandelde groep en in de overeenkomstige medium-controlegroep wordt bepaald en deze z.g. SI moet ≥ 1,8 zijn voordat een teststof nader kan worden beoordeeld als potentiële huidsensibilisator. De hierin beschreven procedures zijn gebaseerd op een methode waarbij het

▼M3

ATP-gehalte gemeten wordt via bioluminescentie (waarvan geweten is dat het verband houdt met het aantal levende cellen) (17) om een verhoogd aantal prolifererende cellen in de afvoerende auriculaire lymfklieren op te sporen (18) (19). De bioluminescentiemethode maakt gebruik van het luciferase-enzym als katalysator voor het opwekken van licht uit ATP en luciferine volgens de volgende reactie:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Light$$

De intensiteit van het uitgezonden licht is lineair evenredig met het ATP-gehalte en wordt gemeten met een luminometer. De luciferine-luciferasetest is een gevoelige methode om ATP te meten die gebruikt wordt voor uiteenlopende toepassingen (20).

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Keuze van de diersoort

7. Voor deze test worden bij voorkeur muizen gebruikt. Het valideringsonderzoek voor de LLKT: AA werd uitsluitend uitgevoerd met de CBA/J-stam, die daarom beschouwd wordt als de geprefereerde stam (12) (13). Er worden jonge volwassen vrouwtjesmuizen gebruikt, die nog geen jongen hebben gehad en niet drachtig zijn. Bij het begin van het onderzoek moeten de dieren 8-twaalf weken oud zijn, het gewichtsverschil tussen de dieren moet minimaal zijn en de afwijking mag niet groter zijn dan 20 % van het gemiddelde gewicht. Er mogen ook andere stammen of mannetjes worden gebruikt, wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn om aan te tonen dat er geen significante stam- en/of geslachtsspecifieke verschillen in de LLKT: AA-respons zijn.

Huisvesting en voeding

8. De muizen moeten in groepjes worden ondergebracht (21), tenzij een individuele behuizing van de muizen naar behoren wetenschappelijk wordt gemotiveerd. De temperatuur van de proefdierruimte dient 22 ± 3 °C te zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % zijn en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

Voorbereiding van de dieren

9. De dieren worden aselect ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren (maar niet door enigerlei vorm van oormerking) en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen. Vóór het begin van de behandeling worden alle dieren onderzocht om vast te stellen dat ze geen waarneembaar huidletsel hebben.

Bereiding van doseringsoplossingen

10. Vaste chemische stoffen moeten in oplosmiddelen/media worden opgelost of gesuspendeerd en, indien nodig, verdund vóór aanbrenging op een oor van de muis. Vloeibare chemische stoffen kunnen onverdund worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Onoplosbare chemische stoffen, zoals die gewoonlijk voorkomen in medische apparaten, moeten worden onderworpen aan een maximale extractie in een geschikt oplosmiddel om alle extraheerbare bestanddelen voor het testen vrij te maken vóór aanbrenging op een oor van de muis. Teststoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

▼M3

Betrouwbaarheidscontrole

11. Voor positieve controle gebruikte stoffen (PC's) worden gebruikt om aan te tonen dat de test correct werkt in de zin dat de test leidt tot een respons met voldoende en reproduceerbare gevoeligheid, waarbij de omvang van de respons goed gedocumenteerd is. Gelijktijdig gebruik van een PC wordt aanbevolen, omdat hiermee wordt aangetoond dat het laboratorium de competentie bezit om iedere test succesvol uit te voeren en omdat de intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en -overdraagbaarheid hiermee kan worden beoordeeld. Sommige regelgevende autoriteiten vereisen ook een PC voor elk onderzoek en gebruikers worden daarom aangespoord om de relevante autoriteiten te raadplegen alvorens zij de LLKT: AA uitvoeren. Derhalve wordt het routinematige gelijktijdige gebruik van een PC aangemoedigd, zodat geen noodzaak bestaat om aanvullende dierproeven uit te voeren om te voldoen aan dergelijke vereisten die kunnen voortkomen uit het gebruik van een periodieke PC (zie punt 12). De PC moet een positieve LLKT: AA-respons opleveren bij een blootstellingsniveau waarbij in vergelijking met de negatieve controlegroep een stijging van de SI met $\geq 1{,}8$ wordt verwacht. De dosis van de PC moet zo worden gekozen dat de stof geen overmatige huidirritatie of systemische toxiciteit veroorzaakt en de inductie reproduceerbaar is, maar niet buitensporig (d.w.z. een SI > 10 zou buitensporig zijn). De PC die de voorkeur genieten zijn 25 % hexylcinnamaldehyde (Chemical Abstracts Service [CAS]-nummer 101-86-0) en 25 % eugenol (CAS-nummer 97-53-0,) in aceton: olijfolie (4:1, v/v). Onder bepaalde omstandigheden kunnen andere PC's worden gebruikt die aan bovengenoemde criteria voldoen, mits een afdoende motivering wordt gegeven.

12. Hoewel het gelijktijdige gebruik van een PC-groep aanbevolen wordt, kunnen er situaties zijn waarin periodiek testen (d.w.z. met intervallen $\leq$ zes maanden) van de PC toereikend kan zijn voor laboratoria die de LLKT: AA regelmatig uitvoeren (d.w.z. de LLKT-AA uitvoeren met een frequentie van niet minder dan eenmaal per maand) en die een historische PC-databank hebben die aantoont dat het laboratorium in staat is om reproduceerbare en nauwkeurige uitkomsten met PC's te verkrijgen. Toereikende ervaring met de LLKT: AA kan worden aangetoond door consequent positieve uitkomsten te genereren in ten minste tien onafhankelijke tests die binnen een redelijke tijdspanne (d.w.z. binnen één jaar) worden uitgevoerd.

13. Gelijktijdig gebruik van een PC-groep is verplicht in geval van een procedurewijziging in de LLKT: AA (bv. wijziging van gekwalificeerd personeel, wijziging in de materialen en/of reagentia van de testmethode, wijziging van de testapparatuur, wijziging van de bron van proefdieren), en dergelijke wijzigingen moeten in laboratoriumverslagen worden gedocumenteerd. Het effect van dergelijke wijzigingen op de nauwkeurigheid van de eerder opgerichte historische databank moet in overweging worden genomen om te bepalen of het nodig is een nieuwe historische databank op te richten, teneinde consistentie in de documentatie van de PC-uitkomsten te waarborgen.

14. Onderzoekers dienen zich ervan bewust te zijn dat de beslissing om een PC-onderzoek op periodieke basis uit te voeren in plaats van gelijktijdig, consequenties heeft voor de nauwkeurigheid en aanvaardbaarheid van negatieve onderzoeksuitkomsten die zijn gegenereerd zonder gelijktijdig gebruik van een PC tijdens het interval tussen opeenvolgende periodieke PC-onderzoeken. Indien bijvoorbeeld een valsnegatieve uitkomst is verkregen in het periodieke PC-onderzoek, kunnen negatieve resultaten voor teststoffen die zijn verkregen in het interval tussen het laatste aanvaardbare periodieke PC-onderzoek en het onaanvaardbare PC-onderzoek in twijfel worden getrokken. De implicaties van deze uitkomsten moeten zorgvuldig in overweging worden genomen om te bepalen of PC's gelijktijdig moeten worden gebruikt of dat alleen periodieke PC-onderzoeken moeten worden uitgevoerd. Tevens moet overwogen worden om minder dieren te gebruiken in de gelijktijdige PC-groep, indien dit wetenschappelijk gerechtvaardigd is en indien het laboratorium aantoont, op basis van laboratoriumspecifieke historische gegevens, dat minder muizen gebruikt kunnen worden (22).

▼M3

15. Hoewel de PC moet worden getest in een medium waarvan bekend is dat het een consequente respons oplevert (*bv* aceton: olijfolie; 4:1, v/v), kan de regelgeving in bepaalde gevallen vereisen dat de tests ook in een ongebruikelijk medium (een klinisch/chemisch relevante formulering) worden uitgevoerd (23). Indien de gelijktijdig gebruikte PC in een ander medium wordt getest dan de teststof, moet een afzonderlijke met medium behandelde groep voor de gelijktijdig gebruikte PC worden gebruikt.

16. In gevallen waarin teststoffen van een specifieke chemische klasse of bereik van responsen worden geëvalueerd, kunnen referentiestoffen ook nuttig zijn om aan te tonen dat de testmethode correct functioneert voor het signaleren van het huidsensibilisatiepotentieel van deze soorten stoffen. Geschikte referentiestoffen moeten de volgende eigenschappen hebben:

— ze moeten structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de klasse van de teststof die wordt getest;

— hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn;

— uit de LLKT afkomstige gegevens ondersteunen; AA;

— uit andere diermodellen en/of van mensen afkomstige gegevens ondersteunen.

UITVOERING VAN DE PROEF

Aantal dieren en hoogte van de doses

17. Er worden minimaal vier dieren per dosisgroep gebruikt en ten minste drie concentraties van de teststof plus een negatieve controlegroep (NC-groep), die alleen met het medium voor de teststof wordt behandeld, en een PC (gelijktijdig of recentelijk uitgevoerd, op basis van het laboratoriumbeleid zoals beschreven in de punten 11-15). Het testen van meerdere doses van de PC moet overwogen worden, in het bijzonder wanneer de PC op periodieke basis wordt getest. Behalve dat de dieren in de controlegroepen niet met de teststof worden behandeld, worden ze verder op identieke wijze behandeld als de dieren in de behandelde groepen.

18. De keuze van de doses en het medium wordt gebaseerd op de aanbevelingen in referenties (2) en (24). Opeenvolgende doses worden doorgaans gekozen uit een geschikte concentratiereeks, zoals 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % enz. Aan de keuze van de gebruikte concentratiereeks moet een toereikende wetenschappelijke motivering ten grondslag liggen. Bij de keuze van de drie opeenvolgende concentraties moet rekening worden gehouden met alle bestaande toxicologische gegevens (bv. met betrekking tot acute toxiciteit en huidirritatie), wanneer die beschikbaar zijn, zodat bij de hoogste concentratie de blootstelling maximaal is zonder dat dit tot systemische toxiciteit en bovenmatige lokale huidirritatie leidt (24) (25). Wanneer dergelijke informatie niet beschikbaar is, kan een initiële voorafgaande screeningtest nodig zijn (zie punten 21-24).

19. Het medium mag het testresultaat niet verstoren of er invloed op uitoefenen en moet worden gekozen met het oog op de hoogste mate van oplosbaarheid, zodat de hoogst mogelijke concentratie wordt verkregen, terwijl de oplossing/suspensie geschikt moet zijn om de teststof mee aan te brengen. Aanbevolen media zijn aceton: olijfolie (4:1 v/v), N,N-dimethylformamide, methylethylketon, propyleenglycol en dimethylsulfoxide (6), maar ook een ander medium mag worden gebruikt als daarvoor een afdoende wetenschappelijke motivering wordt gegeven. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn als extra controle een klinisch relevant oplosmiddel te gebruiken of de commerciële formulering waarin de teststof in de handel wordt gebracht. Er moet vooral voor worden gezorgd dat hydrofiele teststoffen worden opgenomen in een medium dat de huid vochtig maakt en niet onmiddellijk wegloopt. Dit kan worden bereikt door geschikte oplosbaar makende stoffen (bv. 1 % Pluronic® L92) toe te voegen. Een volledig waterig medium moet derhalve worden vermeden.

▼M3

20. Door de verwerking van lymfklieren van individuele muizen kan de spreiding over de dieren worden beoordeeld en kan een statistische vergelijking tussen de teststofmetingen en de metingen voor de met medium behandelde controlegroep worden uitgevoerd (zie punt 33). Daarnaast kan door het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren de mogelijkheid onderzocht worden om het aantal muizen in de PC-groep te verminderen (22). Verder vereisen sommige regelgevende autoriteiten het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren. Het regelmatig vergaren van gegevens over individuele dieren brengt voordelen met zich mee op het vlak van dierenwelzijn, door dubbele tests te vermijden, die nodig zouden zijn wanneer de resultaten voor de teststoffen die aanvankelijk op een bepaalde manier verkregen werden (bv. via gepoolde gegevens over dieren) later door de regelgevende autoriteiten bekeken moeten worden volgens andere eisen (bv. gegevens over individuele dieren).

Voorafgaande screeningtest

21. Wanneer er geen gegevens beschikbaar zijn om de hoogste te testen dosis te bepalen (zie punt 18), moet een voorafgaande screeningtest worden uitgevoerd om de juiste dosis te bepalen die getest moet worden in de LLKT: AA. Het doel van de voorafgaande screeningtest is om richtsnoeren te bieden voor het kiezen van de maximale dosis in het hoofdonderzoek van de LLKT: AA, indien informatie over de concentratie die systemische toxiciteit induceert (zie punt 24) en/of bovenmatige huidirritatie (zie punt 23) niet beschikbaar is. De maximale dosis die wordt getest, moet 100 % zijn van de teststof voor vloeibare stoffen of de hoogst mogelijke concentratie voor vaste stoffen of suspensies.

22. De voorafgaande screeningtest wordt uitgevoerd onder omstandigheden die identiek zijn aan die van het hoofdonderzoek van de LLKT: AA, behalve dat er geen beoordeling is van de lymfklierproliferatie en er minder dieren per dosisgroep kunnen worden gebruikt. Aanbevolen wordt per dosisgroep een of twee dieren te gebruiken. Alle muizen worden dagelijks geobserveerd op klinische verschijnselen van systemische toxiciteit of lokale irritatie op de plaats van aanbrengen. Het lichaamsgewicht van de dieren wordt geregistreerd voorafgaand aan de test en vóór de beëindiging van de test (dag 8). Beide oren van iedere muis worden onderzocht op erytheem en de responsen worden ingeschaald met behulp van tabel 1 (25). De dikte van de oren wordt gemeten met behulp van een diktemeter (bv. een digitale micrometer of Peacock Dial-diktemeter) op dag 1 (vóór aanbrenging van de dosis), dag 3 (ongeveer 48 uur na de eerste dosis), dag 7 (24 uur voor het doden) en dag 8. Daarnaast kan op dag 8 de dikte worden bepaald door oorperforatiemetingen, die uitgevoerd moeten worden nadat de dieren op humane wijze zijn gedood. Bovenmatige huidirritatie wordt aangegeven door een erytheemscore $\geq$ 3 en/of een toename van de oordikte $\geq$ 25 % op een of meer van de meetdagen (26) (27). De hoogste dosis die voor het hoofdonderzoek van de LLKT: AA wordt gekozen, is de volgende lagere dosis in de concentratiereeks van de voorafgaande screeningtest (zie punt 18) die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie veroorzaakt.

Tabel 1

Erytheemscores

Waarneming	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2

▼M3

Waarneming	Score
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

23. Naast een toename van de oordikte met 25 % (26) (27), is een statistisch significante toename van de oordikte bij de behandelde muizen in vergelijking met de controlemuizen ook gebruikt om irriterende stoffen in de LLKT te signaleren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Echter, hoewel statistisch significante toenamen kunnen voorkomen bij een toename van de oordikte met minder dan 25 %, worden ze niet specifiek met bovenmatige huidirritatie in verband gebracht (30) (31) (32) (33) (34).

24. De volgende klinische waarnemingen kunnen duiden op systemische toxiciteit (35) wanneer gebruikt als onderdeel van een geïntegreerde beoordeling en kunnen derhalve de maximale dosis aangeven die moet worden gebruikt in het hoofdonderzoek van de LLKT: AA: veranderingen in de werking van het zenuwstelsel (bv. pilo-erectie, ataxie, tremors en convulsies); veranderingen in gedrag (bv. agressiviteit, verandering in lichaamsverzorging, duidelijke verandering in het activiteitsniveau); veranderingen in ademhalingspatronen (d.w.z. veranderingen in de frequentie en intensiteit van het ademhalen, zoals kortademigheid, benauwdheid en gereutel) en veranderingen in de voedsel- en waterconsumptie. Daarnaast moet in de evaluatie rekening worden gehouden met tekenen van lethargie en/of gebrek aan reactiviteit alsmede klinische tekenen van meer dan lichte of voorbijgaande pijn en leed of een vermindering van het lichaamsgewicht van meer dan 5 % tussen dag 1 en dag 8, evenals het sterftecijfer. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, moeten op humane wijze worden gedood (36).

Proefopzet hoofdonderzoek

25. De proefopzet van het onderzoek is als volgt:

— *Dag 1:* Van elk dier apart wordt het gewicht en iedere klinische waarneming bepaald en vastgelegd. Vervolgens wordt een waterige oplossing van 1 % natriumlaurylsulfaat (NLS) op het dorsum van elk oor aangebracht met een borsteltje dat in de NLS ondergedompeld wordt om het volledige dorsum van elk oor met vier tot vijf streken te bedekken. Een uur na de behandeling met NLS, wordt 25 µL van de toepasselijke verdunning van de teststof, het medium zonder teststof of de PC (gelijktijdig of recent, in overeenstemming met het laboratoriumbeleid ten aanzien van punten 11-15) aangebracht op het dorsum van elk oor.

— *Dagen 2, 3 en 7:* Herhaal de voorafgaande behandeling met de waterige oplossing van 1 % NLS en de procedure voor het aanbrengen van de teststof die op dag 1 werden toegepast.

— *Dagen 4, 5 en 6:* Geen behandeling.

— *Dag 8:* Van elk dier worden het gewicht en iedere klinische waarneming vastgelegd. Ongeveer 24 tot 30 uur na het begin van het aanbrengen op dag 7, worden de dieren op humane wijze gedood. De afvoerende auriculaire lymfklieren van elke muis worden uitgeprepareerd en voor elk dier afzonderlijk behandeld in gebufferde fosfaatsaline (PBS). Referentie (22) bevat gedetailleerde informatie en diagrammen voor de identificatie en het uitprepareren van de lymfklieren. Om de lokale huidreacties in het hoofdonderzoek nader te onderzoeken, kunnen aanvullende parameters in het onderzoeksprotocol worden opgenomen, zoals de inschaling van oorerytheem of oordiktemetingen (verkregen door gebruik van een diktemeter of door oorperforatiemetingen bij de necropsie).

▼M3

Bereiding van de celsuspensies

26. Van elke muis wordt er een eencellige suspensie met lymfkliercellen (LKC) gemaakt die aan beide zijden werden uitgeprepareerd door de lymfklieren tussen twee objectglazen te klemmen en een lichte druk uit te oefenen om de lymfklieren te pletten. Nadat bevestigd is dat het weefsel zich in een dunne laag verspreid heeft, worden de twee glaasjes van elkaar gehaald. Het weefsel op beide objectglazen wordt gesuspendeerd in PBS door elk glaasje schuin boven het petrischaaltje te houden en het te spoelen met PBS en tegelijkertijd het weefsel van het glas te schrapen met een celschraper. De lymfklieren van NC-dieren zijn bovendien klein, men moet dus voorzichtig te werk gaan om kunstmatige beïnvloeding van de SI-waarden te voorkomen. Er dient een totaal volume van 1 ml PBS gebruikt te worden voor het spoelen van beide glaasjes. De LKC-suspensie in het petrischaaltje dient enigszins gehomogeniseerd te worden met de celschraper. Vervolgens wordt een aliquot van 20 μL van de LKC-suspensie verzameld met een micropipet, waarbij ervoor gezorgd wordt dat het membraan, dat niet zichtbaar is met het blote oog, niet wordt meegenomen, waarna de suspensie gemengd wordt met 1,98 ml PBS om een monster van 2 ml te verkrijgen. Vervolgens wordt er een tweede monster van 2 ml bereid via dezelfde procedure zodat er twee monsters gemaakt worden voor elk dier.

Bepaling van celproliferatie (meten van het ATP-gehalte van de lymfocyten)

27. Toenames van het ATP-gehalte in de lymfklieren worden gemeten met de luciferine/luciferase-methode met behulp van een ATP-meetkit, die de bioluminescentie meet in relatieve lichteenheden (Relative Luminescence Units - RLU). De bepalingstijd vanaf het moment waarop het dier gedood wordt tot de meting van het ATP-gehalte voor elk individueel dier moet gelijkmatig blijven, binnen ongeveer 30 minuten, omdat het ATP-gehalte geleidelijk aan afneemt na de dood van het dier (12). De reeks procedures vanaf het uitprepareren van de auriculaire lymfklieren tot de ATP-meting dient binnen 20 minuten te worden afgerond, volgens het vooraf vastgelegde tijdspad, dat voor elk dier hetzelfde is. De ATP-luminescentie wordt gemeten voor elk monster van 2 ml, zodat in totaal twee ATP-metingen verkregen worden voor elk dier. Vervolgens wordt de gemiddelde ATP-luminescentie bepaald en gebruikt voor verdere berekeningen (zie punt 30).

WAARNEMINGEN

Klinische waarnemingen

28. Iedere muis wordt ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd op klinische verschijnselen van lokale irritatie op de plaats van aanbrengen of systemische toxiciteit. Alle waarnemingen worden systematisch geregistreerd en van elke muis wordt een apart overzicht bijgehouden. Waarnemingsschema's dienen criteria te omvatten om muizen die tekenen vertonen van systemische toxiciteit, overmatige lokale huidirritatie of huidcorrosie onmiddellijk aan te wijzen voor euthanasie (36).

Lichaamsgewicht

29. Zoals in punt 25 is vermeld, wordt aan het begin van de test en wanneer de dieren volgens schema op humane wijze worden gedood, van elk dier het lichaamsgewicht bepaald.

BEREKENING VAN RESULTATEN

30. De resultaten voor iedere behandelingsgroep worden uitgedrukt als de stimuleringsindex (SI). De SI wordt berekend door de gemiddelde RLU/muis van elke groep behandeld met teststof en de PC-groep, te delen door de gemiddelde RLU/muis voor de oplosmiddel/medium-controlegroep. De gemiddelde SI voor de VC's is dan één.

▼M3

31. Binnen het beslissingsproces wordt een resultaat als positief beschouwd, indien SI ≥ 1,8 (10). Echter, de sterkte van de dosis/respons, de statistische significantie en de consistentie van de medium-controlegroep- en PC-responsen kunnen ook worden gebruikt om te bepalen of een resultaat dat een grensgeval is (d.w.z. SI-waarde tussen 1,8 en 2,5) positief wordt verklaard (2) (3) (37).

32. Voor een net positieve respons met een SI tussen 1,8 en 2,5 kan het nuttig zijn om naast de SI-waarden ook aanvullende informatie zoals het verband tussen de dosis en de respons, bewijs voor systemische toxiciteit of overmatige irritatie, en waar nodig, statistische significantie in aanmerking te nemen om die resultaten als positief aan te merken (10). Er moet ook gekeken worden naar verschillende eigenschappen van de teststof, bijvoorbeeld of deze qua structuur verwant is met bekende huidsensibilisatoren, of de stof overmatige huidirritatie veroorzaakt bij de muis en wat de aard van het waargenomen verband tussen de dosis en de reactie is. Deze en andere overwegingen worden elders gedetailleerd besproken (4).

33. Door gegevens te verzamelen op het niveau van de individuele muis, kan een statistische analyse worden uitgevoerd voor het bestaan van een dosis/responsverhouding binnen de gegevens en de mate waarin deze verhouding voorkomt. Iedere statistische beoordeling kan een evaluatie omvatten van de dosis/responsverhouding evenals afdoende aangepaste vergelijkingen van testgroepen (bv. paarsgewijs gedoseerde groep tegenover vergelijkingen van een oplossingsmiddel/medium-controlegroep). Statistische analyses kunnen *bijvoorbeeld* lineaire regressie omvatten of de test van William voor het beoordelen van dosis/responstrends, alsmede de test van Dunnett voor paarsgewijze vergelijkingen. Bij het kiezen van een geschikte statistische analysemethode moet de onderzoeker zich bewust blijven van mogelijke variantieheterogeniteit en andere soortgelijke problemen, die een gegevenstransformatie of een niet-parametrische statistische analyse noodzakelijk kunnen maken. In ieder geval kan het nodig zijn dat de onderzoeker SI-berekeningen en statistische analyses uitvoert met en zonder bepaalde gegevenspunten (soms „uitbijters” genoemd).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

34. Gegevens dienen samengevat te worden in de vorm van een tabel waarin de RLU-waarden voor individuele dieren, de gemiddelde RLU/dier per groep, het bijbehorende residu (bv. SD, SEM) en de gemiddelde SI iedere dosisgroep in vergelijking met de gelijktijdig met oplossingsmiddel/medium behandelde controlegroep.

Testverslag

35. In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Test- en controlestoffen:

— identificatiegegevens (bv. CAS-nummer en EG-nummer, indien beschikbaar; bron; zuiverheid; bekende onzuiverheden; partijnummer);

— de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de vluchtigheid, de stabiliteit en de oplosbaarheid);

— bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte;

Oplosmiddel/medium:

— identificatiegegevens (zuiverheid; concentratie, indien van toepassing; gebruikt volume);

— motivering van de keuze van het medium;

▼**M3**

Proefdieren:

— bron van CBA-muizen;

— microbiologische status van de dieren, indien bekend;

— aantal en leeftijd van de dieren;

— de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.;

Testomstandigheden:

— de bron, het partijnummer en de gegevens van de producent over de kwaliteitsgarantie/kwaliteitscontrole voor de ATP-kit;

— gedetailleerde gegevens over de formulering en het aanbrengen van de teststof;

— motivering voor dosiskeuze (met inbegrip van resultaten van voorafgaande screeningtest, indien uitgevoerd);

— gebruikte concentraties van medium en teststof en totale hoeveelheid teststof die is aangebracht;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water (waaronder de aard en de herkomst van het voer en de herkomst van het water);

— gedetailleerde gegevens met betrekking tot het behandelings- en bemonsteringsschema;

— methoden voor de meting van de toxiciteit;

— criteria om te bepalen of het resultaat positief of negatief is;

— gedetailleerde gegevens met betrekking tot protocolafwijkingen en een uitleg van hoe de afwijking van invloed is op de opzet en resultaten van het onderzoek;

Betrouwbaarheidscontrole:

— overzicht van de resultaten van de meest recente betrouwbaarheidscontrole met informatie over de teststof, de concentratie en het gebruikte medium;

— tegelijkertijd en/of in het verleden bepaalde positieve en tegelijkertijd bepaalde negatieve (oplosmiddel/medium) controlegegevens voor het testlaboratorium;

— indien geen gelijktijdige PC is uitgevoerd, de datum en het laboratoriumverslag voor de meest recente periodieke PC en een verslag met de historische PC-gegevens voor het laboratorium waarin de beslissing om geen gelijktijdige PC uit te voeren, wordt gemotiveerd;

Resultaten:

— het gewicht van elke muis aan het begin van de test en wanneer deze volgens schema wordt gedood; evenals het gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor iedere behandelingsgroep;

— voor elk dier het tijdstip waarop de eventuele toxiciteitsverschijnselen zich voordoen, met inbegrip van huidirritatie op de toedieningsplaats, en het verloop daarvan;

— voor elk dier het tijdstip waarop het gedood werd en het tijdstip waarop de ATP-meting werd uitgevoerd;

— een tabel met de RLU-waarden voor elke muis en de SI-waarden voor elke doseringsgroep;

— gemiddeld bijbehorend residu (bv. SD, SEM) voor de RLU/muis voor elke behandelingsgroep en de resultaten van uitbijteranalyses voor elke behandelingsgroep;

▼M3

— berekende SI en een geschikte meting van de variabiliteit die rekening houdt met de spreiding over de dieren in zowel de teststof- als de controlegroepen;

— dosis/responsverhouding;

— statistische analyses, indien van toepassing;

Bespreking van de resultaten:

— Een korte bespreking van de resultaten, de dosis/respons-analyse en de statistische analyses, indien van toepassing, met een conclusie ten aanzien van de vraag of de teststof als huidsensibilisator moet worden beschouwd.

LITERATUUR

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (38).

IJkstof: een sensibiliserende of niet-sensibiliserende stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof moet de volgende eigenschappen hebben: (i) consistente en betrouwbare bron(nen); (ii) in structureel en functioneel opzicht soortgelijk aan de geteste klasse stoffen; (iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; (iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten, en (v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

Valsnegatief: een teststof die door een testmethode ten onrechte als negatief of niet-actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof feitelijk positief of actief is.

Valspositief: een teststof die ten onrechte als positief of actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof in feite negatief of niet-actief is.

Gevaar: het risico van een nadelig effect op de gezondheid of het milieu. Het nadelige effect doet zich alleen voor indien er voldoende blootstelling is.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde teststoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een test met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (38).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook reproduceerbaarheid binnen laboratoria genoemd (38).

Uitbijter: een uitbijter is een waarneming die duidelijk afwijkt van andere waarden binnen een willekeurige steekproef uit een populatie.

Kwaliteitsborging: een beheerproces waarbij de naleving van de testnormen, eisen en boekhoudingsprocedures voor laboratoria alsmede de nauwkeurigheid van de gegevensoverdracht worden beoordeeld door personen die onafhankelijk zijn van degenen die de tests uitvoeren.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (38).

Huidsensibilisatie: een immunologisch proces dat ontstaat wanneer een vatbare persoon of proefdier plaatselijk wordt blootgesteld aan een inducerend chemisch allergeen, dat een immunologische huidreactie veroorzaakt die kan leiden tot de ontwikkeling van contactsensibilisatie.

Stimuleringsindex (SI): een waarde die wordt berekend om het huidsensibilisatiepotentieel van een teststof te beoordelen en die gelijk is aan de verhouding van de proliferatie bij behandelde groepen ten opzichte van de proliferatie bij de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep.

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

▼M3

B.51. **HUIDSENSIBILISATIE: LOKALE LYMFKLIERTEST: BrdU-ELISA**

INLEIDING

1. De OESO-richtlijnen inzake het testen van chemische stoffen (Guidelines for the Testing of Chemicals) en de daarop gebaseerde EU-testmethoden worden regelmatig herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang, zich wijzigende behoeften aan regelgeving en overwegingen met het oog op dierenwelzijn. De eerste testmethode (TM) (B.42) voor het bepalen van de huidsensibilisatie bij muizen, de lokale lymfkliertest (LLKT; OESO-testrichtlijn 429) is herzien (1, en hoofdstuk B.42 van deze bijlage). Er zijn publicaties verschenen met de gegevens over de validatie van de LLKT en een overzicht van gerelateerd onderzoek (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). In de LLKT wordt radio-isotoop thymidine of jodium gebruikt om de proliferatie van de lymfocyten te meten en de test is daarom slechts beperkt bruikbaar indien de aankoop, het gebruik en de verwijdering van radioactief materiaal problematisch zijn. De LLKT: BrdU-ELISA [enzyme-linked immunosorbent assay] is een niet-radioactieve aanpassing van de LLKT TM, waarbij gebruikgemaakt wordt van niet radioactief gemerkt 5-broom-2-deoxyuridine (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS] nr. 59-14-3) in een op ELISA gebaseerd testsysteem om de proliferatie van lymfocyten te meten. De LLKT: BrdU-ELISA werd door een onafhankelijk internationaal panel voor collegiale toetsing gevalideerd, beoordeeld en aanbevolen als nuttig instrument om huidsensibiliserende en niet-huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen bepaalde beperkingen (10) (11) (12). Deze TM werd ontworpen om de potentiële huidsensibilisatie door chemische stoffen (stoffen en mengsels) bij dieren te bepalen. In hoofdstuk B.6 van deze bijlage en in OESO-testrichtlijn 406 worden proeven met cavia's gebruikt: de maximalisatietest en de Buehlertest (13). De LLKT (hoofdstuk B.42 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 429) en de twee niet-radioactieve aanpassingen, LLKT: BrdU-ELISA (hoofdstuk B.51 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 B) en LLKT: AA (hoofdstuk B.50 van deze bijlage; OESO-testrichtlijn 442 A), bieden allemaal een voordeel ten opzichte van de proeven met cavia's in B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (13) ten aanzien van een beperking en verfijning van het gebruik van dieren.

2. NET zoals de LLKT, bestudeert de LLKT: BrdU-ELISA de inductiefase van huidsensibilisatie en levert kwantitatieve gegevens die voor een dosis/responsbepaling kunnen worden gebruikt. Bovendien neemt de mogelijkheid om huidsensibiliserende stoffen op te sporen zonder gebruik te maken van isotopenmerking voor DNA het risico op beroepsmatige blootstelling aan radioactiviteit en de problemen met afvalverwijdering weg. Dat maakt het dan weer mogelijk om vaker muizen te gebruiken om huidsensibiliserende stoffen op te sporen, waardoor het gebruik van cavia's in onderzoek naar huidsensibilisatie mogelijk beperkt kan worden (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13).

DEFINITIES

3. Gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

TOELICHTING EN BEPERKINGEN

4. De LLKT: BrdU-ELISA is een aangepaste LLKT-methode om potentiële huidsensibiliserende chemische stoffen op te sporen, binnen specifieke beperkingen. Dit houdt niet noodzakelijkerwijs in dat de LLKT: BrdU-ELISA in alle gevallen in plaats van de LLKT of de proef met cavia's moet worden gebruikt, (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13), maar veeleer dat de test gelijkwaardig is en als alternatief kan worden gebruikt, waarbij positieve en negatieve resultaten niet langer behoeven te worden bevestigd (10) (11). Het testlaboratorium moet vóór de uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof in overweging nemen. Die informatie

▼M3

zal de identiteit en de chemische structuur van de teststof bevatten; de fysisch-chemische eigenschappen ervan; de resultaten van andere in-vitro- of in-vivotoxiciteitsproeven op de teststof; en toxicologische gegevens van chemische stoffen met een verwante structuur. Deze informatie moet in aanmerking genomen worden om te bepalen of de LLKT: BrdU-ELISA geschikt is voor de teststof (gezien de incompatibiliteit van beperkte soorten chemische stoffen met de LLKT: BrdU-ELISA (zie punt 5)) en om te helpen bij het bepalen van de dosis.

5. De LLKT: BrdU-ELISA is een in-vivomethode en leidt er derhalve niet toe dat er bij de bepaling van allergische contactsensibilisatie geen dieren meer worden gebruikt. Deze methode kan het gebruik van dieren voor dit doel verminderen in vergelijking met de proeven met cavia's (B.6; OESO-testrichtlijn 406) (13). Bovendien zorgt de LLKT: BrdU-ELISA voor een aanzienlijke verfijning van de manier waarop dieren voor het testen op contactsensibilisatie worden gebruikt, aangezien er bij de LLKT: BrdU-ELISA, in tegenstelling tot de B.6 en OESO-testrichtlijn 406, geen door provocatie geïnduceerde overgevoeligheidsreacties van de huid hoeven te worden opgewekt. Bovendien behoeft bij de LLKT: BrdU-ELISA geen adjuvans te worden gebruikt, hetgeen bij de maximalisatietest bij cavia's wel nodig is (hoofdstuk B.6 van deze bijlage, 13). Dit betekent dat de LLKT: BrdU-ELISA het ongerief voor dieren beperkt. Ondanks de voordelen van de LLKT: BrdU-ELISA ten opzichte van B.6 en OESO-testrichtlijn 406 (13), zijn er bepaalde beperkingen waardoor het gebruik van B.6 of OESO-testrichtlijn 406 (bv. het testen van bepaalde metalen, valspositieve resultaten met bepaalde stoffen die de huid irriteren (zoals bepaalde oppervlakteactieve stoffen) (6) (1 en hoofdstuk B.42 van deze bijlage), oplosbaarheid van de teststof) nodig kan zijn. Daarnaast kan in het geval van chemische klassen of stoffen die functionele groepen bevatten waarvan is aangetoond dat ze als potentiële stoorfactoren (15) werken, het gebruik van proeven met cavia's (d.w.z. B.6; OESO-testrichtlijn 406 (13)) nodig zijn. Aanbevolen wordt om de beperkingen die voor de LLKT (1, en hoofdstuk B.42 van deze bijlage) werden vastgesteld, ook toe te passen op de LLKT: BrdU-ELISA (10). Buiten die vastgestelde beperkingen, dient de LLKT: BrdU-ELISA toegepast te worden voor het testen van alle stoffen, tenzij die stoffen eigenschappen hebben die de nauwkeurigheid van de LLKT: BrdU-ELISA kunnen beïnvloeden. Bovendien moet er rekening gehouden worden met mogelijke positieve grensgevallen in de resultaten wanneer er stimuleringsindex (SI)-waarden tussen 1,6 en 1,9 verkregen worden (zie punten 31-32). Dit is gebaseerd op de valideringsdatabank van 43 stoffen, waarbij een SI $\geq$ 1,6 gehanteerd werd (zie punt 6) waarvoor de LLKT: BrdU-ELISA alle 32 LLKT-sensibiliserende stoffen correct geïdentificeerd heeft, maar twee van de 11 niet-sensibiliserende stoffen uit de LLKT met SI-waarden tussen 1,6 en 1,9 onjuist geïdentificeerd heeft (d.w.z. positief grensgeval) (10). Aangezien dezelfde gegevensreeks gebruikt werd om de SI-waarden te bepalen en de voorspellende eigenschappen van de test te berekenen, kunnen de vermelde resultaten de werkelijke voorspellende eigenschappen echter overschatten.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

6. Het beginsel dat aan de LLKT: BrdU-ELISA ten grondslag ligt, is dat sensibilisatoren induceren tot een proliferatie van lymfocyten in de lymfklier die de afvoer verzorgt van de plaats waar de teststof wordt aangebracht. Deze proliferatie is evenredig met de dosis en de potentie van het aangebrachte allergeen en biedt een eenvoudige mogelijkheid om een kwantitatieve meting van de sensibilisering uit te voeren. De proliferatie wordt gemeten door de gemiddelde proliferatie in elke testgroep te vergelijken met de proliferatie in de met medium behandelde controlegroep (VC). De verhouding tussen de gemiddelde proliferatie in elke behandelde groep en in de overeenkomstige medium-controlegroep wordt bepaald en deze z.g. SI

▼M3

moet ≥ 1,6 zijn voordat een teststof nader kan worden beoordeeld als potentiële huidsensibilisator. De hierin beschreven procedures zijn gebaseerd op een methode waarbij het BrdU-gehalte gemeten wordt om een verhoogd aantal prolifererende cellen in de afvoerende auriculaire lymfklieren op te sporen. BrdU is een analogon van thymidine en wordt op een vergelijkbare manier opgenomen in het DNA van prolifererende cellen. De opname van BrdU wordt gemeten door ELISA, dat gebruikmaakt van een specifiek antilichaam voor BrdU dat ook gemerkt wordt met peroxidase. Wanneer de stof wordt toegevoegd, reageert de peroxidase met het substraat en vormt het zo een gekleurd product dat gekwantificeerd wordt bij een specifieke absorptie met behulp van een microtiterplaatlezer.

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Keuze van de diersoort

7. Voor deze test worden bij voorkeur muizen gebruikt. Het valideringsonderzoek voor de LLKT: BrdU-ELISA werd uitsluitend uitgevoerd met de CBA/JN-stam, die daarom beschouwd wordt als de geprefereerde stam (10) (12). Er worden jonge volwassen vrouwtjesmuizen gebruikt, die nog geen jongen hebben gehad en niet drachtig zijn. Bij het begin van het onderzoek moeten de dieren 8-twaalf weken oud zijn, het gewichtsverschil tussen de dieren moet minimaal zijn en de afwijking mag niet groter zijn dan 20 % van het gemiddelde gewicht. Er mogen ook andere stammen of mannetjes worden gebruikt, wanneer er voldoende gegevens beschikbaar zijn om aan te tonen dat er geen significante stam- en/of geslachtsspecifieke verschillen in de LLKT: BrdU-ELISA-respons bestaan.

Huisvesting en voeding

8. De muizen moeten in groepjes worden ondergebracht (16), tenzij een individuele behuizing van de muizen naar behoren wetenschappelijk wordt gemotiveerd. De temperatuur van de proefdierruimte dient 22 ± 3 °C te zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % zijn en (behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte) bij voorkeur niet hoger dan 70 % zijn, maar er moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater.

Voorbereiding van de dieren

9. De dieren worden aselect ingedeeld, gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren (maar niet door enigerlei vorm van oormerking) en vóór het begin van de toediening gedurende minimaal vijf dagen in hun kooi gehouden om ze aan de omstandigheden in het laboratorium te laten wennen. Vóór het begin van de behandeling worden alle dieren onderzocht om vast te stellen dat ze geen waarneembaar huidletsel hebben.

Bereiding van doseringsoplossingen

10. Vaste chemische stoffen moeten in oplosmiddelen/media worden opgelost of gesuspendeerd en, indien nodig, verdund vóór aanbrenging op een oor van de muis. Vloeibare chemische stoffen kunnen onverdund worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Onoplosbare chemische stoffen, zoals die gewoonlijk voorkomen in medische apparaten, moeten worden onderworpen aan een maximale extractie in een geschikt oplosmiddel om alle extraheerbare bestanddelen voor het testen vrij te maken vóór aanbrenging op een oor van de muis. Teststoffen moeten dagelijks worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is.

Betrouwbaarheidscontrole

11. Voor positieve controle gebruikte stoffen (PC's) worden gebruikt om aan te tonen dat de test correct werkt in de zin dat de test leidt tot een respons met voldoende en reproduceerbare gevoeligheid, waarbij de omvang van de respons goed gedocumenteerd is. Gelijktijdig gebruik van een PC wordt aanbevolen, omdat hiermee wordt aangetoond dat het laboratorium de competentie bezit om iedere test succesvol uit te voeren en omdat de intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en -overdraagbaarheid hiermee kan

▼M3

worden beoordeeld. Sommige regelgevende autoriteiten vereisen ook een PC voor elk onderzoek en gebruikers worden daarom aangespoord om de relevante autoriteiten te raadplegen alvorens zij de LLKT: BrdU-ELISA uitvoeren. Derhalve wordt het routinematige gelijktijdige gebruik van een PC aangemoedigd, zodat geen noodzaak bestaat om aanvullende dierproeven uit te voeren om te voldoen aan dergelijke vereisten die kunnen voortkomen uit het gebruik van een periodieke PC (zie punt 12). De PC moet een positieve LLKT: BrdU-ELISA-respons opleveren bij een blootstellingsniveau waarbij in vergelijking met de negatieve controlegroep (NC) een stijging van de stimuleringsindex (SI) met ≥ 1,6 wordt verwacht. De dosis van de PC moet zo worden gekozen dat de stof geen overmatige huidirritatie of systemische toxiciteit veroorzaakt en de inductie reproduceerbaar is, maar niet buitensporig (bv. een SI > 14 zou buitensporig zijn). 25 % hexylcinnamaldehyde (CAS-nr. 101-86-0) en 25 % eugenol (CAS-nr. 97-53-0) in aceton: olijfolie (4:1, v/v) verdienen de voorkeur als PC. Onder bepaalde omstandigheden kunnen andere PC's worden gebruikt die aan bovengenoemde criteria voldoen, mits een afdoende motivering wordt gegeven.

12. Hoewel het gelijktijdige gebruik van een PC-groep aanbevolen wordt, kunnen er situaties zijn waarin periodiek testen (d.w.z. met intervallen ≤ zes maanden) van de PC toereikend kan zijn voor laboratoria die de LLKT: BrdU-ELISA regelmatig uitvoeren (d.w.z. de LLKT: BrdU-ELISA uitvoeren met een frequentie van niet minder dan eenmaal per maand) en die een historische PC-databank hebben die aantoont dat het laboratorium in staat is om reproduceerbare en nauwkeurige uitkomsten met PC's te verkrijgen. Toereikende ervaring met de LLKT: BrdU-ELISA kan worden aangetoond door consequent positieve uitkomsten te genereren in ten minste tien onafhankelijke tests die binnen een redelijke tijdspanne (d.w.z. binnen één jaar) worden uitgevoerd.

13. Gelijktijdig gebruik van een PC-groep is verplicht in geval van een procedurewijziging van de LLKT: BrdU-ELISA gewijzigd wordt (bv. wijziging van gekwalificeerd personeel, wijziging in de materialen en/of reagentia van de testmethode, wijziging van de testapparatuur, wijziging van de bron van proefdieren), en dergelijke wijzigingen moeten in laboratoriumverslagen worden gedocumenteerd. Het effect van dergelijke wijzigingen op de nauwkeurigheid van de eerder opgerichte historische databank moet in overweging worden genomen om te bepalen of het nodig is een nieuwe historische databank op te richten, teneinde consistentie in de documentatie van de PC-uitkomsten te waarborgen.

14. Onderzoekers dienen zich ervan bewust te zijn dat de beslissing om een PC-onderzoek op periodieke basis uit te voeren in plaats van gelijktijdig, consequenties heeft voor de nauwkeurigheid en aanvaardbaarheid van negatieve onderzoeksuitkomsten die zijn gegenereerd zonder gelijktijdig gebruik van een PC tijdens het interval tussen opeenvolgende periodieke PC-onderzoeken. Indien bijvoorbeeld een valsnegatieve uitkomst is verkregen in het periodieke PC-onderzoek, kunnen negatieve resultaten voor teststoffen die zijn verkregen in het interval tussen het laatste aanvaardbare periodieke PC-onderzoek en het onaanvaardbare PC-onderzoek in twijfel worden getrokken. De implicaties van deze uitkomsten moeten zorgvuldig in overweging worden genomen om te bepalen of PC's gelijktijdig moeten worden gebruikt of dat alleen periodieke PC-onderzoeken moeten worden uitgevoerd. Tevens moet overwogen worden om minder dieren te gebruiken in de gelijktijdige PC-groep, indien dit wetenschappelijk gerechtvaardigd is en indien het laboratorium aantoont, op basis van laboratoriumspecifieke historische gegevens, dat minder muizen gebruikt kunnen worden (17).

15. Hoewel de PC moet worden getest in een medium waarvan bekend is dat het een consequente respons oplevert (bv. aceton: olijfolie; 4:1, v/v), kan de regelgeving in bepaalde gevallen vereisen dat de tests ook in een ongebruikelijk medium (een klinisch/chemisch relevante formulering) worden uitgevoerd (18). Indien de gelijktijdig gebruikte PC in een ander medium wordt getest dan de teststof, moet een afzonderlijke met medium behandelde groep voor de gelijktijdig gebruikte PC worden gebruikt.

▼M3

16. In gevallen waarin teststoffen van een specifieke chemische klasse of bereik van responsen worden geëvalueerd, kunnen referentiestoffen ook nuttig zijn om aan te tonen dat de testmethode correct functioneert voor het signaleren van het huidsensibilisatiepotentieel van deze soorten stoffen. Geschikte referentiestoffen moeten de volgende eigenschappen hebben:

— ze moeten structureel en functioneel vergelijkbaar zijn met de klasse van de teststof die wordt getest;

— hun fysische/chemische kenmerken moeten bekend zijn;

— ondersteunende gegevens uit de LLKT: BrdU-ELISA;

— uit andere diermodellen en/of van mensen afkomstige gegevens ondersteunen.

UITVOERING VAN DE PROEF

Aantal dieren en hoogte van de doses

17. Er worden minimaal vier dieren per dosisgroep gebruikt en ten minste drie concentraties van de teststof plus een parallelle NC-groep, die alleen met het medium voor de teststof wordt behandeld, en een PC-groep (gelijktijdig of recent, volgens het laboratoriumbeleid ten aanzien van punten 11-15). Het testen van meerdere doses van de PC moet overwogen worden, in het bijzonder wanneer de PC op periodieke basis wordt getest. Behalve dat de dieren in de controlegroepen niet met de teststof worden behandeld, worden ze verder op identieke wijze behandeld als de dieren in de behandelde groepen.

18. De keuze van de doses en het medium wordt gebaseerd op de aanbevelingen in referenties 2 en 19. Opeenvolgende doses worden doorgaans gekozen uit een geschikte concentratiereeks, zoals 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % enz. Aan de keuze van de gebruikte concentratiereeks moet een toereikende wetenschappelijke motivering ten grondslag liggen. Bij de keuze van de drie opeenvolgende concentraties moet er rekening gehouden worden met alle bestaande toxicologische gegevens (bv. over de acute toxiciteit en huidirritatie) en structurele en fysiochemische gegevens over de desbetreffende teststof, wanneer die beschikbaar zijn, zodat bij de hoogste concentratie de blootstelling maximaal is zonder dat dit tot systemische toxiciteit en/of overmatige lokale huidirritatie leidt (19)(20 en hoofdstuk B.4 van deze bijlage). Wanneer dergelijke informatie niet beschikbaar is, kan een initiële voorafgaande screeningtest nodig zijn (zie punten 21-24).

19. Het medium mag het testresultaat niet verstoren of er invloed op uitoefenen en moet worden gekozen met het oog op de hoogste mate van oplosbaarheid, zodat de hoogst mogelijke concentratie wordt verkregen, terwijl de oplossing/suspensie geschikt moet zijn om de teststof mee aan te brengen. Aanbevolen media zijn aceton: olijfolie (4:1 v/v), *N,N*-dimethylformamide, methylethylketon, propyleenglycol en dimethylsulfoxide (6), maar ook een ander medium mag worden gebruikt als daarvoor een afdoende wetenschappelijke motivering wordt gegeven. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn als extra controle een klinisch relevant oplosmiddel te gebruiken of de commerciële formulering waarin de teststof in de handel wordt gebracht. Er moet vooral voor worden gezorgd dat er hydrofiele stoffen worden opgenomen in een medium dat de huid vochtig maakt en niet onmiddellijk wegloopt, door geschikte oplosmiddelen op te nemen (bv. 1 % Pluronic® L92). Een volledig waterig medium moet derhalve worden vermeden.

▼M3

20. Door de verwerking van lymfklieren van individuele muizen kan de spreiding over de dieren worden beoordeeld en kan een statistische vergelijking tussen de teststofmetingen en de metingen voor de met medium behandelde controlegroep worden uitgevoerd (zie punt 33). Daarnaast kan door het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren de mogelijkheid onderzocht worden om het aantal muizen in de PC-groep te verminderen (17). Verder vereisen sommige regelgevende autoriteiten het verzamelen van gegevens met betrekking tot individuele dieren. Het regelmatig vergaren van gegevens over individuele dieren brengt voordelen met zich mee op het vlak van dierenwelzijn, door dubbele tests te vermijden, die nodig zouden zijn wanneer de resultaten voor de teststoffen die aanvankelijk op een bepaalde manier verkregen werden (bv. via gepoolde gegevens over dieren) later door de regelgevende autoriteiten bekeken moeten worden volgens andere eisen (bv. gegevens over individuele dieren).

Voorafgaande screeningtest

21. Wanneer er geen gegevens beschikbaar zijn om de hoogste te testen dosis te bepalen (zie punt 18), moet een voorafgaande screeningtest worden uitgevoerd om de juiste dosis te bepalen die in de LLKT: BrdU-ELISA getest moet worden. Het doel van de voorafgaande screeningtest is om richtsnoeren te bieden voor het kiezen van de maximale dosis in het hoofdonderzoek van de LLKT: BrdU-ELISA, indien informatie over de concentratie die systemische toxiciteit induceert (zie punt 24) en/of bovenmatige lokale huidirritatie (zie punt 23) niet beschikbaar is. De maximale dosis die wordt getest, moet 100 % zijn van de teststof voor vloeibare stoffen of de hoogst mogelijke concentratie voor vaste stoffen of suspensies.

22. De voorafgaande screeningtest wordt uitgevoerd onder omstandigheden die identiek zijn aan die van het hoofdonderzoek van de LLKT: BrdU-ELISA, behalve dat er geen beoordeling is van de lymfklierproliferatie en er minder dieren per dosisgroep kunnen worden gebruikt. Aanbevolen wordt per dosisgroep een of twee dieren te gebruiken. Alle muizen worden dagelijks geobserveerd op klinische verschijnselen van systemische toxiciteit of lokale irritatie op de plaats van aanbrengen. Het lichaamsgewicht van de dieren wordt geregistreerd voorafgaand aan de test en vóór de beëindiging van de test (dag 6). Beide oren van iedere muis worden onderzocht op erytheem en de responsen worden ingeschaald met behulp van tabel 1 (20, en hoofdstuk B.4 van deze bijlage). De dikte van de oren wordt gemeten met behulp van een diktemeter (bv. een digitale micrometer of Peacock Dial-diktemeter) op dag 1 (vóór aanbrenging van de dosis), dag 3 (ongeveer 48 uur na de eerste dosis) en dag 6. Daarnaast kan op dag 6 de dikte worden bepaald door oorperforatiemetingen, die uitgevoerd moeten worden nadat de dieren op humane wijze zijn gedood. Bovenmatige huidirritatie wordt aangegeven door een erytheemscore ≥ 3 en/of een toename van de oordikte ≥ 25 % op een of meer van de meetdagen (21) (22). De hoogste dosis die voor het hoofdonderzoek van de LLKT wordt gekozen, is de volgende lagere dosis in de concentratiereeks van de voorafgaande screeningtest (zie punt 18) die geen systemische toxiciteit en/of bovenmatige huidirritatie veroorzaakt.

Tabel 1

Erytheemscores

Waarneming	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks waarneembaar)	1
Duidelijk gedefinieerd erytheem	2

▼M3

Waarneming	Score
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diep rood) tot korstvorming waardoor de inschaling van erytheem onmogelijk is	4

23. Naast een toename van de oordikte met 25 % (21) (22), is een statistisch significante toename van de oordikte bij de behandelde muizen in vergelijking met de controlemuizen ook gebruikt om irriterende stoffen in de LLKT te signaleren (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Echter, hoewel statistisch significante toenamen kunnen voorkomen bij een toename van de oordikte met minder dan 25 %, worden ze niet specifiek met bovenmatige huidirritatie in verband gebracht (25) (26) (27) (28) (29).

24. De volgende klinische waarnemingen kunnen duiden op systemische toxiciteit (30) wanneer gebruikt als onderdeel van een geïntegreerde beoordeling en kunnen derhalve de maximale dosis aangeven die in het hoofdonderzoek van de LLKT moet worden gebruikt: BrdU-ELISA: veranderingen in de werking van het zenuwstelsel (bv. pilo-erectie, ataxie, tremors en convulsies); veranderingen in gedrag (bv. agressiviteit, verandering in lichaamsverzorging, duidelijke verandering in het activiteitsniveau); veranderingen in ademhalingspatronen (d.w.z. veranderingen in de frequentie en intensiteit van het ademhalen, zoals kortademigheid, benauwdheid en gereutel) en veranderingen in de voedsel- en waterconsumptie. Daarnaast moet in de evaluatie rekening worden gehouden met tekenen van lethargie en/of gebrek aan reactiviteit alsmede klinische tekenen van meer dan lichte of voorbijgaande pijn en leed of een vermindering van het lichaamsgewicht van meer dan 5 % tussen dag 1 en dag 6, evenals het sterftecijfer. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevig en voortdurend leed vertonen, moeten op humane wijze worden gedood (31).

Proefopzet hoofdonderzoek

25. De proefopzet van het onderzoek is als volgt:

— *Dag 1:* Van elk dier apart wordt het gewicht en iedere klinische waarneming bepaald en vastgelegd. Er wordt 25 µL van de toepasselijke verdunning van de teststof, het medium zonder teststof of de PC (gelijktijdig of recent, in overeenstemming met het laboratoriumbeleid ten aanzien van punten 11-15) aangebracht op het dorsum van elk oor.

— *Dagen 2 en 3:* Herhaal de aanbrengprocedure van dag 1.

— *Dag 4:* Geen behandeling.

— *Dag 5:* Injecteer intra-peritoneaal 0,5 ml (5 mg/muis) BrdU-oplossing (10 mg/ml).

— *Dag 6:* Van elk dier worden het gewicht en iedere klinische waarneming vastgelegd. Ongeveer 24 uur (24 u) na de BrdU-injectie, worden de dieren op humane wijze gedood. De afvoerende auriculaire lymfklieren van elke muis worden uitgeprepareerd en voor elk dier afzonderlijk behandeld in gebufferde fosfaatsaline (PBS). Referentie (17) bevat gedetailleerde informatie en diagrammen voor de identificatie en het uitprepareren van de lymfklieren. Om de lokale respons van de huid verder te controleren in het hoofdonderzoek, kunnen aanvullende parameters, zoals het inschalen van oorerythemen of de metingen van de oordikte (verkregen met behulp van een diktemeter of een gewichtbepaling met een oorgatentang bij de necropsie) opgenomen worden in het onderzoeksprotocol.

▼M3

Bereiding van de celsuspensies

26. Er wordt voor elke muis een eencellige suspensie met lymfkliercellen (LKC) gemaakt die aan beide zijden werden uitgeprepareerd door de lymfklieren door het weefsel voorzichtig door een roestvrij stalen gaas met een maaswijdte van 200 μm te persen of gebruik te maken van een andere aanvaardbare techniek voor het maken van een eencellige suspensie (bv. gebruik van een plastic wegwerpstamper om de lymfklieren te pletten en ze daarna door een #70 nylon gaas te persen). De procedure voor het maken van de LKC-suspensie is van essentieel belang in deze test en elke operator moet deze vaardigheid daarom op voorhand verwerven. De lymfklieren van NC-dieren zijn bovendien klein, men moet dus voorzichtig te werk gaan om kunstmatige beïnvloeding van de SI-waarden te voorkomen. Het doelvolume van de LKC-suspensie moet in elk geval aangepast worden aan een vastgelegd geoptimaliseerd volume (ongeveer 15 ml). Het geoptimaliseerde volume is gestoeld op het bereiken van een gemiddelde absorptie bij de NC-groep tussen 0,1 - 0,2.

Bepaling van celproliferatie (meting van het BrdU-gehalte in het DNA van lymfocyten)

27. BrdU wordt gemeten via ELISA met behulp van een in de handel verkrijgbare kit (bv. Roche Applied Science, Mannheim, Germany, Catalogusnummer 11 647 229 001). 100 μL van de LKC-suspensie wordt snel in drievoud toegevoegd aan de putjes van een microtiterplaat met een vlakke bodem. Na de fixatie en denaturatie van de LKC worden anti-BrdU-antilichamen toegevoegd aan elk putje en wordt de reactie afgewacht. Vervolgens wordt het anti-BrdU-antilichaam verwijderd door spoeling, waarna de substraatoplossing wordt toegevoegd en er chromogeen geproduceerd wordt. Dan wordt de absorptie op 370 nm met een referentiegolflengte van 492 nm gemeten. In alle gevallen dienen de testomstandigheden voor de bepaling geoptimaliseerd te worden (zie punt 26).

WAARNEMINGEN

Klinische waarnemingen

28. Iedere muis wordt ten minste één keer per dag zorgvuldig geobserveerd op klinische verschijnselen van lokale irritatie op de plaats van aanbrengen of systemische toxiciteit. Alle waarnemingen worden systematisch geregistreerd en van elke muis wordt een apart overzicht bijgehouden. Waarnemingsschema's dienen criteria te omvatten om muizen die tekenen vertonen van systemische toxiciteit, overmatige lokale huidirritatie of huidcorrosie onmiddellijk aan te wijzen voor euthanasie (31).

Lichaamsgewicht

29. Zoals in punt 25 is vermeld, wordt aan het begin van de test en wanneer de dieren volgens schema op humane wijze worden gedood, van elk dier het lichaamsgewicht bepaald.

BEREKENING VAN RESULTATEN

30. De resultaten voor iedere behandelingsgroep worden uitgedrukt als de stimuleringsindex (SI). De SI wordt berekend door de gemiddelde BrdU merkingsindex/muis van elke groep behandeld met teststof en van de PC-groep, te delen door de gemiddelde BrdU merkingsindex/muis voor de oplosmiddel/medium-controlegroep. De gemiddelde SI voor de VC's is dan één.

De BrdU-merkingsindex wordt omschreven als:

$$\text{BrdU-merkingsindex} = (ABS_{em} - \text{ABS blanco}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS blanco}_{ref})$$

Waarbij: em = emissiegolflengte; en ref = referentiegolflengte.

▼M3

31. Binnen het beslissingsproces wordt een resultaat als positief beschouwd, indien SI ≥ 1,6 (10). De sterkte van het verband tussen de dosis en de respons, de statistische significantie en de consistentie van de respons op het medium en de PC kunnen echter ook gebruikt worden om te bepalen of een grensgeval (*i.e.* SI-waarde tussen 1,6 en 1,9) positief verklaard wordt (3) (6) (32).

32. Voor een net positieve respons met een SI tussen 1,6 en 1,9 kan het nuttig zijn om naast de SI-waarden ook aanvullende informatie zoals het verband tussen de dosis en de respons, bewijs voor systemische toxiciteit of overmatige irritatie, en waar nodig, statistische significantie in aanmerking te nemen om die resultaten als positief aan te merken (10). Er moet ook gekeken worden naar verschillende eigenschappen van de teststof, bijvoorbeeld of deze qua structuur verwant is met bekende huidsensibilisatoren, of de stof overmatige huidirritatie veroorzaakt bij de muis en wat de aard van het waargenomen verband tussen de dosis en de respons is. Deze en andere overwegingen worden elders gedetailleerd besproken (4).

33. Door gegevens te verzamelen op het niveau van de individuele muis, kan een statistische analyse worden uitgevoerd voor het bestaan van een dosis/responsverhouding binnen de gegevens en de mate waarin deze verhouding voorkomt. Elke statistische beoordeling kan een beoordeling van het verband tussen de dosis en de respons behelzen, alsmede gecorrigeerde vergelijkingen tussen testgroepen (*zoals.* vergelijkingen tussen een groep die de dosis paarsgewijs toegediend kreeg en een oplossingsmiddel/medium-controlegroep). Statistische analyses kunnen *bijvoorbeeld* een lineaire regressie of een William's test omvatten om de dosis-reactietendensen te beoordelen, en een Dunnett's test om paarsgewijze vergelijkingen te maken. Bij het kiezen van een geschikte statistische analysemethode moet de onderzoeker zich bewust blijven van mogelijke variantie-heterogeniteit en andere soortgelijke problemen, die een gegevenstransformatie of een niet-parametrische statistische analyse noodzakelijk kunnen maken. In ieder geval kan het nodig zijn dat de onderzoeker SI-berekeningen en statistische analyses uitvoert met en zonder bepaalde gegevenspunten (soms „uitbijters" genoemd).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

34. Gegevens dienen samengevat te worden in de vorm van een tabel waarin de individuele BrdU-merkingsindexwaarden voor de dieren, de gemiddelde BrdU-merkingsindex/dier voor de groep, het bijbehorende residu (bv. SD, SEM) en de gemiddelde SI voor elke doseringsgroep wordt weergegeven en vergeleken wordt met de parallelle oplossingsmiddel/medium-controlegroep.

Testverslag

35. In het testverslag wordt de volgende informatie opgenomen:

Test- en controlestoffen:

— identificatiegegevens (bv. CAS-nummer en EG-nummer, indien beschikbaar; bron; zuiverheid; bekende onzuiverheden; partijnummer);

— de fysische aard en de fysisch-chemische eigenschappen (bv. de vluchtigheid, de stabiliteit en de oplosbaarheid);

— bij een mengsel de samenstelling met voor elk bestanddeel het procentuele gehalte;

Oplosmiddel/medium:

— identificatiegegevens (zuiverheid; concentratie, indien van toepassing; gebruikt volume);

— motivering van de keuze van het medium;

▼**M3**

Proefdieren:

— bron van CBA-muizen;

— microbiologische status van de dieren, indien bekend;

— aantal en leeftijd van de dieren;

— de herkomst van de dieren, de huisvesting, de voeding enz.;

Testomstandigheden:

— de bron, het partijnummer en de gegevens van de producent over de kwaliteitsgarantie/kwaliteitscontrole (gevoeligheid van antilichamen en specifieke aard en beperkingen van de opsporing) voor de ELISA-kit;

— gedetailleerde gegevens over de formulering en het aanbrengen van de teststof;

— motivering voor dosiskeuze (met inbegrip van resultaten van voorafgaande screeningtest, indien uitgevoerd);

— gebruikte concentraties van medium en teststof en totale hoeveelheid teststof die is aangebracht;

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en het water (waaronder de aard en de herkomst van het voer en de herkomst van het water);

— gedetailleerde gegevens met betrekking tot het behandelings- en bemonsteringsschema;

— methoden voor de meting van de toxiciteit;

— criteria om te bepalen of het resultaat positief of negatief is;

— gedetailleerde gegevens met betrekking tot protocolafwijkingen en een uitleg van hoe de afwijking van invloed is op de opzet en resultaten van het onderzoek;

Betrouwbaarheidscontrole:

— overzicht van de resultaten van de meest recente betrouwbaarheidscontrole met informatie over de teststof, de concentratie en het gebruikte medium;

— tegelijkertijd en/of in het verleden bepaalde positieve en tegelijkertijd bepaalde negatieve (oplosmiddel/medium) controlegegevens voor het testlaboratorium;

— indien geen gelijktijdige PC is uitgevoerd, de datum en het laboratoriumverslag voor de meest recente periodieke PC en een verslag met de historische PC-gegevens voor het laboratorium waarin de beslissing om geen gelijktijdige PC uit te voeren, wordt gemotiveerd;

Resultaten:

— het gewicht van elke muis aan het begin van de test en wanneer ze volgens schema wordt gedood; alsmede het gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor elke behandelingsgroep;

— voor elk dier het tijdstip waarop de eventuele toxiciteitsverschijnselen zich voordoen, met inbegrip van huidirritatie op de toedieningsplaats, en het verloop daarvan;

— een tabel met de BrdU-merkingsindices voor elke muis en de SI-waarden voor elke doseringsgroep;

— gemiddelde bijbehorende residu (bv. SD, SEM) voor BrdU-merkingsindex/muis voor elke behandelingsgroep en de resultaten van de uitbijteranalyse voor elke behandelingsgroep;

▼M3

— berekende SI en een geschikte meting van de variabiliteit die rekening houdt met de spreiding over de dieren in zowel de teststof- als de controlegroepen;

— het verband tussen dosis en respons;

— statistische analyses, indien van toepassing;

Bespreking van de resultaten:

— Een korte bespreking van de resultaten, de dosis/respons-analyse en de statistische analyses, indien van toepassing, met een conclusie ten aanzien van de vraag of de teststof als huidsensibilisator moet worden beschouwd.

LITERATUUR

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/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. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van relevantie. Deze term en de term „concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (33).

IJkstof: een sensibiliserende of niet-sensibiliserende stof die gebruikt wordt als norm voor vergelijking met een teststof. Een ijkstof dient de volgende eigenschappen te hebben: i) consistente en betrouwbare bron(nen); ii) in structureel en functioneel opzicht soortgelijk aan de geteste klasse stoffen; iii) bekende fysisch-chemische eigenschappen; iv) ondersteunende gegevens met betrekking tot bekende effecten; en v) bekende potentie binnen het bereik van de gewenste respons.

Valsnegatief: een teststof die door een testmethode ten onrechte als negatief of niet-actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof feitelijk positief of actief is (33).

Valspositief: een teststof die ten onrechte als positief of actief wordt geïdentificeerd, terwijl de stof in feite negatief of niet-actief is (33).

Gevaar: het risico van een nadelig effect op de gezondheid of het milieu. Het nadelige effect doet zich alleen voor indien er voldoende blootstelling is.

Interlaboratoriumreproduceerbaarheid: een maatstaf voor de mate waarin verschillende gekwalificeerde laboratoria die gebruikmaken van hetzelfde protocol en die dezelfde teststoffen testen, in kwalitatief en kwantitatief opzicht vergelijkbare resultaten kunnen produceren. De interlaboratoriumreproduceerbaarheid wordt bepaald tijdens de prevaliderings- en valideringsprocessen en geeft aan in hoeverre een test met succes tussen laboratoria kan worden overgedragen; dit wordt ook wel reproduceerbaarheid tussen laboratoria genoemd (33).

Intralaboratoriumreproduceerbaarheid: een bepaling van de mate waarin gekwalificeerde mensen binnen hetzelfde laboratorium met succes resultaten kunnen repliceren met gebruikmaking van een specifiek protocol op verschillende tijdstippen. Dit wordt ook reproduceerbaarheid binnen laboratoria genoemd (33).

Uitbijter: een uitbijter is een waarneming die duidelijk afwijkt van andere waarden binnen een willekeurige steekproef uit een populatie.

Kwaliteitsborging: een beheerproces waarbij de naleving van de testnormen, eisen en boekhoudingsprocedures voor laboratoria alsmede de nauwkeurigheid van de gegevensoverdracht worden beoordeeld door personen die onafhankelijk zijn van degenen die de tests uitvoeren.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden toegepast. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid (33).

Huidsensibilisatie: een immunologisch proces dat ontstaat wanneer een vatbare persoon of proefdier plaatselijk wordt blootgesteld aan een inducerend chemisch allergeen, dat een immunologische huidreactie veroorzaakt die kan leiden tot de ontwikkeling van contactsensibilisatie.

Stimuleringsindex (SI): een waarde die wordt berekend om het huidsensibilisatiepotentieel van een teststof te beoordelen en die gelijk is aan de verhouding van de proliferatie bij behandelde groepen ten opzichte van de proliferatie bij de gelijktijdig met medium behandelde controlegroep.

Teststof: iedere stof of ieder mengsel die/dat met deze TM wordt getest.

▼M4

B.52. ACUTE INHALATIETOXICITEIT: METHODE TER BEPALING VAN DE ACUTE-TOXICITEITSKLASSE

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 436 (2009) van de OESO (TG 436). TG 403, de eerste testrichtlijn voor acute inhalatie, werd in 1981 vastgesteld en is sindsdien aangepast (zie hoofdstuk B.2 van deze bijlage (1)). De ontwikkeling van een methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse (ATC) voor inhalatie (2)(3)(4) werd opportuun geacht na de vaststelling van de herziene ATC-methode voor orale toxiciteit (hoofdstuk B.1 ter van deze bijlage) (5). Een retrospectieve prestatiebeoordeling van de ATC-testmethode voor acute inhalatietoxiciteit wees uit dat de methode geschikt is voor toepassing voor indelings- en etiketteringsdoeleinden (6). De ATC-testmethode voor inhalatie zal het mogelijk maken seriële stappen van vaste doelconcentraties toe te passen om te komen tot een toxiciteitsrangschikking van teststoffen. Sterfte wordt gebruikt als belangrijkste eindpunt, maar als er sprake is van hevige pijn of angst of ophanden zijnde sterfte van dieren, worden deze dieren op humane wijze gedood om het lijden te beperken. OESO-leidraad nr. 19 (7) bevat richtsnoeren voor humane eindpunten.

2. Richtsnoeren voor de uitvoering en interpretatie van deze testmethode zijn opgenomen in leidraad nr. 39 betreffende tests op acute inhalatietoxiciteit (GD 39(8)).

3. De in de context van deze testmethode gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1 en in GD 39 (8).

4. De testmethode levert informatie over de gevaarlijke eigenschappen op en maakt het mogelijk de teststof te rangschikken en in te delen overeenkomstig Verordening (EG) nr. 1272/2008 voor de indeling van chemische stoffen die acute toxiciteit veroorzaken (9). Als puntschattingen van de LC_{50}-waarden of concentratie-responsanalysen vereist zijn, is de methode in hoofdstuk B.2 van deze bijlage (1) de aangewezen testmethode. Nadere richtsnoeren voor de keuze van testmethoden zijn opgenomen in GD 39 (8). Deze testmethode is niet specifiek bedoeld voor het testen van speciale materialen, zoals slecht oplosbare isometrische materialen of vezelmaterialen of gefabriceerde nanomaterialen.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

5. Alvorens te overwegen deze testmethode toe te passen, moet het testlaboratorium alle beschikbare informatie over de teststof, met inbegrip van bestaande studies waarvan de gegevens een argument vormen om geen aanvullende tests uit te voeren, in aanmerking nemen teneinde het gebruik van dieren tot een minimum te beperken. Voor de keuze van de geschiktste soorten, stam, geslacht, wijze van blootstelling en testconcentraties kan onder meer gebruik worden gemaakt van informatie over de identiteit, chemische structuur en fysisch-chemische eigenschappen van de teststof; de resultaten van eventuele in vitro of in vivo uitgevoerde toxiciteitstests; de voorgenomen toepassing(en) en de potentiële blootstelling van de mens; en de beschikbare (Q)SAR-gegevens en toxicologische gegevens over chemische stoffen met een verwante structuur. Bij deze testmethode mogen geen concentraties worden gebruikt waarvan verwacht wordt dat zij door een bijtende ([1]) of sterk irriterende werking hevige pijn en angst opleveren (zie GD 39 (8)).

([1]) De bijtende werking kan worden gebaseerd op het oordeel van deskundigen, met behulp van gegevens als: ervaring bij mens en dier, bestaande (in-vitro)gegevens, bv. de hoofdstukken B.40 (10) en B.40 bis (11) van deze bijlage of TG 435 van de OESO (12), pH-waarden, informatie over soortgelijke chemische stoffen of andere relevante gegevens.

▼M4

PRINCIPE VAN DE TEST

6. Het principe van de test is dat tijdens een vier uur durende blootstelling stapsgewijs voldoende informatie over de acute inhalatietoxiciteit van de teststof wordt verkregen om indeling van de stof mogelijk te maken. Voor specifieke regelgevingsdoeleinden kan een andere blootstellingsduur vereist zijn. Bij elk van de gedefinieerde concentratiestappen worden drie dieren van elk geslacht getest. Afhankelijk van het aantal dode en/of stervende dieren kunnen twee stappen volstaan om een uitspraak over de acute toxiciteit van de teststof te kunnen doen. Als er aanwijzingen zijn dat het ene geslacht mogelijk gevoeliger is dan het andere, kan de test uitsluitend met dieren van het gevoeligste geslacht worden voortgezet. De uitkomst van de voorgaande stap is bepalend voor de volgende stap, waarbij er de volgende mogelijkheden zijn:

   a) er zijn geen verdere tests nodig;

   b) er worden drie dieren per geslacht getest, of

   c) er worden uitsluitend zes dieren van het gevoeligste geslacht getest, d.w.z. dat de geschatte ondergrens van de toxiciteitsklasse wordt gebaseerd op zes dieren per testconcentratiegroep, ongeacht het geslacht.

7. Stervende dieren of dieren die duidelijk pijn hebben of tekenen van hevige en voortdurende angst vertonen, worden op humane wijze gedood en worden bij de interpretatie van de testresultaten op dezelfde manier behandeld als dieren die tijdens de test gestorven zijn. Leidraad nr. 19 inzake humane eindpunten (7) bevat criteria om te bepalen of stervende of hevig lijdende dieren moeten worden gedood en richtsnoeren om voorspelbare of ophanden zijnde sterfte te herkennen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

8. Er worden gezonde jonge volwassen dieren van gangbare laboratoriumstammen gebruikt. Er wordt de voorkeur gegeven aan ratten; het gebruik van andere soorten moet worden gemotiveerd.

Voorbereiding van de dieren

9. De vrouwtjes mogen nog geen jongen hebben gehad en mogen niet drachtig zijn. Op de dag van blootstelling moeten de jonge volwassen dieren acht tot twaalf weken oud zijn en een lichaamsgewicht hebben dat niet meer dan 20 % afwijkt van het gemiddelde gewicht voor elk geslacht van eerder blootgestelde dieren van dezelfde leeftijd. De dieren worden willekeurig gekozen en gemerkt om elk dier afzonderlijk te kunnen identificeren. De dieren blijven voordat de test begint minimaal vijf dagen in hun kooi om in het laboratorium te acclimatiseren. Vlak voor de test acclimatiseren de dieren ook enige tijd in het testapparaat, aangezien hierdoor de stress als gevolg van de nieuwe omgeving zal afnemen.

Dierhouderij

10. De temperatuur van de ruimte waar de proefdieren verblijven, moet 22 ± 3 °C zijn. De relatieve vochtigheid wordt idealiter tussen 30 en 70 % gehouden, maar wanneer water als medium wordt gebruikt, zal dit niet altijd mogelijk zijn. Voor en na de blootstelling worden de dieren over het algemeen groepsgewijs in kooien ondergebracht, waarbij zij naar geslacht en concentratie worden gescheiden; het aantal dieren per kooi mag echter niet zo groot zijn dat een duidelijke observatie van elk dier wordt gestoord en moet zodanig worden gekozen dat er zo min mogelijk dieren verloren gaan als gevolg van kannibalisme en gevechten. Wanneer de dieren uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan acclimatisatie voor de fixeerbuizen noodzakelijk zijn. De fixeerbuizen mogen geen onnodige lichamelijke, thermische of immobilisatiestress voor de dieren opleveren. De immobilisatie

▼M4

kan van invloed zijn op fysiologische eindpunten zoals de lichaamstemperatuur (hyperthermie) en/of het ademminuutvolume. Als er generieke gegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat geen significante veranderingen als gevolg van de immobilisatie optreden, is geen voorafgaande gewenning aan de fixeerbuizen noodzakelijk. Dieren die met hun hele lijf aan een aerosol worden blootgesteld, worden tijdens de blootstelling individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij het testaerosol filteren door de vacht van hun kooigenoten. Er kan gebruik worden gemaakt van gebruikelijk en gecertificeerd laboratoriumvoeder, behalve tijdens de blootstelling, met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater uit de waterleiding. Er wordt kunstlicht gebruikt met een cyclus van 12 uur licht/12 uur donker.

Inhalatiekamers

11. Bij de keuze van de inhalatiekamer wordt rekening gehouden met de aard van de teststof en het doel van de test. Blootstelling via de neus alleen heeft de voorkeur (hieronder vallen blootstelling via de kop alleen, blootstelling via de neus alleen en blootstelling via de snuit alleen). Blootstelling via de neus alleen heeft over het algemeen de voorkeur voor studies van vloeibare of vaste aerosolen en voor dampen die kunnen condenseren tot aerosolen. Speciale doelstellingen van de studie kunnen beter worden verwezenlijkt door blootstelling van het hele lijf, maar dit moet in het studieverslag worden gemotiveerd. Om bij gebruik van een kamer voor het hele lijf te zorgen voor een stabiele atmosfeer, mag het totale volume van de testdieren niet meer dan 5 % van het volume van de kamer innemen. De technische principes voor blootstelling via de neus alleen en blootstelling van het hele lijf, alsook de specifieke voor- en nadelen ervan, zijn uiteengezet in GD 39 (8).

BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Toediening van concentraties

12. Er wordt een vaste blootstellingsduur van vier uur, exclusief equilibratietijd, aanbevolen. In verband met specifieke eisen kan een andere duur noodzakelijk zijn, maar dit moet in het studieverslag worden gemotiveerd (zie GD 39 (8)). Dieren die in een kamer voor het hele lijf worden blootgesteld, worden afzonderlijk gehuisvest om ingestie van de teststof door het verzorgen van kooigenoten te voorkomen. Tijdens de blootstellingsperiode krijgen de dieren geen voeder. Tijdens een blootstelling van het hele lijf kan de dieren water worden gegeven.

13. De dieren worden aan de teststof blootgesteld in de vorm van gas, damp, aerosol of een mengsel daarvan. De te testen fysische toestand hangt af van de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, de gekozen concentratie en/of de meest waarschijnlijke fysische vorm waarin de teststof bij hantering en gebruik aanwezig is. Hygroscopische en chemisch reactieve teststoffen moeten worden getest in drogeluchtomstandigheden. Er dient op te worden gelet dat er geen explosieve concentraties optreden.

Deeltjesgrootteverdeling

14. Voor alle aerosolen en voor dampen die tot aerosolen kunnen condenseren, wordt de deeltjesgrootte bepaald. Om blootstelling van alle relevante delen van de ademhalingswegen mogelijk te maken, worden aerosolen met een massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) tussen 1 en 4 μm en een geometrische standaardafwijking (σ_g) tussen 1,5 en 3,0 aanbevolen (8)(13)(14). Hoewel redelijkerwijs moet worden getracht deze normwaarden te halen, wordt het oordeel van een deskundige gegeven als dit niet mogelijk blijkt. Zo kunnen de deeltjes van metaaldampen kleiner zijn dan deze norm, terwijl geladen deeltjes, vezels en hygroscopische materialen (die in de vochtige omgeving van de ademhalingswegen opzwellen) de norm kunnen overschrijden.

▼M4

Bereiding van de teststof in een medium

15. Er kan een medium worden gebruikt om een passende concentratie en deeltjesgrootte van de teststof in de atmosfeer te verkrijgen. Als algemene regel wordt de voorkeur gegeven aan water. Deeltjesmateriaal kan aan mechanische processen worden onderworpen om de gewenste deeltjesgrootteverdeling te verkrijgen, waarbij er echter op moet worden gelet dat de teststof niet wordt ontbonden of gewijzigd. Als de samenstelling van de teststof mogelijk is gewijzigd door mechanische processen (bv. als er bij overvloedig malen door wrijving een extreme temperatuur is ontstaan), wordt de samenstelling analytisch gecontroleerd. Er dient zorgvuldig op te worden gelet dat de teststof niet wordt verontreinigd. Niet-broze korrelige materialen die met opzet zo zijn samengesteld dat zij niet-inhaleerbaar zijn, hoeven niet te worden getest. Aan de hand van een slijtageproef moet worden aangetoond dat bij de hantering van het korrelige materiaal geen inhaleerbare deeltjes ontstaan. Als bij een slijtageproef inhaleerbare deeltjes ontstaan, wordt een test op inhalatietoxiciteit verricht.

Controledieren

16. Er is geen parallelle negatieve controlegroep (lucht) noodzakelijk. Wanneer voor het verkrijgen van de testatmosfeer een ander medium dan water wordt gebruikt, moet alleen een controlegroep voor dat medium worden gebruikt wanneer er geen historische gegevens over de inhalatietoxiciteit beschikbaar zijn. Indien een toxiciteitsstudie van een in een medium bereide teststof uitwijst dat er geen toxiciteit optreedt, volgt hieruit dat het medium bij de geteste concentratie niet toxisch is; in dat geval is er geen mediumcontrole noodzakelijk.

CONTROLE VAN DE BLOOTSTELLINGSOMSTANDIGHEDEN

Luchtdoorstroming in de kamer

17. Tijdens elke blootstelling wordt de luchtdoorstroming in de kamer zorgvuldig geregeld, voortdurend gecontroleerd en ten minste elk uur geregistreerd. De controle van de concentratie (of stabiliteit) van de testatmosfeer is een integrale meting van alle dynamische parameters waarbij indirect alle relevante dynamische parameters voor het verkrijgen van de atmosfeer kunnen worden geregeld. Wanneer kamers voor blootstelling via de neus alleen worden gebruikt, moet er in het bijzonder op worden gelet dat de uitgeademde lucht niet opnieuw wordt ingeademd indien de luchtdoorstroming in het blootstellingssysteem ontoereikend is om een dynamische luchtdoorstroming van de teststofatmosfeer te verkrijgen. Er zijn voorgeschreven methoden die kunnen worden toegepast om aan te tonen dat de uitgeademde lucht bij de gekozen operationele omstandigheden niet opnieuw wordt ingeademd (8)(15). Het zuurstofgehalte moet ten minste 19 % bedragen en het kooldioxidegehalte niet meer dan 1 %. Als er redenen zijn om aan te nemen dat deze normwaarden niet kunnen worden gehaald, moet de zuurstof- en kooldioxideconcentratie worden gemeten.

Temperatuur en relatieve vochtigheid in de kamer

18. De temperatuur in de kamer moet op 22 ± 3 °C worden gehouden. Bij blootstelling via de neus alleen en bij blootstelling van het hele lijf wordt de relatieve vochtigheid in het ademhalingsgebied van de dieren gecontroleerd en bij een blootstellingsduur tot vier uur ten minste drie keer en bij een kortere blootstelling ieder uur geregistreerd. De relatieve vochtigheid wordt idealiter tussen 30 en 70 % gehouden, al zal dit niet altijd haalbaar (bv. wanneer mengsels op waterbasis worden getest) of meetbaar zijn vanwege interferentie tussen de teststof en de testmethode.

▼M4

Teststof: nominale concentratie

19. Waar mogelijk wordt de nominale concentratie in de blootstellingskamer berekend en geregistreerd. De nominale concentratie is de massa van de gegenereerde teststof gedeeld door het totale luchtvolume dat door het kamersysteem wordt geleid. De nominale concentratie wordt niet gebruikt om de blootstelling van de dieren te karakteriseren, maar een vergelijking tussen de nominale en de feitelijke concentratie vormt een aanwijzing voor het rendement van het testsysteem en kan bijgevolg worden gebruikt om problemen bij het genereren te ontdekken.

Teststof: feitelijke concentratie

20. De feitelijke concentratie is de concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren in een inhalatiekamer. De feitelijke concentraties kunnen worden verkregen door toepassing van specifieke methoden (bv. rechtstreekse bemonstering of op adsorptie of een chemische reactie gebaseerde methoden, gevolgd door analytische karakterisering) of niet-specifieke methoden, zoals gravimetrische filteranalyse. Gravimetrische analysen zijn alleen aanvaardbaar voor aerosolen van poeders met één component of aerosolen van vloeistoffen met een geringe vluchtigheid en moeten worden ondersteund met passende specifieke karakteriseringen van de teststof voorafgaand aan de studie. De concentratie van aerosolen van poeders met meerdere componenten kan ook door middel van gravimetrische analyse worden bepaald. In dat geval zijn echter analytische gegevens vereist die aantonen dat de samenstelling van het materiaal in de lucht vergelijkbaar is met die van het uitgangsmateriaal. Als deze informatie niet beschikbaar is, kan het nodig zijn in de loop van de studie op gezette tijden een nieuwe analyse van de teststof (idealiter in de toestand in de lucht) uit te voeren. Voor geaerosoliseerde stoffen die kunnen verdampen of sublimeren, moet worden aangetoond dat met de gekozen methoden alle fasen zijn verzameld. In het studieverslag worden de doelconcentratie, de nominale concentratie en de feitelijke concentratie vermeld, maar in statistische analysen voor de berekening van de letale concentratiewaarden wordt uitsluitend gebruikgemaakt van de feitelijke concentraties.

21. Er wordt zo mogelijk één partij van de teststof gebruikt en het testmonster wordt bewaard onder omstandigheden waarbij de zuiverheid, homogeniteit en stabiliteit behouden blijven. Voor aanvang van de studie worden de teststof, met inbegrip van de zuiverheid, en indien technisch mogelijk de identiteit en de hoeveelheden van vastgestelde verontreinigingen en onzuiverheden gekarakteriseerd. Dit kan onder meer met de volgende gegevens worden aangetoond: retentietijd en relatief piekoppervlak, moleculair gewicht op basis van massaspectroscopie of gaschromatografie, of andere schattingen. Hoewel het testlaboratorium niet verantwoordelijk is voor de identiteit van het testmonster, kan het raadzaam zijn dat het testlaboratorium de karakterisering van de opdrachtgever ten minste in beperkte mate bevestigt (bv. kleur, fysische aard enz.).

22. De blootstellingsatmosfeer wordt zo constant mogelijk gehouden en, afhankelijk van de analysemethode, voortdurend en/of met tussenpozen gecontroleerd. Wanneer met tussenpozen wordt bemonsterd, wordt in een studie van vier uur ten minste twee keer een monster van de kameratmosfeer genomen. Als dit vanwege de beperkte luchtdoorstroming of lage concentraties niet mogelijk is, kan één monster gedurende de volledige blootstellingsperiode worden verzameld. Indien significante fluctuaties tussen monsters optreden, worden bij de volgende geteste concentraties vier monsters per blootstelling genomen. Het verschil tussen individuele monsters van de kamerconcentratie en de gemiddelde kamerconcentratie mag bij gassen en dampen niet meer dan ± 10 % en bij vloeibare of vaste aerosolen niet meer dan ± 20 % bedragen. De equilibratietijd van de kamer (t_{95}) wordt berekend en geregistreerd. De blootstellingsduur omvat de tijd waarin de teststof wordt gegenereerd en houdt rekening met de tijd die nodig is om t_{95} te bereiken. In GD 39 (8) zijn richtsnoeren voor het schatten van t_{95} opgenomen.

▼M4

23. Voor zeer complexe mengsels bestaande uit dampen/gassen en aerosolen (bv. verbrandingsatmosferen en teststoffen die zijn ontleend aan doelgerichte eindproducten of apparaten), kan elke fase zich in een inhalatiekamer verschillend gedragen, zodat van elke fase (damp/gas en aerosol) ten minste één indicatorstof (analyt) moet worden gekozen, normaliter de voornaamste werkzame stof in het mengsel. Wanneer de teststof een mengsel is, wordt de analytische concentratie vermeld voor het totale mengsel, en niet slechts voor het werkzame bestanddeel of de component (analyt). Aanvullende informatie over feitelijke concentraties is opgenomen in GD 39 (8).

Teststof: deeltjesgrootteverdeling

24. De deeltjesgrootteverdeling van aerosolen wordt tijdens elke blootstelling van vier uur ten minste twee keer bepaald met behulp van een cascade-impactor of een alternatief instrument, zoals een aerodynamische deeltjesgroottemeter. Indien kan worden aangetoond dat de met een cascade-impactor of een alternatief instrument verkregen resultaten gelijkwaardig zijn, mag het alternatieve instrument gedurende de hele studie worden gebruikt. Parallel aan het primaire instrument wordt een tweede instrument, zoals een gravimetrisch filter of een impinger/gas bubbler gebruikt om de doeltreffendheid van de verzameling met het primaire instrument te bevestigen. De door middel van deeltjesgrootteanalyse en filteranalyse verkregen massaconcentraties moeten in redelijke mate overeenkomen (zie GD 39 (8)). Indien in een vroeg stadium van de studie de gelijkwaardigheid kan worden aangetoond, zijn verdere bevestigende metingen niet nodig. Met het oog op het dierenwelzijn moeten maatregelen worden genomen om zo veel mogelijk te voorkomen dat niet-overtuigende gegevens worden verkregen waardoor herhaling van de blootstelling noodzakelijk is. Voor dampen wordt de deeltjesgrootte bepaald indien de mogelijkheid bestaat dat de dampen condenseren waardoor aerosolvorming optreedt of indien in een dampatmosfeer deeltjes worden gedetecteerd waarbij gemengde fasen kunnen optreden (zie punt 14).

PROCEDURE

Hoofdtest

25. Voor elke stap wordt gebruikgemaakt van drie dieren van elk geslacht of zes dieren van het gevoeligste geslacht. Wanneer andere knaagdieren dat ratten uitsluitend via de neus worden blootgesteld, kan de maximale blootstellingsduur worden aangepast om soortspecifieke symptomen van angst te voorkomen. Van de vier vaste doses wordt er één als aanvangsconcentratie gekozen, namelijk die waarbij naar alle waarschijnlijkheid toxiciteit bij enkele dieren zal optreden. De testschema's voor gassen, dampen en aerosolen (opgenomen in de aanhangsels 2-4) vertegenwoordigen tests met de drempelwaarden van de CLP-categorieën 1-4 (9) voor gassen (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (aanhangsel 2), voor dampen (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (aanhangsel 3) en voor aerosolen (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (aanhangsel 4). Categorie 5, die niet bij Verordening (EG) nr. 1272/2008 (9) ten uitvoer wordt gelegd, betreft concentraties boven de desbetreffende limietconcentraties. Voor elke aanvangsconcentratie is het desbetreffende testschema van toepassing. De pijlen geven, afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze gedode dieren, de procedure aan die moet worden gevolgd totdat indeling mogelijk is.

26. De tijdsduur tussen de blootstelling van de verschillende groepen wordt bepaald door de aanvang, de duur en de ernst van de toxiciteitsverschijnselen. De blootstelling van dieren bij het volgende concentratieniveau wordt uitgesteld totdat een redelijk vertrouwen bestaat dat de eerder geteste dieren zullen overleven. Er wordt aanbevolen tussen de blootstellingen op elk concentratieniveau een periode van drie of vier dagen in te lassen om observatie van vertraagde toxiciteit mogelijk te maken. Dit interval kan zo nodig worden aangepast, bijvoorbeeld bij onduidelijke reacties.

▼M4

Limiettest

27. De limiettest wordt toegepast indien bekend is of verwacht wordt dat de teststof praktisch niet-toxisch is, d.w.z. dat een toxische reactie alleen optreedt boven de in de regelgeving bepaalde limietconcentratie. Informatie over de toxiciteit van de teststof kan afkomstig zijn van kennis omtrent vergelijkbare geteste stoffen of vergelijkbare mengsels, waarbij rekening wordt gehouden met de identiteit en het percentage van de bestanddelen waarvan bekend is dat zij in toxicologisch opzicht relevant zijn. Wanneer er weinig of geen informatie over de toxiciteit van de teststof is of wordt verwacht dat de teststof toxisch is, moet de hoofdtest worden uitgevoerd (verdere richtsnoeren staan in GD 39 (8)).

28. Als limiettest voor deze testmethode worden volgens de normale procedure drie dieren van elk geslacht of zes dieren van het gevoeligste geslacht blootgesteld aan concentraties van 20 000 ppm voor gassen, 20 mg/l voor dampen en 5 mg/l voor stof/nevels (indien haalbaar). Wanneer aerosolen worden getest, is het primaire doel een in te ademen deeltjesgrootte te verkrijgen (d.w.z. een MMAD van 1-4 μm). Voor de meeste teststoffen is dit mogelijk bij een concentratie van 2 mg/l. Aerosolen mogen alleen bij een hogere concentratie dan 2 mg/l worden getest indien een in te ademen deeltjesgrootte kan worden verkregen (zie GD 39 (8)). Overeenkomstig het GHS (16) worden tests boven een limietconcentratie met het oog op het dierenwelzijn afgeraden. Tests in GHS-categorie 5 (16), die niet bij Verordening (EG) nr. 1272/2008 (9) ten uitvoer wordt gelegd, moeten alleen worden overwogen wanneer het zeer waarschijnlijk is dat de resultaten van een dergelijke test rechtstreeks van belang zijn om de gezondheid van mensen te beschermen, en moeten in het studieverslag worden gemotiveerd. Als de teststof kan ontploffen, moet worden vermeden dat zich omstandigheden voordoen waarin een explosie kan optreden. Om onnodig gebruik van dieren te voorkomen wordt de limiettest van tevoren één keer zonder dieren uitgevoerd om te waarborgen dat de kameromstandigheden voor een limiettest kunnen worden bereikt.

OBSERVATIES

29. De dieren worden tijdens de blootstellingsperiode veelvuldig klinisch geobserveerd. Na de blootstelling worden op dezelfde dag nog ten minste twee klinische observaties verricht, of meer als de respons van de dieren op de behandeling daartoe aanleiding geeft, en vervolgens gedurende veertien dagen ten minste één keer per dag. De duur van de observatieperiode staat niet vast, maar wordt bepaald op grond van de aard en het aanvangstijdstip van klinische symptomen en de duur van de herstelperiode. Het is belangrijk op welk tijdstip de toxiciteitsverschijnselen verschijnen en verdwijnen, vooral als er een neiging is tot vertraagde toxiciteitsverschijnselen. Alle observaties worden systematisch geregistreerd en van elk dier wordt een apart overzicht bijgehouden. Dieren die stervend worden aangetroffen en dieren die hevige pijn hebben en/of blijvende tekenen van hevige angst vertonen, worden met het oog op het dierenwelzijn op humane wijze gedood. Wanneer onderzoek wordt gedaan naar klinische toxiciteitsverschijnselen, moet erop worden gelet dat een aanvankelijk slecht uiterlijk aspect en voorbijgaande veranderingen in de ademhaling als gevolg van de blootstellingsprocedure, niet worden aangezien voor aan de behandeling gerelateerde effecten. Er moet rekening worden gehouden met de beginselen en criteria in de leidraad voor humane eindpunten (7). Wanneer dieren om redenen van dierenwelzijn worden gedood of dood worden aangetroffen, wordt zo nauwkeurig mogelijk geregistreerd op welk tijdstip ze zijn gestorven.

▼M4

30. Bij externe observaties van de dieren in de kooien wordt gekeken naar veranderingen in de huid en de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en gedragspatronen. Waar mogelijk moet een onderscheid worden gemaakt tussen lokale en systemische effecten. Er moet worden gelet op de observatie van tremors, convulsies, speekselafscheiding, diarree, lethargie, slaap en coma. Een meting van de rectale temperatuur kan ondersteunende gegevens opleveren voor met de behandeling of opsluiting verband houdende reflectoire bradypneu of hypo-/hyperthermie.

Lichaamsgewicht

31. Het gewicht van elk dier wordt tijdens de acclimatiseringsperiode één keer geregistreerd, op dag 0 (de dag van blootstelling) voorafgaand aan de blootstelling en ten minste op de dagen 1, 3 en 7 (en vervolgens iedere week), alsook op het moment waarop het dier sterft of wordt geëuthanaseerd als dit na dag 1 is. Het lichaamsgewicht is erkend als een kritische indicator van toxiciteit en dieren die een blijvende gewichtsafname van $\geq$ 20 % vertonen ten opzichte van de voor de studie geregistreerde waarde, moeten zorgvuldig worden gevolgd. Aan het einde van de periode na de blootstelling worden de dieren die nog leven, gewogen en op humane wijze gedood.

Pathologie

32. Op alle proefdieren, met inbegrip van de dieren die tijdens de test sterven of met het oog op het dierenwelzijn worden geëuthanaseerd en uit het onderzoek worden genomen, wordt macroscopische obductie uitgevoerd. Als het niet mogelijk is onmiddellijk nadat een dood dier is aangetroffen een obductie te verrichten, wordt het dier gekoeld (niet bevroren) bij temperaturen die laag genoeg zijn om de autolyse tot een minimum te beperken. De obductie wordt zo spoedig mogelijk verricht, normaliter binnen één of twee dagen. Alle met het blote oog waarneembare pathologische veranderingen worden voor elk dier geregistreerd, met bijzondere aandacht voor veranderingen in de luchtwegen.

33. Om de interpretatieve waarde van de studie te vergroten, kan worden overwogen aanvullend onderzoek te verrichten dat vooraf in de opzet is opgenomen, zoals bepaling van het longgewicht van overlevende ratten en/of microscopisch onderzoek van de luchtwegen om aanwijzingen voor irritatie te vinden. Ook kunnen de organen worden onderzocht die tekenen van macroscopische pathologische veranderingen vertonen bij dieren die na 24 uur of langer nog leven, alsmede organen waarvan bekend is of verwacht wordt dat zij zijn aangetast. Microscopisch onderzoek van de volledige luchtwegen kan nuttige informatie opleveren voor teststoffen die met water reageren, zoals zuren en hygroscopische teststoffen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

34. Voor elk dier worden de gegevens over het lichaamsgewicht en de obductiebevindingen vermeld. Daarnaast worden de gegevens van de klinische observatie in tabelvorm samengevat met voor alle testgroepen vermelding van het gebruikte aantal dieren, het aantal dieren dat specifieke toxiciteitsverschijnselen vertoonde, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of om redenen van dierenwelzijn is gedood, het tijdstip waarop elk dier is gestorven, een beschrijving van de toxische effecten met het verloop en de omkeerbaarheid en de obductiebevindingen.

▼M4

Testverslag

35. In het testverslag wordt indien van toepassing de volgende informatie opgenomen:

Proefdieren en dierhouderij:

— beschrijving van de omstandigheden van de kooi, met inbegrip van: aantal (of verandering in het aantal) dieren per kooi, strooisel, omgevingstemperatuur en relatieve vochtigheid, lichtregime en identificatie van de voeding;

— gebruikte soort/stam en motivering voor het gebruik van een ander soort dan ratten;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— randomiseringsmethode;

— details van de voeder- en waterkwaliteit (waaronder aard en herkomst van het voeder en herkomst van het water);

— beschrijving van de eventuele conditionering voorafgaand aan de test, met inbegrip van voeding, quarantaine en behandeling voor ziekte.

Teststof:

— fysische aard, zuiverheid en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen (met inbegrip van de isomeersamenstelling);

— identificatiegegevens en, indien bekend, CAS-nummer (Chemical Abstracts Service).

Medium:

— motivatie voor het gebruik van het medium en voor de keuze ervan (indien een ander medium dan water wordt gebruikt);

— historische of parallelle gegevens waaruit blijkt dat het medium niet interfereert met de uitkomst van de studie.

Inhalatiekamer:

— beschrijving van de inhalatiekamer met inbegrip van afmetingen en volume;

— herkomst en beschrijving van de apparatuur die voor de blootstelling van dieren en het verkrijgen van de atmosfeer is gebruikt;

— apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid, de deeltjesgrootte en de feitelijke concentratie;

— herkomst van de lucht, behandeling van de aangevoerde/geëxtraheerde lucht en systeem dat voor de conditionering is gebruikt;

— toegepaste methoden voor de kalibratie van de apparatuur voor het verkrijgen van een homogene testatmosfeer;

— drukverschil (positief of negatief);

— blootstellingspoorten per kamer (blootstelling via de neus alleen); locatie van de dieren in het systeem (blootstelling van het hele lijf);

— homogeniteit/stabiliteit van de testatmosfeer in de tijd;

— locatie van temperatuur- en vochtigheidssensoren en bemonstering van de testatmosfeer in de kamer;

— luchtdebiet, luchtdebiet per blootstellingspoort (blootstelling via de neus alleen) of dierbelasting per kamer (blootstelling van het hele lijf);

— informatie over de apparatuur die voor de zuurstof- en kooldioxidemeting is gebruikt, indien van toepassing;

▼M4

— equilibratietijd van de kamer (t_{95});

— aantal volumeveranderingen per uur;

— meetapparaten (indien van toepassing).

Blootstellingsgegevens:

— motivering van de keuze van de doelconcentratie in de hoofdstudie;

— nominale concentraties (totale massa van de in de inhalatiekamer geleide teststof, gedeeld door het door de kamer geleide luchtvolume);

— feitelijke concentraties van de in het ademhalingsgebied van de dieren verzamelde teststof; voor testmengsels die heterogene fysische vormen produceren (gassen, dampen, aerosolen) kan elke vorm afzonderlijk worden geanalyseerd;

— alle luchtconcentraties worden in massa-eenheden vermeld (bv. mg/l, mg/m^3 enz.); de volume-eenheden (bv. ppm, ppb) kunnen tevens tussen haakjes worden vermeld;

— deeltjesgrootteverdeling, massamediaan van de aerodynamische diameter (MMAD) en geometrische standaardafwijking (σ_g), onder vermelding van de wijze waarop zij zijn berekend. De individuele deeltjesgrootteanalysen worden vermeld.

Testomstandigheden:

— details van de bereiding van de teststof, met inbegrip van details van de procedures die zijn gevolgd om de deeltjesgrootte van vaste stoffen te verlagen of oplossingen van de teststof te bereiden. Als de samenstelling van de teststof mogelijk is gewijzigd door mechanische processen, worden de resultaten opgenomen van de analysen die zijn verricht om de samenstelling van de teststof te controleren;

— een beschrijving (bij voorkeur met een schematische voorstelling) van de apparatuur die voor het verkrijgen van de testatmosfeer en de blootstelling van de dieren aan de testatmosfeer is gebruikt;

— details van de toegepaste chemische analysemethode en de validering van die methode (met inbegrip van de efficiëntie van de recovery van de teststof uit het bemonsteringsmedium);

— motivering van de keuze van de testconcentraties.

Resultaten:

— een tabel met de temperatuur, vochtigheid en luchtdoorstroming van de kamer;

— een tabel met de nominale en feitelijke concentratiegegevens van de kamer;

— een tabel met de deeltjesgroottegegevens met inbegrip van gegevens over de verzameling van het analytisch monster, de deeltjesgrootteverdeling en de berekening van de MMAD en σ_g;

— een tabel met gegevens over de respons en het concentratieniveau voor elk dier (bv. dieren met toxiciteitsverschijnselen, met inbegrip van sterfte, en de aard, hevigheid en duur van de effecten);

— voor elk dier het op de dagen van de studie bepaalde gewicht en de datum en het tijdstip waarop zij zijn gestorven, indien vóór de geplande euthanasie; voor elk dier het aanvangstijdstip van de toxiciteitsverschijnselen en of deze reversibel waren;

▼M4

— voor elk dier de obductiebevindingen en de histopathologische bevindingen, indien beschikbaar;

— de indeling in CLP-categorie en de LC_{50}-drempelwaarde.

Bespreking en interpretatie van de resultaten:

— speciale aandacht wordt besteed aan de beschrijving van de methoden die zijn toegepast om te voldoen aan de criteria van deze testmethode, bv. de limietconcentratie of de deeltjesgrootte;

— er wordt aandacht besteed aan de inhaleerbaarheid van deeltjes in het licht van de algemene bevindingen, in het bijzonder als niet aan de deeltjesgroottecriteria kan worden voldaan;

— in de algehele beoordeling van de studie wordt aandacht besteed aan de consistentie van de methoden die voor de bepalingen van de nominale en feitelijke concentratie zijn toegepast, alsmede aan het verband tussen de feitelijke en de nominale concentratie;

— er wordt aandacht besteed aan de waarschijnlijke doodsoorzaak en overheersende werking (systemisch of plaatselijk);

— er wordt een toelichting gegeven als dieren op humane wijze moesten worden gedood omdat zij pijn hadden of tekenen van hevige en voortdurende angst vertoonden, op basis van de criteria in de OESO-leidraad voor humane eindpunten (7).

LITERATUUR:

(1) Hoofdstuk B.2 van deze bijlage, Acute inhalatietoxiciteit.

(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) Hoofdstuk B.1 ter van deze bijlage, Acute orale toxiciteit: methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse.

(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. Beschikbaar op: 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. Beschikbaar op: 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. Beschikbaar op: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(9) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006 (PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1).

▼**M4**

(10) Hoofdstuk B.40 van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: test op basis van de transcutane elektrische weerstand (TEW).

(11) Hoofdstuk B.40 bis van deze bijlage, In-vitrohuidcorrosie: test met humaan huidmodel.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Beschikbaar op: 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. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html.

▼**M4**

Aanhangsel 1

DEFINITIE

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M4

Aanhangsel 2

Procedure voor elke aanvangsconcentratie voor gassen (ppm/4h)

Algemene opmerkingen ([1])

In de stroomschema's in dit aanhangsel wordt voor elke aanvangsconcentratie de te volgen procedure geschetst.

Aanhangsel 2a: aanvangsconcentratie 100 ppm

Aanhangsel 2b: aanvangsconcentratie 500 ppm

Aanhangsel 2c: aanvangsconcentratie 2 500 ppm

Aanhangsel 2d: aanvangsconcentratie 20 000 ppm

De pijlen geven, afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze gedode dieren, de te volgen procedure aan.

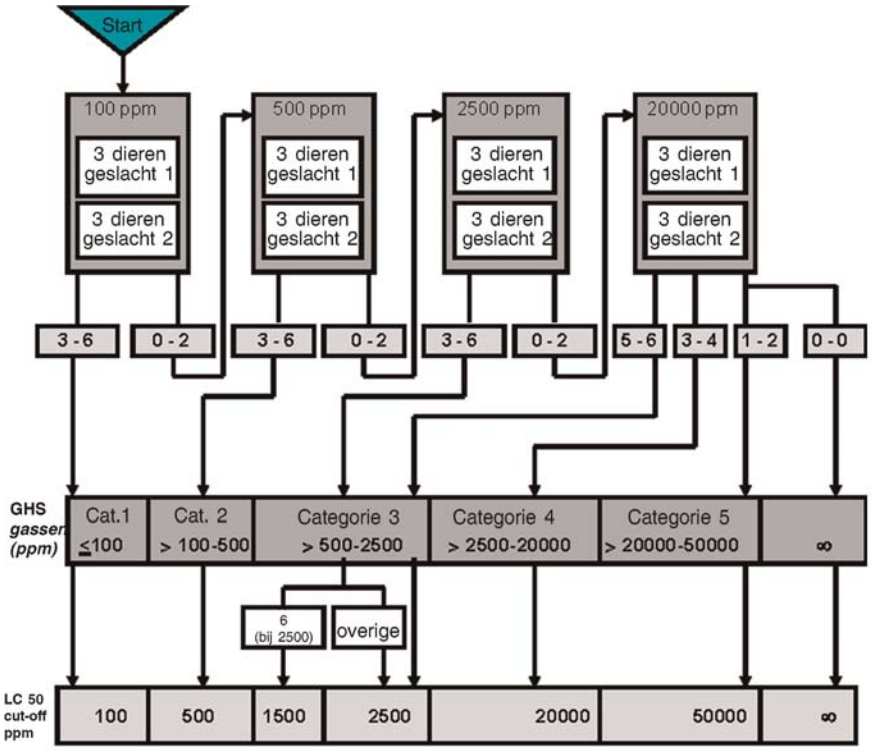
([1]) In de volgende tabellen wordt verwezen naar het GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen). Het EU-equivalent hiervan is Verordening (EG) nr. 1272/2008. Categorie 5 voor acute inhalatietoxiciteit wordt niet bij Verordening (EG) nr. 1272/2008 (9) ten uitvoer gelegd.

▼M4

Aanhangsel 2a

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 100 ppm/4h voor gassen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

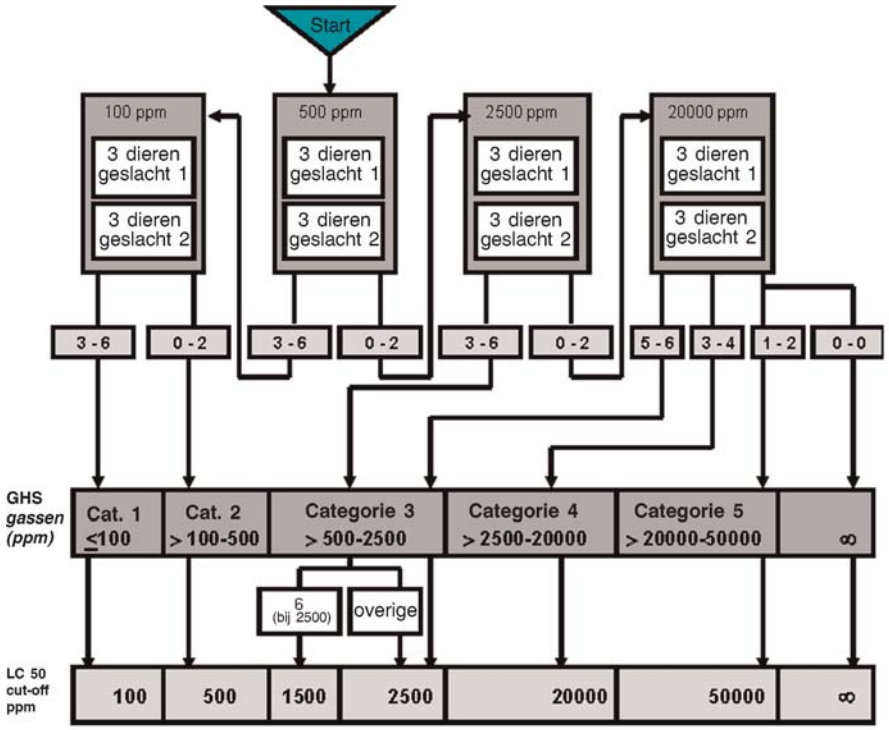
— tests bij ≥ 20000 20 000 ppm/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 2b

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 500 ppm/4h voor gassen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

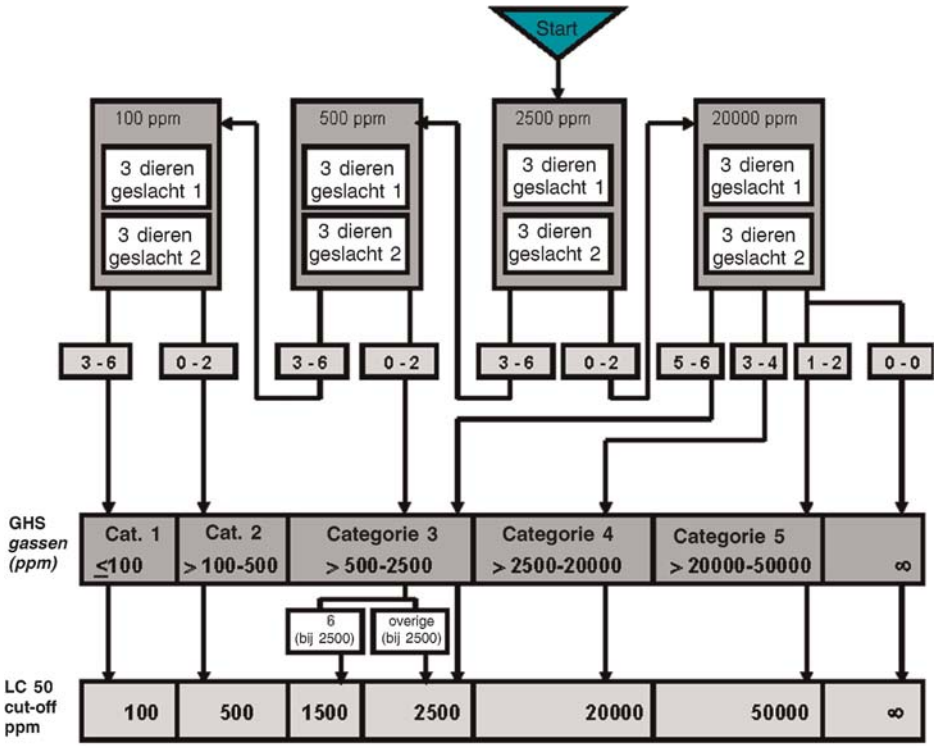
— tests bij ≥ 20000 20 000 ppm/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 2c

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 2 500 ppm/4h voor gassen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0–6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

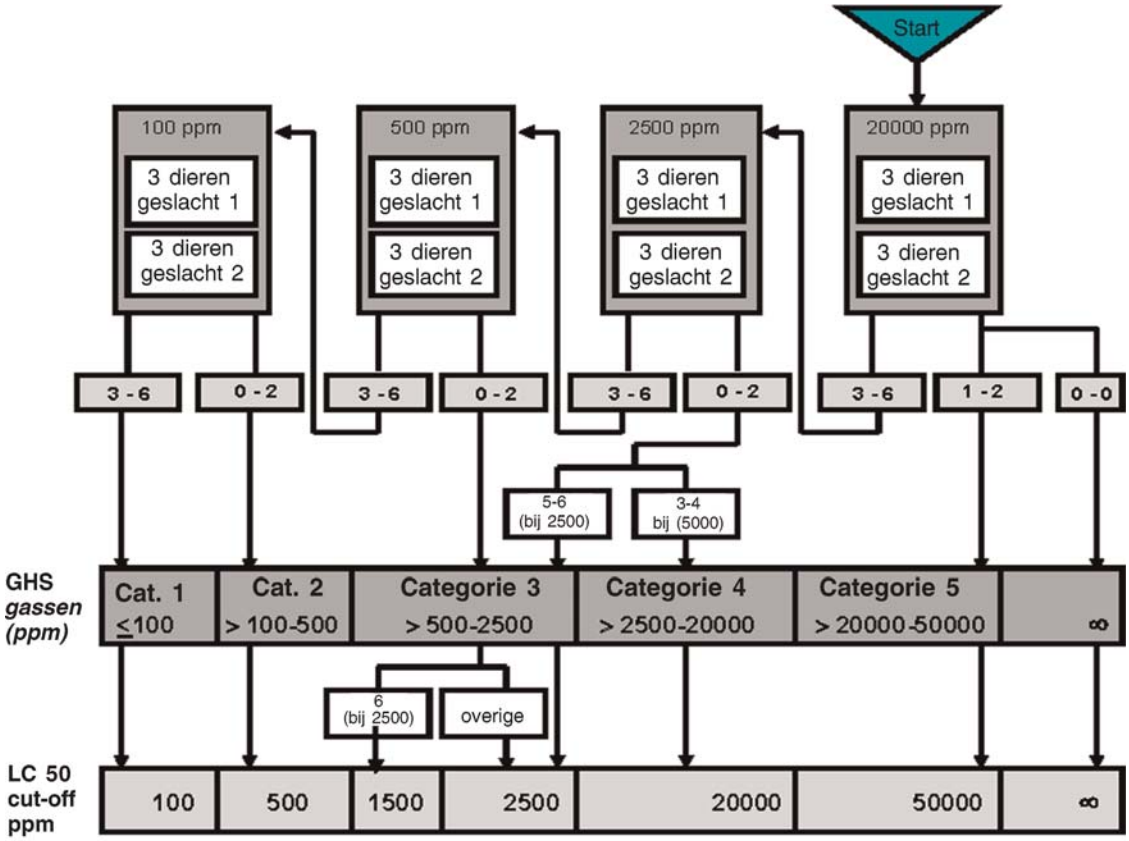
— tests bij ≥ 20 000 ppm/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 2d

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 20 000 ppm/4h voor gassen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

— tests bij ≥ 20000 ppm/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 3

Procedure voor elke aanvangsconcentratie voor dampen (mg/l/4h)

Algemene opmerkingen ([1])

In de stroomschema's in dit aanhangsel wordt voor elke aanvangsconcentratie de te volgen procedure geschetst.

Aanhangsel 3a: aanvangsconcentratie 0,5 mg/l

Aanhangsel 3b: aanvangsconcentratie 2,0 mg/l

Aanhangsel 3c: aanvangsconcentratie 10 mg/l

Aanhangsel 3d: aanvangsconcentratie 20 mg/l

De pijlen geven, afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze gedode dieren, de te volgen procedure aan.

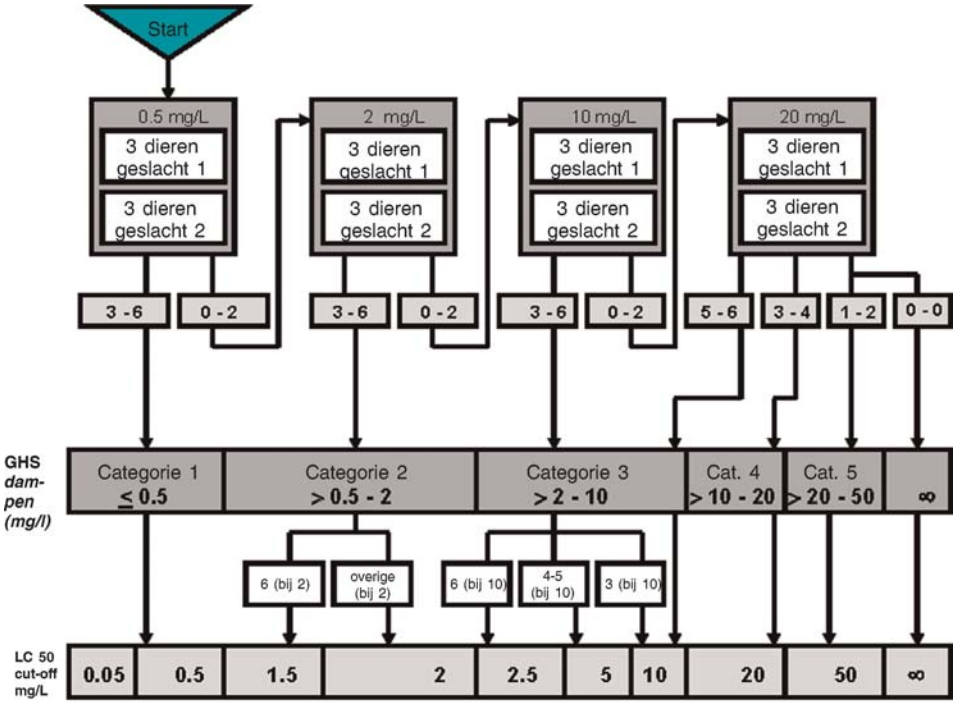
([1]) In de volgende tabellen wordt verwezen naar het GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen). Het EU-equivalent hiervan is Verordening (EG) nr. 1272/2008. Categorie 5 voor acute inhalatietoxiciteit wordt niet bij Verordening (EG) nr. 1272/2008 (9) ten uitvoer gelegd.

▼M4

Aanhangsel 3a

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 0,5 mg/l/4h voor dampen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

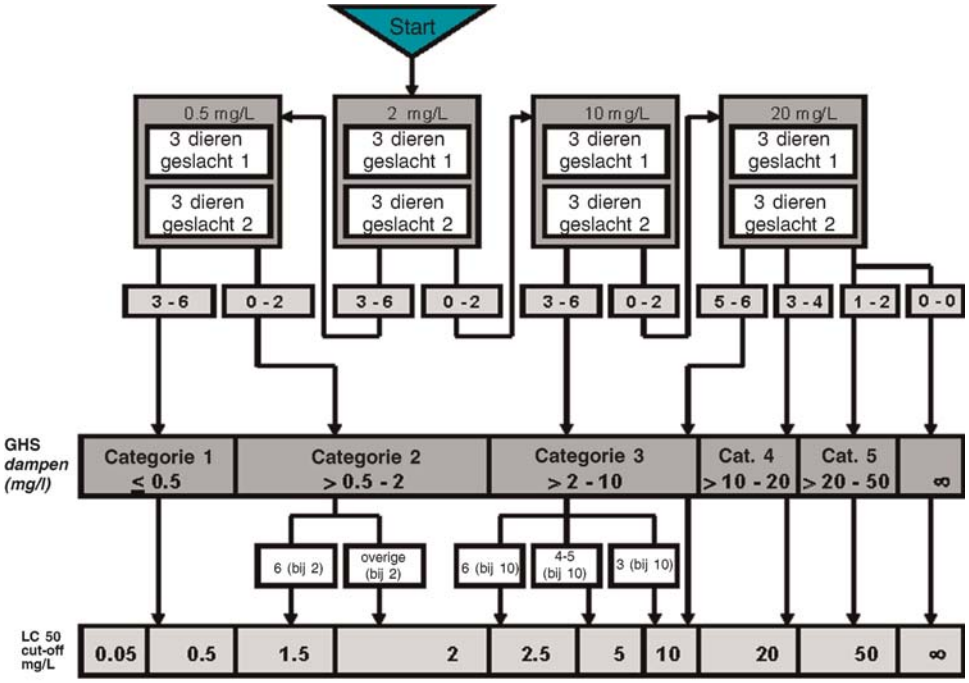
— tests bij 50 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 3b

Acute Inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 2 mg/l/4h voor dampen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0–6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

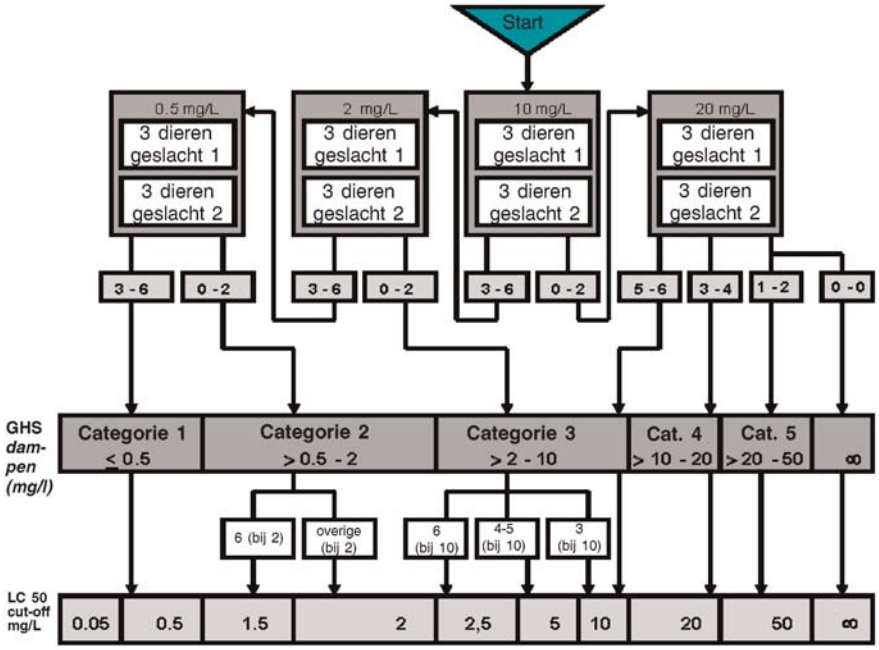
— tests bij 50 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 3c

Acute Inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 10 mg/l/4h voor dampen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0–6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

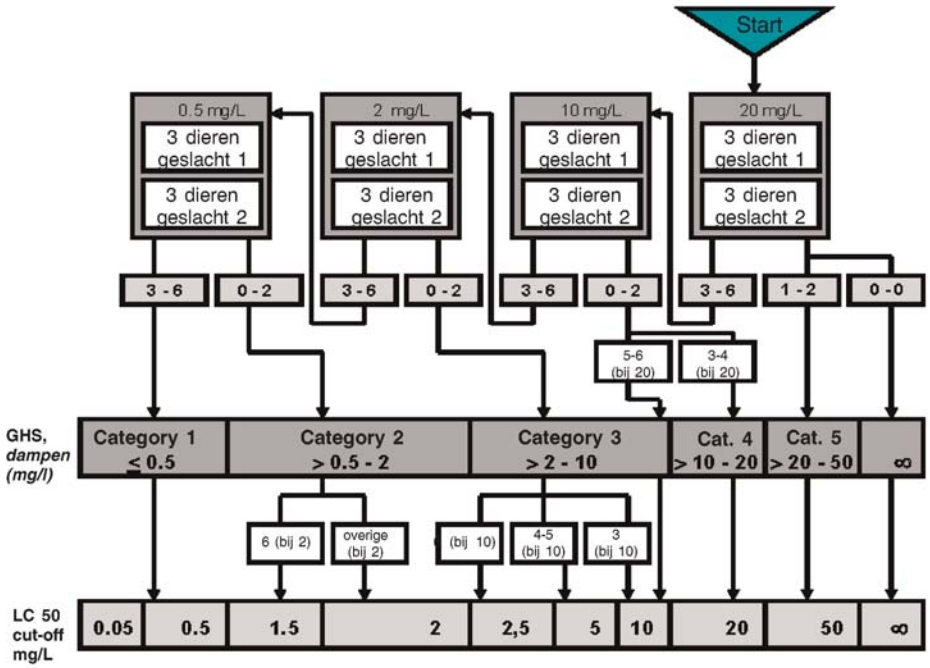
— tests bij 50 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 3d

Acute Inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 20 mg/l/4h voor dampen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt

— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: niet ingedeeld

— tests bij 50 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 4

Procedure voor elke aanvangsconcentratie voor aerosolen (mg/l/4h)

Algemene opmerkingen ([1])

In de stroomschema's in dit aanhangsel wordt voor elke aanvangsconcentratie de te volgen procedure geschetst.

Aanhangsel 4a: aanvangsconcentratie 0,05 mg/l

Aanhangsel 4b: aanvangsconcentratie 0,5 mg/l

Aanhangsel 4c: aanvangsconcentratie 1 mg/l

Aanhangsel 4d: aanvangsconcentratie 5 mg/l

De pijlen geven, afhankelijk van het aantal gestorven of op humane wijze gedode dieren, de te volgen procedure aan.

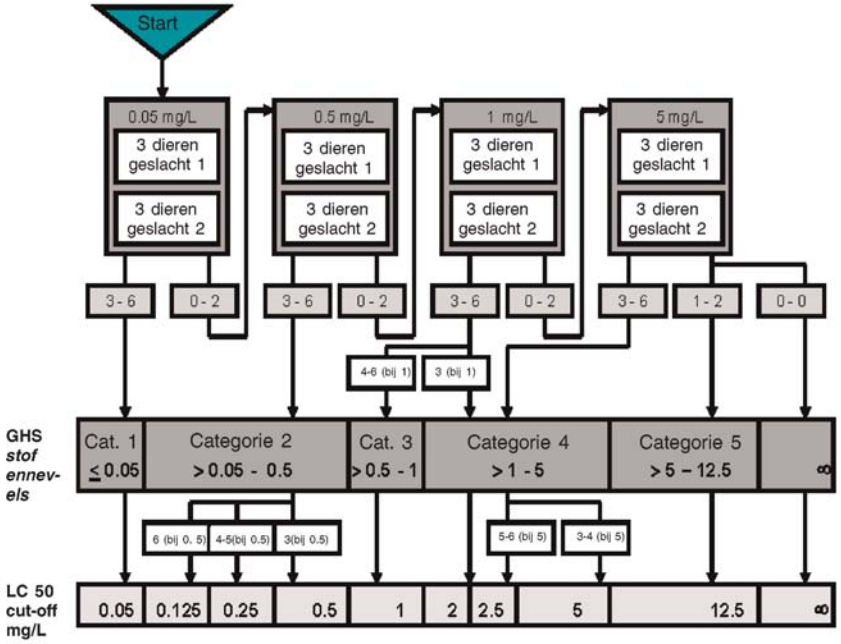
([1]) In de volgende tabellen wordt verwezen naar het GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen). Het EU-equivalent hiervan is Verordening (EG) nr. 1272/2008. Categorie 5 voor acute inhalatietoxiciteit wordt niet bij Verordening (EG) nr. 1272/2008 (9) ten uitvoer gelegd.

▼M4

Aanhangsel 4a

Acute Inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 0.05 mg/l/4h voor dampen



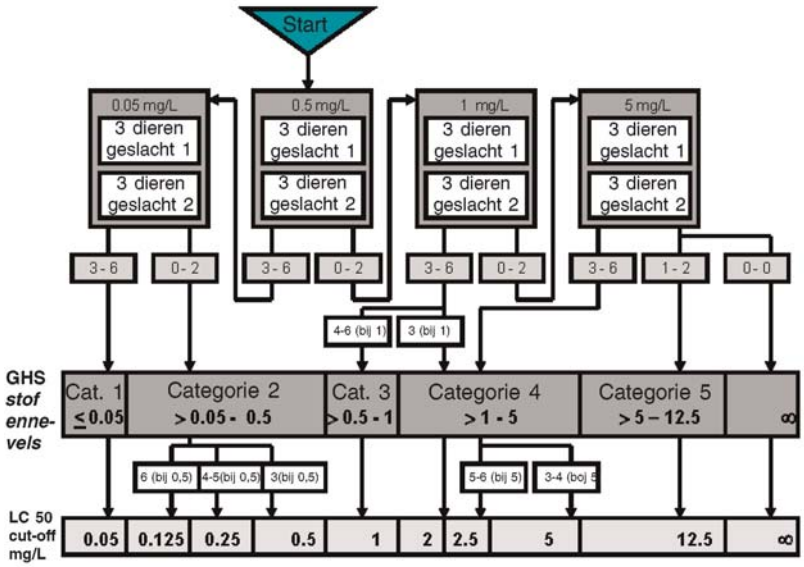
— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt
— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: niet ingedeeld
— tests bij 12,5 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 4b

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 0,5 mg/l/4h voor aerosolen



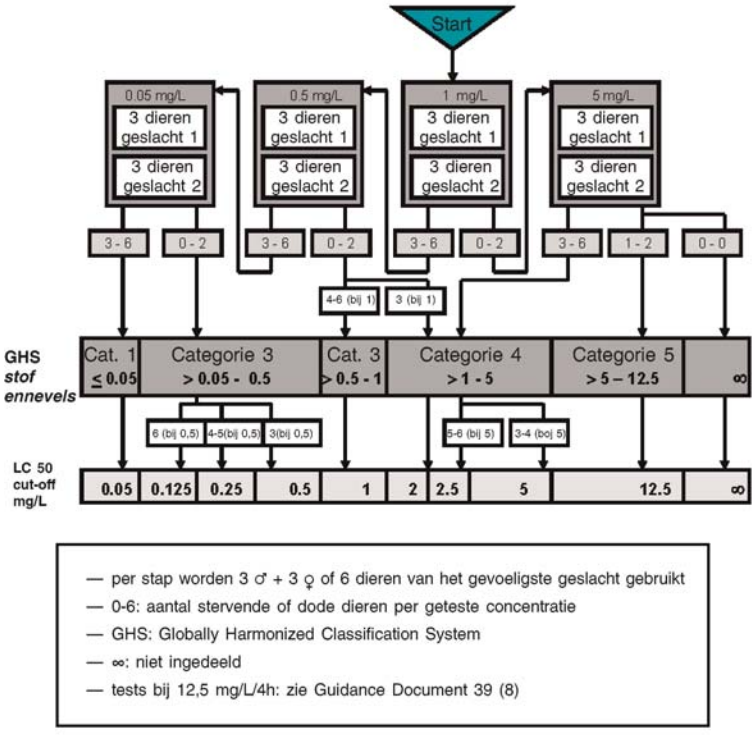
— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt
— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: niet ingedeeld
— tests bij 12,5 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 4c

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 1 mg/l/4h voor aerosolen



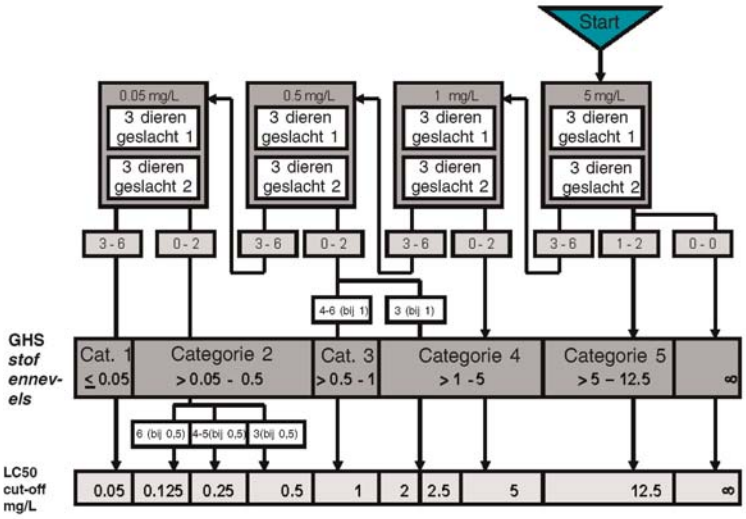
— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt
— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: niet ingedeeld
— tests bij 12,5 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)

▼M4

Aanhangsel 4d

Acute inhalatietoxiciteit:

Testprocedure bij een aanvangsconcentratie van 500 ppm/4h voor gassen



— per stap worden 3 ♂ + 3 ♀ of 6 dieren van het gevoeligste geslacht gebruikt
— 0-6: aantal stervende of dode dieren per geteste concentratie
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: niet ingedeeld
— tests bij 12,5 mg/L/4h: zie Guidance Document 39 (8)"

▼M5

B.53. ONDERZOEK NAAR ONTWIKKELINGSNEUROTOXICITEIT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 426 (2007) van de OESO. In juni 1995 boog een werkgroep inzake reproductie- en ontwikkelingstoxiciteit van de OESO in Kopenhagen zich over de noodzaak om de bestaande OESO-testrichtlijnen voor reproductie- en ontwikkelingstoxiciteit bij te werken en over de ontwikkeling van nieuwe richtsnoeren voor nog niet behandelde eindpunten (1). De werkgroep deed de aanbeveling een testrichtlijn voor ontwikkelingsneurotoxiciteit te schrijven uitgaande van een Amerikaanse EPA-richtlijn, die inmiddels is herzien (2). In juni 1996 werd in Kopenhagen een tweede raadplegingsbijeenkomst gehouden om het Secretariaat een leidraad te bieden voor de opzet van een nieuwe testrichtlijn voor ontwikkelingsneurotoxiciteit, met inbegrip van de hoofdelementen, bv. details over de keuze van de diersoort, toedieningsperiode, testperiode, te beoordelen eindpunten en criteria voor de evaluatie van de resultaten. In 1998 werd een Amerikaanse richtlijn over risicobeoordeling van neurotoxiciteit gepubliceerd (3). In oktober 2000 vonden back-to-back een OESO-raadplegingsbijeenkomst met deskundigen en een workshop van het Risk Science Institute van het ILSI plaats en in 2005 vond in Tokio een raadplegingsbijeenkomst met deskundigen plaats. Deze bijeenkomsten vonden plaats om de wetenschappelijke en technische problemen in verband met de huidige testrichtlijn te bespreken en de aanbevelingen van de bijeenkomsten (4)(5)(6)(7) werden bij de ontwikkeling van deze testmethode in aanmerking genomen. Aanvullende informatie over de uitvoering, interpretatie en de voor deze testmethode gebruikte terminologie is te vinden in de OESO-leidraden nr. 43: „Reproductive Toxicity Testing and Assessment” (8) en nr. 20: „Neurotoxicity Testing” (9).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

2. Van een aantal stoffen is bekend dat ze ontwikkelingsneurotoxische effecten bij de mens en andere soorten veroorzaken (10)(11)(12)(13). Voor het beoordelen en evalueren van de toxische kenmerken van een stof kan het nodig zijn om de potentiële ontwikkelingsneurotoxiciteit te bepalen. Onderzoeken naar ontwikkelingsneurotoxiciteit zijn bedoeld om gegevens, waaronder dosis-responskarakteriseringen, te verkrijgen over de potentiële functionele en morfologische effecten op het ontwikkelende zenuwstelsel van de nakomelingen die kunnen ontstaan door blootstelling in utero en in het begin van hun leven.

3. Een onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit kan als een apart onderzoek worden uitgevoerd, worden opgenomen in een onderzoek naar reproductietoxiciteit en/of neurotoxiciteit bij volwassenen (bv. testmethoden B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) of worden toegevoegd aan een onderzoek naar prenatale-ontwikkelingstoxiciteit (bv. testmethode B.31 (17)). Wanneer het onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit wordt opgenomen in of toegevoegd aan een ander onderzoek, is het absoluut noodzakelijk dat de integriteit van beide onderzoekstypen behouden blijft. Alle testen moeten voldoen aan de toepasselijke wetgeving of richtlijnen van de overheid of de instelling voor het gebruik van proefdieren in onderzoek (bv. 18).

4. Het testlaboratorium moet vóór uitvoering van het onderzoek alle beschikbare informatie over de teststof bestuderen. Deze informatie betreft de identiteit en structuur van de stof; de fysisch-chemische eigenschappen ervan; de resultaten van eventuele andere in-vitro- of in-vivotoxiciteitstesten met de stof; toxicologische gegevens over qua structuur verwante stoffen, en het/de verwachte vorm(en) van gebruik van de stof. Deze informatie is noodzakelijk om alle betrokkenen ervan te verzekeren dat de test relevant is voor de bescherming van de gezondheid van de mens en helpt bij het kiezen van een geschikte aanvangsdosis.

▼M5

PRINCIPE VAN DE TEST

5. De teststof wordt aan dieren toegediend tijdens de dracht en de zoogperiode. Om de effecten bij drachtige en zogende vrouwtjes te beoordelen, worden moederdieren getest. Dit kan ook vergelijkende informatie geven (moederdieren versus nakomelingen). Voor beoordeling van de neurotoxiciteit worden willekeurig nakomelingen uit nesten gekozen. De beoordeling bestaat uit observaties om macroscopische neurologische en gedragsafwijkingen te detecteren, waaronder de beoordeling van de lichamelijke ontwikkeling, ontogenie van het gedrag, motorische activiteit, motorische en sensorische functie, en het leervermogen en geheugen; alsmede de beoordeling van het hersengewicht en de neuropathologie tijdens de postnatale ontwikkeling en volwassenheid.

6. Als de testmethode wordt uitgevoerd als een apart onderzoek, kunnen aanvullende beschikbare dieren in elke groep worden gebruikt voor specifieke neurogedrags-, neuropathologische, neurochemische of elektrofysiologische procedures die ter ondersteuning kunnen dienen van de gegevens die zijn verkregen van de door deze testmethode aanbevolen onderzoeken (16)(19)(20)(21). De aanvullende procedures kunnen vooral nuttig zijn als empirische waarnemingen, verwachte effecten of het werkingsmechanisme duiden op een bepaald type neurotoxiciteit. Deze aanvullende procedures kunnen zowel bij de moederdieren als bij de jongen worden gebruikt. Daarnaast kunnen ook ex-vivo- of in-vivoprocedures worden gebruikt, mits deze procedures niet de integriteit van de in-vivoprocedures doen veranderen.

VOORBEREIDINGEN VOOR DE TEST

Keuze van de diersoort

7. De testsoort die de voorkeur verdient is de rat; andere soorten kunnen in voorkomende gevallen worden gebruikt. Merk echter op dat de in deze testmethode vermelde dracht- en postnatale dagen specifiek zijn voor vaak gebruikte rattenstammen en dat er vergelijkbare dagen moeten worden gekozen als een andere soort of ongebruikelijke stam wordt gebruikt. Het gebruik van een andere soort moet worden gemotiveerd aan de hand van toxicologische, farmacokinetische en/of andere gegevens. In de motivering moet de beschikbaarheid van soortspecifieke postnatale neurogedrags- en neuropathologische beoordelingen aan de orde komen. Als een eerdere test aanleiding gaf tot bezorgdheid, moet de in die test gebruikte soort/stam worden overwogen. Omdat verschillende rattenstammen verschillende prestatiekenmerken vertonen, moeten er aanwijzingen zijn dat de vruchtbaarheid en het responsvermogen van de gekozen stam toereikend zijn. De betrouwbaarheid en gevoeligheid van andere soorten voor de detectie van ontwikkelingsneurotoxiciteit moeten worden gedocumenteerd.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

8. De temperatuur in de proefdierruimte moet 22 °C (± 3 °C) zijn. Hoewel de relatieve luchtvochtigheid ten minste 30 % moet bedragen en, behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte, bij voorkeur niet hoger mag zijn dan 70 %, moet worden gestreefd naar 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Het is ook mogelijk de lichtcyclus vóór het paren en gedurende de duur van het onderzoek om te draaien, zodat de beoordelingen van functie- en gedragseindpunten tijdens de donkere periode (onder rood licht) kunnen worden uitgevoerd, d.w.z. als de dieren normaliter actief zijn (22). Veranderingen van de licht-donkercyclus dienen vergezeld te gaan van een passende acclimatiseringstijd om de dieren aan de nieuwe cyclus te laten wennen. Als voeding mag het gewone proefdiervoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. Het soort voeding en het soort water moeten worden gerapporteerd en beide moeten worden geanalyseerd op onzuiverheden.

▼M5

9. De dieren kunnen elk apart of in kleine groepen van hetzelfde geslacht worden ondergebracht. Het paren moet plaatsvinden in kooien die voor dat doel geschikt zijn. Na gebleken copulatie of niet later dan dag 15 van de dracht, moeten gedekte dieren afzonderlijk in kooien worden ondergebracht, die zijn bestemd voor werpen of moederschap. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Als het moment van werpen nadert, moeten de gedekte vrouwtjes worden voorzien van geschikt en gedefinieerd nestmateriaal. Het is algemeen bekend dat onjuiste behandeling of stress tijdens de dracht kan leiden tot ongunstige uitkomsten, zoals prenatale sterfte en afwijkende foetale en postnatale ontwikkeling. Om verlies van de foetus als gevolg van factoren die geen verband houden met de behandeling, te voorkomen, moeten de dieren tijdens de dracht voorzichtig worden behandeld en moet stress als gevolg van externe factoren, zoals overmatig geluid van buitenaf, worden vermeden.

Voorbereiding van de dieren

10. Er moeten gezonde dieren worden gebruikt die aan de omstandigheden in het laboratorium hebben kunnen wennen en waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd, tenzij het onderzoek is opgenomen in een ander onderzoek (zie punt 3). De kenmerken van de proefdieren qua soort, stam, herkomst, geslacht, gewicht en leeftijd worden vastgelegd. Aan elk dier moet een uniek identificatienummer worden toegekend, waarmee het gemarkeerd wordt. De dieren van alle testgroepen moeten zoveel mogelijk van gelijk gewicht en gelijke leeftijd zijn, en moeten tot de normale variëteiten van de onderzochte soort en stam behoren. Bij elk dosisniveau moeten jongvolwassen vrouwtjes worden gebruikt die nog geen jongen hebben gehad. Dekking door mannetjes met dezelfde ouders moet worden vermeden en daar moet op worden toegezien. Drachtdag (gestation day, GD) 0 is de dag waarop een vaginale prop en/of sperma worden waargenomen. Als bij een leverancier dieren zijn aangeschaft die op een bekend tijdstip zijn gedekt, moet een passende acclimatiseringstijd (bv. 2-3 dagen) in acht worden genomen. Gedekte vrouwtjes moeten op neutrale wijze worden toegewezen aan de controle- en behandelgroepen en zo gelijk mogelijk worden verdeeld over de groepen (er wordt bijvoorbeeld een gestratificeerde gerandomiseerde procedure aanbevolen voor een gelijke verdeling over alle groepen, zoals wat betreft lichaamsgewicht). Vrouwtjes die door hetzelfde mannetje zijn geïnsemineerd, moeten gelijkelijk over de groepen worden verdeeld.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

11. Elke test- en controlegroep moet een voldoende aantal drachtige vrouwtjes bevatten die worden blootgesteld aan de teststof om ervoor te zorgen dat het aantal nakomelingen dat wordt geproduceerd toereikend is voor beoordeling van de neurotoxiciteit. Bij elk dosisniveau wordt aanbevolen in totaal 20 nesten te gebruiken. Doseringsopzetten waarbij gebruik wordt gemaakt van duplo's en opeenvolgende groepen zijn toegestaan als het totaal aantal nesten per groep wordt bereikt en passende statistische modellen worden gebruikt om rekening te houden met duplo's.

12. Op of vóór postnatale dag (PND) 4 (dag van werpen is PND 0), moet de grootte van elk nest worden aangepast door eliminatie van extra jongen door willekeurige selectie tot alle nesten een gelijke nestgrootte hebben (23). De nestgrootte mag niet groter zijn dan de gemiddelde nestgrootte voor de gebruikte knaagdierstam (8-12). Het nest moet zoveel mogelijk bestaan uit gelijke aantallen mannelijke en vrouwelijke jongen. Er dient geen selectieve eliminatie van jongen, bv. op grond van lichaamsgewicht, plaats te vinden. Na standaardisatie van de nesten (ruimen) en voorafgaand aan verder testen van functie-eindpunten, krijgen individuele jongen waarmee testen vóór of na spening uitgevoerd gaan worden, een unieke identificatie met behulp van een geschikte humane methode voor identificatie van jongen (bv. 24).

▼M5

Toewijzen van dieren aan functie- en gedragstesten, bepaling hersengewicht en neuropathologische beoordelingen

13. Met deze testmethode kunnen dieren die in utero en via het zogen zijn blootgesteld, op verscheidene manieren worden toegekend aan functie- en gedragstesten, bepaling van geslachtsrijping en hersengewicht en neuropathologische beoordeling (25). Andere testen van de neurogedragsfunctie (bv. sociaal gedrag), neurochemie of neuropathologie kunnen per geval worden toegevoegd, mits de integriteit van de oorspronkelijke vereiste testen niet in het gedrang komt.

14. De jongen worden gekozen uit elke dosisgroep en toegewezen aan eindpuntsbeoordelingen op of na PND 4. De selectie van de jongen moet zodanig gebeuren, dat in alle testen beide geslachten uit elk nest in elke dosisgroep zo veel mogelijk gelijk vertegenwoordigd zijn. Voor het testen van de motorische activiteit moet op alle leeftijden vóór spening hetzelfde paar van mannelijke en vrouwelijke jongen worden getest (zie punt 35). Voor alle andere testen kunnen hetzelfde paar of verschillende paren van mannelijke en vrouwelijke dieren worden toegewezen aan verschillende gedragstesten. Er moeten mogelijk verschillende jongen worden toegewezen aan testen van de cognitieve functie met gespeende dieren versus die met volwassen dieren om verstoring door de effecten van leeftijd en eerdere training in deze bepalingen te voorkomen (26)(27). Op het moment van spenen (PND 21) kunnen jongen die niet zijn geselecteerd voor onderzoek, op humane wijze worden afgevoerd. Eventuele veranderingen in toewijzing van jongen moeten worden gerapporteerd. De statistische meeteenheid moet het nest (of het moederdier) zijn en niet het jong.

15. De toewijzing van jongen aan de onderzoeken vóór en na spening, cognitieve testen, pathologische onderzoeken enz. kan op verschillende wijzen plaatsvinden (zie figuur 1 voor algemene opzet en aanhangsel 1 voor voorbeelden van toewijzingen). In elke dosisgroep voor onderzoeken vóór en na spening worden de volgende minimumaantallen van dieren aanbevolen:

Klinische observaties en lichaamsgewicht	Alle dieren
Gedetailleerde klinische observaties	20/geslacht (1/geslacht/nest)
Hersengewicht (na fixatie) PND 11-22	10/geslacht (1/nest)
Hersengewicht (niet gefixeerd) ~ PND 70	10/geslacht (1/nest)
Neuropathologie (immersie- of perfusiefixatie) PND 11-22	10/geslacht (1/nest)
Neuropathologie (perfusiefixatie) PND ~70	10/geslacht (1/nest)
Geslachtsrijping	20/geslacht (1/geslacht/nest)
Andere ontwikkelingsmijlpalen (facultatief)	Alle dieren
Ontogenie van het gedrag	20/geslacht (1/geslacht/nest)
Motorische activiteit	20/geslacht (1/geslacht/nest)
Motorische en sensorische functie	20/geslacht (1/geslacht/nest)
Leervermogen en geheugen	10/geslacht ([a]) (1/nest)

([a]) Afhankelijk van de gevoeligheid van de testen waarmee de cognitieve functie wordt gemeten, moet worden overwogen een groter aantal dieren te onderzoeken, bv. tot 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest (zie aanhangsel 1 voor het toewijzen van dieren) (nadere richtsnoeren over de steekproefgrootte staan in OESO-leidraad nr. 43 (8)).

▼M5

Dosering

16. Er worden ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controlegroep gebruikt. De dosisniveaus moeten zodanig zijn verdeeld, dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. Tenzij de fysisch-chemische aard of biologische eigenschappen van de stof dit beperken, moet het hoogste dosisniveau zodanig worden gekozen dat enige maternale toxiciteit optreedt (bv. klinische symptomen, verminderde gewichtstoename (niet meer dan 10 %) en/of aanwijzingen voor dosisbeperkende toxiciteit in een doelorgaan). De hoge dosis kan worden beperkt tot 1 000 mg/kg/dag lichaamsgewicht, met enkele uitzonderingen. Zo kan de verwachte blootstelling voor mensen erop wijzen dat een hoger dosisniveau moet worden gebruikt. Een andere mogelijkheid is verkennende onderzoeken of voorlopige bereikbepalingsonderzoeken uit te voeren om de hoogste te gebruiken dosering te bepalen waarbij een minimale mate van maternale toxiciteit optreedt. Als gebleken is dat de teststof toxisch is voor de ontwikkeling, hetzij in een standaard-ontwikkelingstoxiciteitsonderzoek, hetzij in een verkennend onderzoek, moet het hoogste dosisniveau de maximale dosis zijn die geen overmatige toxiciteit bij nakomelingen, of in utero dan wel neonatale sterfte of misvormingen induceert die voldoende is/zijn om een beletsel te vormen voor een betekenisvolle beoordeling van neurotoxiciteit. Het laagste dosisniveau moet erop gericht zijn geen aanwijzingen voor maternale of ontwikkelingstoxiciteit, waaronder neurotoxiciteit, te produceren. Er moet een dalende reeks dosisniveaus worden gekozen teneinde een eventuele doseringsgerelateerde respons en het laagste dosisniveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (no-observed-adverse-effect level, NOAEL) aan te tonen, of doses nabij de detectiegrens waarmee een benchmarkdosis kan worden bepaald. Intervallen van een factor twee tot vier zijn vaak optimaal voor het vaststellen van de dalende dosisniveaus en het is vaak beter een vierde dosisgroep toe te voegen dan zeer grote intervallen (bv. meer dan een factor tien) tussen de doseringen te gebruiken.

17. De dosisniveaus moeten worden gekozen in het licht van alle bestaande toxiciteitsgegevens en aanvullende informatie over het metabolisme en de toxicokinetiek van de teststof of verwante stoffen. Aan de hand van deze informatie kan ook worden aangetoond of het doseringsschema adequaat is. Op grond van blootstellings- en farmacokinetische gegevens moet directe toediening aan jongen worden overwogen (28)(29). De voor- en nadelen moeten zorgvuldig worden overwogen alvorens onderzoeken met directe toediening uit te voeren (30).

18. De gelijktijdige controlegroep wordt met placebo of, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, met medium behandeld. Alle dieren krijgen normaliter dezelfde hoeveelheid teststof of medium toegediend, op basis van lichaamsgewicht. Bij gebruik van een medium of een ander additief om toediening te vergemakkelijken, moet met de volgende factoren rekening worden gehouden: effecten op de absorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken daarvan kunnen veranderen, en effecten op de voedsel- of waterconsumptie of de voedingsstatus van de dieren. Het medium mag geen effecten teweegbrengen die de interpretatie van het onderzoek kunnen verstoren, noch mag het neurogedragstoxisch zijn of gevolgen hebben voor de voortplanting of ontwikkeling. Voor nieuwe media moet naast een mediumcontrolegroep een placebocontrolegroep worden opgenomen. De dieren in de controlegroep(en) moeten op identieke wijze worden behandeld als de testgroepdieren.

▼M5

Toediening van de doses

19. De teststof of het medium moet worden toegediend via de weg die het meest relevant is voor mogelijke menselijke blootstelling en gebaseerd zijn op de beschikbare informatie betreffende metabolisme en distributie bij de proefdieren. De toedieningsweg zal doorgaans oraal (bv. via maagsonde, voeding, drinkwater) zijn, maar andere wegen (bv. dermaal, inhalatie) kunnen ook worden gebruikt, naargelang van de kenmerken en verwachte of bekende blootstellingsroutes bij de mens (verdere richtsnoeren staan in leidraad nr. 43 (8)). De keuze voor een bepaalde toedieningsweg moet worden gemotiveerd. De teststof moet elke dag op ongeveer hetzelfde tijdstip worden toegediend.

20. De aan elk dier toegediende dosis moet normaliter gebaseerd zijn op het meest recente individuele lichaamsgewicht van het dier. Voorzichtigheid is echter geboden bij het aanpassen van de doses tijdens het laatste derde deel van de dracht. Als bij de behandelde moederdieren sprake is van overmatige toxiciteit, moeten die dieren op humane wijze worden gedood.

21. De teststof of het medium moet minimaal dagelijks worden toegediend aan gedekte vrouwtjes vanaf het moment van nidatie (GD 6) tot en met de zoogperiode (PND 21), zodat de jongen tijdens de pre- en postnatale neurologische ontwikkeling aan de teststof worden blootgesteld. De leeftijd waarop de toediening start, en de duur en frequentie van de toediening kunnen worden aangepast als er aanwijzingen zijn die een testopzet die relevanter is voor blootstellingen bij de mens, ondersteunen. De toedieningsduur moet voor andere soorten zodanig worden aangepast, dat de blootstelling plaatsvindt tijdens alle vroege perioden van de hersenontwikkeling (d.w.z. gelijkwaardig aan prenatale en vroeg-postnatale hersengroei bij de mens). De toediening kan beginnen vanaf de start van de dracht (GD 0), hoewel er rekening moet worden gehouden met mogelijk verlies van dieren vóór nidatie als gevolg van de teststof. Toediening vanaf GD 6 voorkomt dit risico, maar in dat geval worden de ontwikkelingsfasen tussen GD 0 en 6 niet behandeld. Als een laboratorium gebruikmaakt van aangeschafte dieren die op een bepaald tijdstip zijn gedekt, is het niet mogelijk om op GD 0 te starten met toedienen. GD 6 is dan een goede startdag. Het testlaboratorium moet het doseringsschema opstellen aan de hand van relevante informatie over de effecten van de teststof, eerdere ervaring en logistieke overwegingen. Dit kan verlenging van toediening na spening inhouden. Er mag niet worden toegediend op de dag waarop wordt geworpen bij de dieren die nog niet helemaal klaar zijn met werpen. In het algemeen wordt aangenomen dat blootstelling van de jongen plaatsvindt via de moedermelk. In gevallen waarin er onvoldoende aanwijzingen zijn voor voortdurende blootstelling van de nakomelingen, moet evenwel directe toediening aan jongen worden overwogen. Aanwijzingen voor voortdurende blootstelling kunnen bv. worden verkregen uit de farmacokinetiek, toxiciteit bij de nakomelingen of veranderingen in biomarkers (28).

OBSERVATIES

Observaties bij moederdieren

22. Alle moederdieren moeten ten minste eenmaal daags zorgvuldig geobserveerd worden met betrekking tot de gezondheidstoestand, waaronder ziekelijkheid en sterfte.

23. Tijdens de behandelings- en observatieperioden moeten periodiek gedetailleerdere klinische observaties worden verricht (ten minste twee maal tijdens de drachttoedieningsperiode en twee maal tijdens de zoogtoedieningsperiode) met ten minste tien moederdieren per dosisniveau. De dieren moeten buiten hun kooi worden geobserveerd door getrainde technici die niet weten welke behandeling een gegeven dier heeft ondergaan, met behulp van gestandaardiseerde procedures om te zorgen voor minimale stress bij de dieren en waarnemersvertekening, en maximale interobserver-betrouwbaarheid. Indien mogelijk is het raadzaam de observaties in een bepaald onderzoek door dezelfde technicus te laten verrichten.

▼M5

24. De aanwezigheid van waargenomen verschijnselen moet worden geregistreerd. Indien mogelijk moet de ernst van de waargenomen verschijnselen eveneens geregistreerd worden. Klinische observaties moeten onder meer (maar niet alleen) bestaan uit: veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van uitscheiding, en onwillekeurige reacties (zoals traanvorming, rechtop staan van het haar, pupilgrootte, een ongewoon ademhalingspatroon en/of mondademhaling en eventuele ongewone symptomen van urineren of defecatie).

25. Alle ongewone responsen met betrekking tot lichaamspositie, activiteit (bv. meer of minder intensieve verkenning van het standaardgebied) en coördinatie van bewegingen moeten ook worden genoteerd. Veranderingen in gang (bv. waggelen, ataxie), houding (bv. gebogen rug) en reactiviteit op vastpakken, neerzetten of andere prikkels uit de omgeving, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, convulsies, trillingen, stereotiep gedrag (bv. overmatige lichaamsverzorging, ongewone kopbewegingen, herhaaldelijk ronddraaien), bizar gedrag (bv. bijten of overmatig likken, zelfverminking, achteruitlopen, geluiden maken) of agressie moeten worden opgetekend.

26. Symptomen van toxiciteit moeten worden opgetekend, met de dag waarop deze ontstonden, tijdstip, mate van ernst en duur.

27. De dieren moeten op het moment van toediening worden gewogen, en wel ten minste elke week gedurende het onderzoek, op of vlak na de dag van werpen en op PND 21 (spenen). Voor met een maagsonde uitgevoerde onderzoeken moeten de moederdieren ten minste tweemaal per week worden gewogen. Na elke bepaling van het lichaamsgewicht moeten de doses zo nodig worden aangepast. De voedselconsumptie moet tijdens de dracht en zoogperiode minimaal wekelijks worden bepaald. Indien de blootstelling via de watertoevoer verloopt, moet ten minste wekelijks de waterconsumptie worden bepaald.

Observaties bij nakomelingen

28. Alle nakomelingen moeten ten minste dagelijks zorgvuldig geobserveerd worden op symptomen van toxiciteit en ziekelijkheid en sterfte.

29. Tijdens de behandelings- en observatieperioden moeten gedetailleerdere klinische observaties van de nakomelingen worden verricht. De nakomelingen (ten minste één jong/geslacht/nest) moeten worden geobserveerd door getrainde technici die niet weten welke behandeling een gegeven dier heeft ondergaan met behulp van gestandaardiseerde procedures om te zorgen voor minimale vertekening en maximale interobserver-betrouwbaarheid. Indien mogelijk is het raadzaam de observaties door dezelfde technicus te laten verrichten. Minimaal moeten de in punten 24 en 25 beschreven eindpunten worden gecontroleerd, al naargelang van toepassing voor de ontwikkelingsfase die geobserveerd wordt.

30. Alle symptomen van toxiciteit bij de nakomelingen moeten worden opgetekend, met de dag waarop deze ontstonden, tijdstip, mate van ernst en duur.

Lichamelijke en ontwikkelingsmijlpalen

31. Veranderingen in ontwikkelingsmijlpalen vóór spening (zoals ontvouwen van de oorschelp, openen van de ogen, doorkomen van snijtanden) hangen nauw samen met het lichaamsgewicht (30)(31). Lichaamsgewicht is mogelijk de beste indicator van lichamelijke ontwikkeling. De bepaling van ontwikkelingsmijlpalen wordt daarom alleen aanbevolen als er al aanwijzingen zijn dat deze eindpunten aanvullende informatie zullen verschaffen. De tijdstippen voor de beoordeling van deze parameters staan vermeld in tabel 1. Afhankelijk van de verwachte effecten en de resultaten van de eerste metingen kan het raadzaam zijn extra tijdstippen toe te voegen of de metingen in andere ontwikkelingsfasen te verrichten.

▼M5

32. Het is raadzaam om bij de beoordeling van de lichamelijke ontwikkeling de postcoïtale leeftijd in plaats van de postnatale leeftijd te gebruiken (33). Als jongen worden getest op de dag van spening, wordt geadviseerd dit onderzoek te doen vóór de feitelijke spening om de stress van het spenen, die een verstorend effect zou kunnen geven, te vermijden. Bovendien mogen met de jongen geen testen na spening worden gedaan gedurende de twee dagen na het spenen.

Tabel 1

Tijdstippen van de beoordeling van lichamelijke en ontwikkelingsmijlpalen, en functie/gedragseindpunten ([a])

Levensperiode / Eindpunten	Vóór spenen ([b])	Adolescentie ([b])	Jongvolwassen dieren ([b])
Lichamelijke en ontwikkelingsmijlpalen			
Lichaamsgewicht en klinische observaties	wekelijks ([c])	ten minste om de twee weken	ten minste om de twee weken
Hersengewicht	PND 22 ([d])		aan einde onderzoek
Neuropathologie	PND 22 ([d])		aan einde onderzoek
Geslachtsrijping	—	wanneer van toepassing	—
Andere ontwikkelingsmijlpalen ([e])	wanneer van toepassing	—	—
Functie/gedragseindpunten			
Ontogenie van het gedrag	Ten minste twee metingen		
Motorische activiteit (waaronder gewenning)	1-3 keer ([f])	—	eenmaal
Motorische en sensorische functie	—	eenmaal	eenmaal
Leervermogen en geheugen	—	eenmaal	eenmaal

([a]) In deze tabel staat het minimale aantal keren dat een meting moet worden uitgevoerd. Afhankelijk van de verwachte effecten en de resultaten van de eerste metingen kan het raadzaam zijn extra tijdstippen (bv. oudere dieren) toe te voegen of de metingen in andere ontwikkelingsfasen te verrichten.

([b]) Het wordt aanbevolen geen jongen te testen tijdens de twee dagen na het spenen (zie punt 32). Aanbevolen leeftijden voor adolescentietesten zijn: Leervermogen en geheugen = PND 25 ± 2; motorische en sensorische functie = PND 25 ± 2. Aanbevolen leeftijden voor het testen van jongvolwassen dieren is PND 60-70.

([c]) Lichaamsgewichten moeten ten minste tweemaal per week worden bepaald bij directe toediening aan jongen in verband met aanpassing van de doses als er sprake is van snelle gewichtstoename.

([d]) Hersengewichten en neuropathologie kunnen zo nodig op een eerder tijdstip worden bepaald (bv. PND 11) (zie punt 39).

([e]) Andere ontwikkelingsmijlpalen naast het lichaamsgewicht (bv. openen van de ogen) moeten geregistreerd worden wanneer deze bereikt worden (zie punt 31).

([f]) Zie punt 35.

33. Levende jongen moeten worden geteld en gesekst, bv. door visuele inspectie of meting van de anogenitale afstand (34)(35) en elk jong in een nest moet afzonderlijk worden gewogen bij de geboorte of kort daarna, ten minste wekelijks tijdens de zoogperiode en ten minste eenmaal per twee weken daarna. Bij de beoordeling van de geslachtsrijping moeten, wanneer opening van de vagina (36) of loslaten van de voorhuid (37) optreedt, de leeftijd en het lichaamsgewicht van het dier worden bepaald voor ten minste één mannetje en één vrouwtje per nest.

▼M5

Ontogenie van het gedrag

34. De ontogenie van bepaald gedrag moet worden gemeten bij ten minste één jong/geslacht/nest tijdens de passende levensperiode, waarbij op alle testdagen voor al het gedrag dat wordt beoordeeld, dezelfde jongen worden gebruikt. De meetdagen moeten gelijkelijk over die periode worden verdeeld om te bepalen of de verandering in ontogenie van dat gedrag normaal of behandelingsgerelateerd is (38). Voorbeelden van gedrag waarvan de ontogenie kan worden beoordeeld zijn: oprichtreflex, negatieve geotaxis en motorische activiteit (38)(39)(40).

Motorische activiteit

35. De motorische activiteit moet worden gecontroleerd (41)(42)(43)(44)(45) tijdens de levensperiode vóór spening en de volwassen levensperiode. Zie punt 32 voor testen op het moment van spenen. De testsessie moet lang genoeg zijn om gewenning binnen een sessie voor niet-behandelde controles aan te tonen. Het wordt sterk aanbevolen ter beoordeling van de ontogenie van het gedrag de motorische activiteit te bepalen. Indien gebruikt als test voor ontogenie van het gedrag, moet het testen voor alle testsessies vóór spening met dezelfde dieren plaatsvinden. Er moet vaak genoeg worden getest om de ontogenie van gewenning binnen een sessie te kunnen beoordelen (44). Hiervoor kunnen drie of meer tijdsperioden tot en met de dag van spening nodig zijn (bv. PND 13, 17, 21). Het testen van dezelfde dieren of nestgenoten moet ook plaatsvinden op volwassen leeftijd, tegen het einde van het onderzoek (bv. PND 60-70). Zo nodig kan op extra dagen getest worden. De motorische activiteit moet worden gecontroleerd met een geautomatiseerd activiteitsregistratieapparaat dat zowel toenamen als afnamen in activiteit moet kunnen detecteren (d.w.z. de door het apparaat gemeten activiteit op baseline moet niet zo laag zijn dat afnamen niet kunnen worden gedetecteerd en ook niet zo hoog dat toenamen van de activiteit niet kunnen worden gedetecteerd). Elk apparaat moet volgens standaardprocedures worden getest om de betrouwbaarheid van de werking van alle apparaten op alle dagen zo veel mogelijk te waarborgen. De behandelgroepen moeten zo evenwichtig mogelijk over de apparaten worden verdeeld. Elk dier moet apart worden getest. De behandelgroepen moeten evenwichtig worden verspreid over de testtijden om verstoring door circadiaanse activiteitritmen te vermijden. Er moet zoveel mogelijk worden gezorgd dat variaties in de testomstandigheden minimaal zijn en niet systematisch samenhangen met de behandeling. Variabelen die van invloed kunnen zijn op veel maten van gedrag, waaronder motorische activiteit, zijn geluidsniveau, grootte en vorm van de testkooi, temperatuur, relatieve vochtigheid, lichtomstandigheden, geuren, gebruik van verblijfskooi of nieuwe testkooi en afleiding uit de omgeving.

Motorische en sensorische functie

36. De motorische en sensorische functie moet ten minste eenmaal in de adolescentieperiode en ten minste eenmaal in de jongvolwassenperiode (bv. PND 60-70) uitvoerig worden onderzocht. Zie punt 32 voor testen op het moment van spenen. Er moet voldoende worden getest om te zorgen voor een toereikende kwantitatieve sampling van de sensorische modaliteiten (bv. somatosensorisch, vestibulair) en motorische functies (bv. kracht, coördinatie). Enkele voorbeelden van testen voor de motorische en sensorische functie zijn voetzoolreflex (46), oprichtreflex (47)(48), gewenning aan auditieve schrikreactie (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) en opgewekte potentialen (55).

▼M5

Leervermogen- en geheugentesten

37. Na het spenen (bv. 25 ± twee dagen) en bij jongvolwassen dieren (PND 60 en ouder) moet een test van het associatieve leervermogen en geheugen worden uitgevoerd. Zie punt 32 voor testen op het moment van spenen. Voor deze twee ontwikkelingsfasen kunnen dezelfde test of aparte test(en) worden gebruikt. Enige flexibiliteit in de keuze van de test(en) voor leervermogen en geheugen bij gespeende en volwassen ratten is toegestaan. De test(en) moet(en) echter zodanig zijn opgezet dat wordt voldaan aan twee criteria. Ten eerste moet het leervermogen worden beoordeeld als een verandering over verschillende herhaalde leervermogenonderzoeken of -sessies, of, bij testen met één onderzoek, door te kijken naar een toestand die controleert op niet-associatieve effecten van de trainingservaring. Ten tweede moet(en) de test(en) naast het oorspronkelijke leervermogen (acquisitie) een maat voor het geheugen (kortetermijn- of langetermijngeheugen) omvatten, maar deze maat voor het geheugen kan niet gerapporteerd worden indien een met dezelfde test verkregen maat voor acquisitie ontbreekt. Als uit de test(en) voor het leervermogen en geheugen een effect van de teststof naar voren komt, kunnen aanvullende testen worden overwogen om alternatieve interpretaties op grond van veranderingen in sensorische, motivatie- en/of motorische capaciteiten uit te sluiten. Naast de twee bovenstaande criteria wordt geadviseerd de test voor het leervermogen en geheugen te kiezen op grond van de aangetoonde gevoeligheid ervan voor de klasse van stoffen waartoe de teststof behoort, als dergelijke informatie in de literatuur beschikbaar is. Als dergelijke informatie ontbreekt, kunnen de volgende testen worden gedaan om te voldoen aan de bovenstaande criteria: passieve vermijding (43)(56)(57), „delayed-matching-to-position" voor de volwassen rat (58) en voor de infantiele rat (59), olfactorische conditionering (43)(60), waterlabyrint van Morris (Morris water maze) (61)(62)(63), labyrint van Biel of Cincinnati (64)(65), stervormig labyrint (radial arm maze) (66), T-labyrint (43) en acquisitie en retentie van gedrag volgens een bepaald schema (schedule-controlled behaviour) (26)(67)(68). Aanvullende testen worden in de literatuur beschreven voor gespeende (26)(27) en volwassen ratten (19)(20).

Postmortaal onderzoek

38. De moederdieren kunnen worden geëuthanaseerd nadat de nakomelingen zijn gespeend.

39. Neuropathologische beoordeling van de nakomelingen wordt uitgevoerd met weefsels van dieren die om humane redenen zijn gedood op PND 22 of eerder, tussen PND 11 en PND 22, en aan het einde van het onderzoek. Van nakomelingen die op PND 22 of eerder worden gedood, moet het hersenweefsel worden beoordeeld; van dieren die aan het einde worden gedood, moet weefsel van het centrale zenuwstelsel (CZS) en het perifere zenuwstelsel (PZS) worden beoordeeld. Dieren die worden gedood op PND 22 of eerder, kunnen worden gefixeerd door immersie of perfusie. Dieren die aan het einde van het onderzoek worden gedood, moeten door perfusie worden gefixeerd. Bij alle aspecten van de preparatie van de weefselmonsters, d.w.z. vanaf de persfusie van de dieren tot en met de dissectie van de weefselmonsters, weefselbewerking en kleuren van de glaasjes, moet evenwichtig te werk worden gegaan, zodat elke partij representatieve monsters van elke dosisgroep bevat. Nadere richtsnoeren over neuropathologie zijn te vinden in OESO-leidraad nr. 20 (9), zie ook (103).

Bewerking van weefselmonsters

40. Alle macroscopische afwijkingen die bij de obductie worden opgemerkt, moeten worden genoteerd. De weefselmonsters moeten afkomstig zijn van alle belangrijke gebieden van het zenuwstelsel. De weefselmonsters moeten worden bewaard in een geschikt fixatiemiddel en bewerkt volgens gestandaardiseerde gepubliceerde histologische protocollen (69)(70)(71)(103). Inbedding in paraffine is acceptabel voor weefsels van het CZS en PZS, maar wanneer een hogere mate van resolutie vereist is (bv. voor perifere zenuwen

▼M5

bij vermoeden van een perifere neuropathie en/of voor morfometrische analyse van perifere zenuwen), kan het aangewezen zijn om bij postfixatie osmium te gebruiken samen met inbedden in epoxy. Voor morfometrische analyse verzameld hersenweefsel moet bij alle dosisniveaus op hetzelfde moment in geschikte media worden ingebed om artefacten als gevolg van krimp die kan optreden bij langdurig bewaren in fixatiemiddel, te voorkomen (6).

Neuropathologisch onderzoek

41. Het kwalitatieve onderzoek heeft tot doel:

i) identificeren van gebieden binnen het zenuwstelsel waarbij sprake is van aanwijzingen voor neuropathologische veranderingen;

ii) identificeren van typen neuropathologische veranderingen die het gevolg zijn van blootstelling aan de teststof, en

iii) bepalen van de mate van ernst van de neuropathologische veranderingen.

Representatieve histologische coupes van de weefselmonsters moeten door een goed opgeleide patholoog microscopisch worden onderzocht op aanwijzingen voor neuropathologische veranderingen. Aan alle neuropathologische veranderingen moet een subjectieve graad van ernst worden toegekend. Een hematoxyline- en eosinekleuring kan voldoende zijn voor de beoordeling van hersencoupes van dieren die op PND 22 of eerder'om humane redenen zijn gedood. Voor coupes van CZS- en PZS-weefsels van dieren die zijn gedood aan het einde van het onderzoek wordt echter een myelinekleuring (bv. luxol fast blue/cresylviolet) en een zilverkleuring (bv. Bielschowsky- of Bodiankleuring) aanbevolen. Afhankelijk van het professionele oordeel van de patholoog en de soort veranderingen dat wordt waargenomen, kunnen andere kleuringen worden beschouwd als geschikt voor de identificatie en karakterisering van bepaalde typen veranderingen (bv. glia fibrillair zuur eiwit (glial fibrillary acidic protein, GFAP) of lectinehistochemie om veranderingen in het glia en microglia te beoordelen (72), fluoro-jade om necrose te detecteren (73)(74), of voor neurodegeneratie specifieke zilverkleuringen (75)).

42. Aangezien deze gegevens kunnen worden gebruikt bij de detectie van een behandelingsgerelateerd effect en waardevol zijn bij de interpretatie van behandelingsgerelateerde verschillen in hersengewicht of morfologie, moet morfometrische (kwantitatieve) beoordeling plaatsvinden (76)(77). Voor de morfometrische beoordeling moeten zenuwweefselmonsters worden genomen en geprepareerd. Morfometrische beoordelingen kunnen bijvoorbeeld bestaan uit lineaire of oppervlaktemetingen van specifieke hersengebieden (78). Bij lineaire of oppervlaktemetingen moeten homologe coupes worden gebruikt die zorgvuldig zijn geselecteerd op grond van betrouwbare microscopische mijlpalen (6). Stereologie kan worden gebruikt om behandelingsgerelateerde effecten op parameters, zoals volume of aantal cellen voor specifieke neuroanatomische gebieden, te identificeren (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. De hersenen moeten worden onderzocht op aanwijzingen voor behandelingsgerelateerde neuropathologische veranderingen en voor grondig onderzoek moeten geschikte monsters worden genomen van alle belangrijke hersengebieden (bv. bulbus olfactorius, hersenschors, hippocampus, basale ganglia, thalamus, hypothalamus, middenhersenen (tectum, tegmentum en hersensteel), pons, verlengde merg, kleine hersenen). Het is van belang dat voor alle dieren de coupes in hetzelfde vlak worden genomen. Bij volwassen dieren die op humane wijze worden gedood aan het einde van het onderzoek, moeten representatieve coupes van het ruggenmerg en het PZS worden verzameld. De te onderzoeken gebieden zijn onder meer het oog met de oogzenuw en het netvlies, het ruggenmerg bij de cervicale en lumbale zwellingen, de dorsale en ventrale wortelvezels, de proximale ischiaszenuw, de proximale scheenbeenzenuw (bij de knie) en de vertakkingen van de scheenbeenzenuw naar de kuitspier. De coupes van het ruggenmerg en de perifere zenuwen moeten uit zowel dwars- als lengtecoupes bestaan.

▼M5

44. Neuropathologische beoordeling moet een onderzoek omvatten naar aanwijzingen voor ontwikkelingsschade aan het zenuwstelsel (6)(85)(86)(87)(88)(89), naast de cellulaire veranderingen (bv. neuronale vacuolisatie, degeneratie, necrose) en weefselveranderingen (bv. gliose, infiltratie van leukocyten, vorming van cysten). In dit opzicht is het van belang onderscheid te maken tussen behandelingsgerelateerde effecten en normale ontwikkelingen waarvan bekend is dat deze plaatsvinden tijdens de ontwikkelingsfase van het dier op het moment van doden (90). Belangrijke veranderingen die een indicatie zijn van een aanval op de ontwikkeling zijn bijvoorbeeld (maar zijn niet daartoe beperkt):

— veranderingen in de macroscopische omvang of vorm van de bulbus olfactorius, de grote hersenen of de kleine hersenen,

— veranderingen in de relatieve omvang van verscheidene hersengebieden, waaronder afnamen of toenamen van de omvang van deze gebieden als gevolg van het verlies of persistentie van normaal tijdelijke populaties van cellen of axonale projecties (bv. uitwendige kiemlaag van de kleine hersenen, hersenbalk),

— veranderingen in proliferatie, migratie en differentiatie, zoals blijkt uit gebieden met overmatige apoptose of necrose, clusters of verspreide populaties van ectopische, gedesoriënteerde of misvormde neuronen of veranderingen in de relatieve omvang van verscheidene lagen van de corticale structuren,

— veranderingen in myelinisatiepatronen, zoals een algemene afname van de omvang of gewijzigde kleuring van gemyeliniseerde structuren,

— aanwijzingen voor hydrocefalus, met name vergroting van de ventrikels, stenose van het aquaduct van Sylvius en het dunner worden van de hersenhelften.

Analyse van de dosis-responsverhouding van neuropathologische veranderingen

45. De volgende stapsgewijze procedure wordt aanbevolen voor de kwalitatieve en kwantitatieve neuropathologische analyses. Eerst worden coupes van de hogedosisgroep vergeleken met die van de controlegroep. Als er geen aanwijzingen worden gevonden voor neuropathologische veranderingen bij dieren van de hogedosisgroep, is verdere analyse niet nodig. Als er wel aanwijzingen worden gevonden voor neuropathologische veranderingen in de hogedosisgroep, worden dieren van de middelhoge- en lagedosisgroepen onderzocht. Als onderzoek met de hogedosisgroep wordt stopgezet vanwege sterfgevallen of andere storende toxiciteit, moeten de hoge- en middelhogedosisgroepen geanalyseerd worden op neuropathologische veranderingen. Als er aanwijzingen zijn voor neurotoxiciteit in de lagedosisgroepen, moet in die groepen neuropathologische analyse worden verricht. Als er onderzoeksgerelateerde neuropathologische veranderingen worden gevonden in het kwalitatieve of kwantitatieve onderzoek, moet op grond van een beoordeling van alle dieren uit alle dosigroepen de dosisafhankelijkheid van de incidentie, frequentie en graad van ernst van de letsels of van de morfometrische veranderingen worden bepaald. Alle gebieden van de hersenen met aanwijzingen voor neuropathologische veranderingen moeten in deze beoordeling worden meegenomen. Voor elk type letsel moeten de kenmerken worden beschreven die zijn gebruikt om elke graad van ernst te definiëren, waarbij wordt aangegeven op basis waarvan elke mate van ernst zich onderscheidt. De frequentie van elk type letsel en de graad van ernst ervan moeten worden geregistreerd en een statistische analyse moet worden uitgevoerd ter beoordeling van de dosis-responsverhoudingen. Het wordt aanbevolen gecodeerde glaasjes te gebruiken (91).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

46. Gegevens moeten afzonderlijk worden gerapporteerd en in tabelvorm worden samengevat, met voor elke testgroep de typen veranderingen en het aantal moederdieren, nakomelingen per geslacht en nesten waarbij ieder type verandering voorkomt. Bij directe postnatale blootstelling van de nakomelingen moet de weg, duur en periode van blootstelling gerapporteerd worden.

▼M5

Beoordeling en interpretatie van resultaten

47. Een onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit geeft informatie over de effecten van herhaalde blootstelling aan een stof tijdens de in-utero- en vroeg-postnatale ontwikkeling. Aangezien de nadruk wordt gelegd op zowel het eindpunt algemene toxiciteit als het eindpunt ontwikkelingsneurotoxiciteit, kan met de resultaten van het onderzoek onderscheid worden gemaakt tussen neuro-ontwikkelingseffecten die zich voordoen bij afwezigheid van algemene maternale toxiciteit, en neuro-ontwikkelingseffecten die alleen tot uitdrukking komen bij niveaus die ook toxisch zijn voor het moederdier. Vanwege de complexe onderlinge verbanden tussen onderzoeksopzet, statistische analyse en biologische significantie van de gegevens is voor een adequate interpretatie van ontwikkelingsneurotoxiciteitsgegevens het oordeel van een deskundige nodig (107)(109). Bij de interpretatie van de testresultaten moet gebruik worden gemaakt van een op bewijskracht gebaseerde aanpak (20)(92)(93)(94). Patronen van gedrags- of morfologische bevindingen, indien aanwezig, en aanwijzingen voor dosisrespons moeten worden besproken. Bij deze karakterisering moeten gegevens van alle onderzoeken die relevant zijn voor de beoordeling van ontwikkelingsneurotoxiciteit, worden meegenomen, waaronder epidemiologische onderzoeken of casereports met mensen en onderzoeken met proefdieren (bv. toxicokinetische gegevens, structuur-activiteitinformatie, gegevens uit andere toxiciteitsonderzoeken). Daartoe behoort ook het verband tussen de doses van de teststof en de aan- of afwezigheid, incidentie en de mate van eventuele neurotoxische effecten voor elk geslacht (20)(95).

48. Bij de beoordeling van de gegevens moet zowel de biologische als de statistische significantie worden besproken. Statistische analyse moet worden gezien als een instrument dat een leidraad geeft voor de interpretatie van gegevens, zonder dat het bepalend daarvoor is. De conclusie dat er geen sprake is van een behandelingsgerelateerd effect, mag niet louter gebaseerd zijn op het ontbreken van statistische significantie. Evenzo geldt dat de conclusie dat er wel sprake is van een behandelingsgerelateerd effect, niet louter op statistische significantie gebaseerd mag zijn. Om mogelijke vals-negatieve bevindingen en de moeilijkheden die inherent zijn aan „aantonen van een negatieve" te voorkomen, moeten beschikbare positieve en historische controlegegevens worden besproken, met name als er geen behandelingsgerelateerde effecten zijn (102)(106). De kans op vals-positieven moet worden besproken in het licht van de totale statistische beoordeling van de gegevens (96). De beoordeling moet het eventuele verband tussen waargenomen neuropathologische en gedragsveranderingen omvatten.

49. Alle resultaten worden geanalyseerd worden met behulp van voor de testopzet toepasselijke statistische modellen. De keuze voor een parametrische of een niet-parametrische analyse moet worden gemotiveerd aan de hand van factoren zoals de aard van de gegevens (al dan niet getransformeerd) en de verspreiding ervan, alsook de relatieve robuustheid van de gekozen statistische analyse. Het doel en de opzet van het onderzoek moeten als leidraad dienen voor de keuze van statistische analyses om type I (vals-positieve) en type II (vals-negatieve) fouten tot het minimum te beperken (96)(97)(104)(105). Bij ontwikkelingsonderzoeken met multipara's in het geval dat meerdere jongen per nest worden getest, moet het nest in het statistische model worden opgenomen om opgeschroefde type I-foutenpercentages te voorkomen (98)(99)(100)(101). De statistische meeteenheid moet het nest zijn en niet het jong. De experimenten moeten zodanig zijn opgezet, dat nestgenoten niet als onafhankelijke observaties worden behandeld. Eindpunten die herhaaldelijk worden gemeten bij hetzelfde proefdier, moeten geanalyseerd worden met statistische modellen die rekening houden met deze niet-onafhankelijke werkwijze.

Testverslag

50. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard en, indien relevant, fysisch-chemische kenmerken,

— identificatiegegevens, waaronder de herkomst,

▼M5

— zuiverheid van het preparaat en bekende en/of verwachte onzuiverheden.

Medium (indien van toepassing):

— motivering van de keuze van het medium, indien geen water of fysiologische zoutoplossing wordt gebruikt.

Proefdieren:

— gebruikte soort en stam, en een motivering voor het gebruik van een andere soort dan ratten,

— leverancier van de proefdieren,

— aantal, leeftijd bij aanvang en geslacht van de dieren,

— herkomst, huisvesting, voeding, water enz.,

— gewicht van elk dier bij aanvang van de test.

Testomstandigheden:

— motivering van de keuze van de dosisniveaus,

— motivering van de toedieningsweg en tijdsduur,

— specificaties van de toegediende doses, waaronder details van het medium, de hoeveelheid en de fysische vorm van de toegediende stof,

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof, de bereiding van het voer en de bereikte concentratie, stabiliteit en homogeniteit van het preparaat,

— gebruikte methode voor de unieke identificatie van moederdieren en nakomelingen,

— gedetailleerde beschrijving van de gerandomiseerde procedures(s) voor het toewijzen van de moederdieren aan behandelgroepen, het ruimen van jongen en het toewijzen van jongen aan testgroepen,

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof,

— omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater of van de inhalatieteststof (in ppm) naar de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing,

— milieuomstandigheden,

— gedetailleerde gegevens over de kwaliteit van het voer en water (bv. kraanwater, gedestilleerd water),

— data van aanvang en einde onderzoek.

Observaties en testprocedures:

— een gedetailleerde beschrijving van de gebruikte procedures voor de standaardisatie van observaties en procedures en operationele definities voor het scoren van observaties,

— een lijst van alle gebruikte testprocedures en een motivering van het gebruik ervan,

— gedetailleerde gegevens over de gebruikte gedrags/functie-, pathologische, neurochemische of elektrofysiologische procedures, waaronder informatie en details over geautomatiseerde apparatuur,

— procedures om apparatuur te ijken en om de gelijkwaardigheid van apparatuur te waarborgen en om evenwichtige behandelgroepen te krijgen bij het testen,

— een korte motivering waarin beslissingen genomen op basis van professioneel oordeel uiteengezet worden.

▼M5

Resultaten (afzonderlijke en beknopte, waaronder gemiddelde en variantie indien van toepassing):

— het aantal dieren bij aanvang van het onderzoek en het aantal aan het einde van het onderzoek,

— het aantal dieren en nesten dat voor elke testmethode werd gebruikt,

— het identificatienummer van elk dier en het nest waaruit het afkomstig was,

— nestgrootte en gemiddeld geboortegewicht naar geslacht,

— gegevens over lichaamsgewicht en verandering in lichaamsgewicht, waaronder eindlichaamsgewicht voor moederdieren en nakomelingen,

— gegevens over voer- en waterconsumptie, indien van toepassing (bv. als de teststof via water wordt toegediend),

— gegevens over toxische responsen naar geslacht en dosisniveau, met inbegrip van toxiciteitsverschijnselen of sterftecijfers, waaronder het tijdstip en de oorzaak van overlijden, indien van toepassing,

— aard, ernst, duur, dag van ontstaan, tijdstip en verdere verloop van de gedetailleerde klinische observaties,

— score van elke ontwikkelingsmijlpaal (gewicht, geslachtsrijping en ontogenie van het gedrag) bij elke observatietijd,

— een gedetailleerde beschrijving van alle gedrags-, functie-, neuropathologische, neurochemische, elektrofysiologische bevindingen naar geslacht, waaronder zowel toenamen als afnamen ten opzichte van de controles,

— obductiebevindingen,

— hersengewichten,

— diagnoses gesteld op basis van neurologische verschijnselen en letsels, waaronder natuurlijk voorkomende ziekten of aandoeningen,

— beelden van voorbeeldige bevindingen,

— lageresolutiebeelden ter beoordeling van de homologie van coupes die zijn gebruikt voor morfometrie,

— absorptie- en metabolismegegevens, waaronder complementaire gegevens van een afzonderlijk toxicokinetisch onderzoek, indien beschikbaar,

— statistische behandeling van resultaten, waaronder statistische modellen die zijn gebruikt voor analyse van de gegevens, en de resultaten, ongeacht de significantie ervan,

— lijst van onderzoeksmedewerkers, inclusief beroepsopleiding.

Bespreking van de resultaten:

— informatie over dosisresponsen, naar geslacht en groep,

— verband van eventuele andere toxische effecten met een conclusie over het neurotoxische potentieel van de teststof, naar geslacht en groep,

— invloed van eventuele toxicokinetische informatie op de conclusies,

— overeenkomsten van effecten met bekende neurotoxische stoffen,

▼M5

— gegevens die de betrouwbaarheid en gevoeligheid van de testmethode ondersteunen (d.w.z. positieve en historische controlegegevens),

— eventuele verbanden tussen neuropathologische en functie-effecten,

— NOAEL- of benchmarkdosis voor moederdieren en nakomelingen, naar geslacht en groep.

Conclusies

— een discussie over de algehele interpretatie van de gegevens op grond van de resultaten, waaronder een conclusie over het feit of de teststof ontwikkelingsneurotoxiciteit veroorzaakte en de NOAEL.

LITERATUUR

1. OESO (1995). Draft Report of the OECD Ad HocWorking Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Kopenhagen, Denemarken, 13-14 juni 1995.

2. US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit. US EPA 712-C-98-239. Te vinden op: [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. Te vinden op: [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. OESO (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000
.

8. OESO (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, OESO, Parijs, juli 2008. Te vinden op: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage = en].

9. OESO (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OESO, Parijs, september 2003. Te vinden op: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

10. Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

11. Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

12. Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

13. Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14. Hoofdstuk B.34 van deze bijlage, Reproductietoxiciteitsonderzoek over één generatie.

15. Hoofdstuk B.35 van deze bijlage, Reproductietoxiciteitsonderzoek over twee generaties.

16. Hoofdstuk B.43 van deze bijlage, Neurotoxiciteitsonderzoek bij knaagdieren.

17. Hoofdstuk B.31 van deze bijlage, Onderzoek naar prenatale ontwikkelingstoxiciteit.

18. Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33).

19. WHO (1986) Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Te vinden op: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

20. WHO (2001) Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Genève. Te vinden op: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

21. Chang, L.W., Slikker, W. (1995) Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

22. De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

23. Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

24. Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

25. Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

26. Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) Ontogeny of Learning and Memory. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

27. Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) Perinatal Development: A Psychobiological Perspective. Academic Press, Orlando.

28. Zoetis, T., Walls, I. (2003) Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. ILSI Press, Washington, DC.

29. Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

30. Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

31. ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

32. Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼M5

33. Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

34. Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

35. Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, bbp, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

36. Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

37. Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

38. Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

39. Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

40. Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: Handbook of Behavioral Teratology. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 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, pp. 37-82.

43. Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

44. Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

45. Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

46. Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

47. Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661-669.

48. Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

49. Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: Neural Mechanisms of Startle Behavior, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, 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. In: 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, pp. 84-107.

71. Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) Theory and Practice of Histological Techniques, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼M5

72. Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

73. Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

74. Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

75. De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

76. De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., 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. In: Handbook of Developmental Neurotoxicology, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 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., 8:21-27.

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**

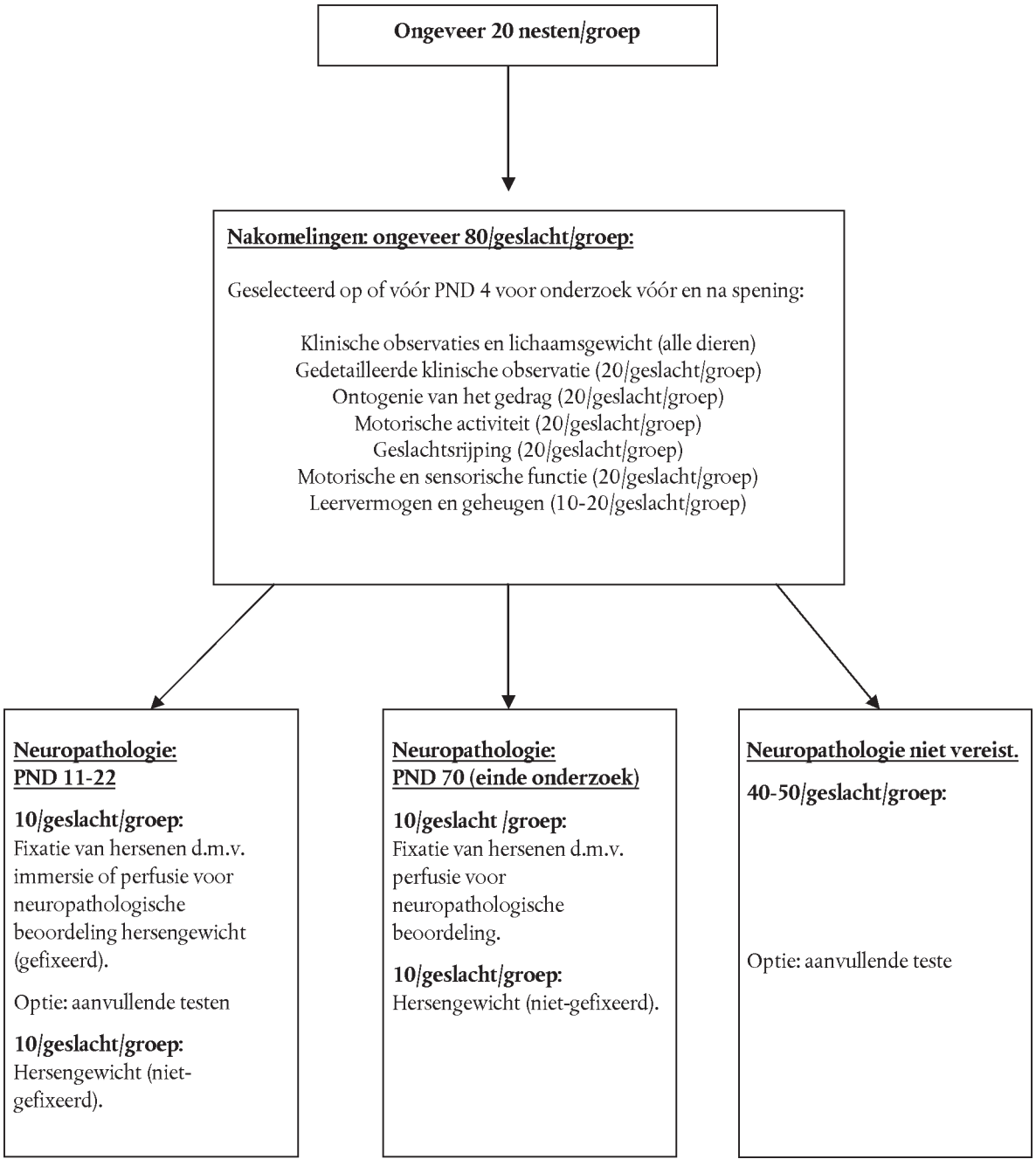
108. Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology 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

Figuur 1

Algemeen testschema voor functie/gedragstesten, neuropathologische beoordeling en hersengewichten. Dit diagram is gebaseerd op de beschrijving in punten 13-15 (PND = postnatale dag). Voorbeelden van toewijzing van dieren staan in aanhangsel 1.



▼M5

Aanhangsel 1

1. Hieronder worden voorbeelden van mogelijke toewijzingen beschreven en in tabelvorm gepresenteerd. Deze voorbeelden dienen ter illustratie van een aantal verschillende manieren waarop onderzoeksdieren aan verscheidene testparadigma's kunnen worden toegewezen.

Voorbeeld 1

2. Eén set van 20 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) wordt gebruikt voor het testen vóór spening van de ontogenie van het gedrag. Van deze dieren worden 10 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) op humane wijze gedood op PND 22. De hersenen worden uitgenomen, gewogen en bewerkt voor histopathologische beoordeling. Daarnaast worden hersengewichtgegevens verzameld met niet-gefixeerde hersenen van de resterende 10 mannetjes en 10 vrouwtjes per dosisniveau.

3. Er wordt nog een set van 20 dieren/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) gebruikt voor functie/gedragstesten na spening (gedetailleerde klinische observaties, motorische activiteit, auditieve schrikreactie en testen cognitieve functie bij adolescenten) en beoordeling van de leeftijd van geslachtsrijping. Van deze dieren worden 10 dieren/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) verdoofd en via perfusie gefixeerd aan het einde van het onderzoek (ongeveer PND 70). Na aanvullende in-situfixatie worden de hersenen uitgenomen en bewerkt voor neuropathologische beoordeling.

4. Voor het testen van de cognitieve functie bij jongvolwassen dieren (bv. PND 60-70) wordt een derde set van 20 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) gebruikt. Van deze dieren worden 10 dieren/geslacht/groep (1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) gedood aan het einde van het onderzoek en worden de hersenen uitgenomen en gewogen.

5. De resterende 20 dieren/geslacht/groep zijn reservedieren voor mogelijke aanvullende testen.

Tabel 1

Nr. jong [a]		Aantal aan een test toegewezen jongen	Onderzoek/test
m	v		
1	5	20 m + 20 v	Ontogenie van het gedrag
		10 m + 10 v	Hersengewicht/neuropathologie/morfometrie op PND 22
		10 m + 10 v	Hersengewicht op PND 22
2	6	20 m + 20 v	Gedetailleerde klinische observaties
		20 m + 20 v	Motorische activiteit
		20 m + 20 v	Geslachtsrijping
		20 m + 20 v	Motorische en sensorische functie
		20 m + 20 v	Leervermogen- en geheugen (PND 25)
		10 m + 10 v	Hersengewicht/neuropathologie/morfometrie van jongvolwassen dieren op ~PND 70

▼**M5**

Nr. jong ([a])		Aantal aan een test toegewezen jongen	Onderzoek/test
m	v		
3	7	20 m + 20 v	Leervermogen en geheugen (jongvolwassen dieren)
		10 m + 10 v	Hersengewicht van jongvolwassen dieren op ~ PND 70
4	8	—	Reservedieren voor vervangingen of aanvullende testen

([a]) Voor dit voorbeeld worden nesten uitgedund tot 4 mannetjes + 4 vrouwtjes; mannelijke jongen krijgen nr. 1-4, vrouwelijke jongen 5-8.

Voorbeeld 2

6. Eén set van 20 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) wordt gebruikt voor het testen vóór spening van de ontogenie van het gedrag. Van deze dieren worden 10 jongen/geslacht/dosisniveau (1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) op humane wijze gedood op PND 11. De hersenen worden uitgenomen, gewogen en bewerkt voor histopathologische beoordeling.

7. Er wordt nog een set van 20 dieren/geslacht/dosisniveau (1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) gebruikt voor onderzoek na spening (gedetailleerde klinische observaties, motorische activiteit, beoordeling van leeftijd van geslachtsrijping en motorische en sensorische functie). Van deze dieren worden 10 dieren/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) verdoofd en via perfusie gefixeerd aan het einde van het onderzoek (ongeveer PND 70). Na aanvullende in-situfixatie worden de hersenen uitgenomen, gewogen en bewerkt voor neuropathologische beoordeling.

8. Voor het testen van de cognitieve functie bij adolescente en jongvolwassen dieren worden 10 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) gebruikt. Voor het testen van de cognitieve functie op PND 23 en bij jongvolwassen dieren worden verschillende dieren gebruikt. Aan het einde worden de 10 dieren/geslacht/groep die als volwassen dieren werden getest, gedood, waarna de hersenen worden uitgenomen en gewogen.

9. De resterende 20 dieren/geslacht/groep die niet zijn geselecteerd voor de testen, worden bij het spenen gedood en afgevoerd.

Tabel 2

Nr. jong ([a])		Aantal aan een test toegewezen jongen	Onderzoek/test
m	v		
1	5	20 m + 20 v	Ontogenie van het gedrag
		10 m + 10 v	Hersengewicht/neuropathologie/morfometrie op PND 11
2	6	20 m + 20 v	Gedetailleerde klinische observaties
		20 m + 20 v	Motorische activiteit
		20 m + 20 v	Geslachtsrijping
		20 m + 20 v	Motorische en sensorische functie
		10 m + 10 v	Hersengewicht/neuropathologie/morfometrie van jongvolwassen dieren op ~PND 70

▼**M5**

Nr. jong ([a])		Aantal aan een test toegewezen jongen	Onderzoek/test
m	v		
3	7	10 m + 10 v ([b])	Leervermogen- en geheugen (PND 23)
3	7	10 m + 10 v ([b])	Leervermogen en geheugen (jongvolwassen dieren) Hersengewicht van jongvolwassen dieren
4	8	—	Dieren gedood en afgevoerd op PND 21

([a]) Voor dit voorbeeld worden nesten uitgedund tot 4 mannetjes + 4 vrouwtjes; mannelijke jongen krijgen nr. 1-4, vrouwelijke jongen 5-8.
([b]) Verschillende jongen worden gebruikt voor cognitieve testen op PND 23 en bij jongvolwassen dieren (bv. even/oneven nesten van in totaal 20).

Voorbeeld 3

10. Eén set van 20 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) wordt gebruikt voor bepaling van het hersengewicht en neuropathologische beoordeling op PND 11. Van deze dieren worden 10 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) op humane wijze gedood op PND 11, waarna de hersenen worden uitgenomen, gewogen en bewerkt voor histopathologische beoordeling. Daarnaast worden hersengewichtgegevens verzameld van niet-gefixeerde hersenen van de resterende 10 mannetjes en 10 vrouwtjes per dosisniveau.

11. Er wordt nog een set van 20 dieren/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) gebruikt voor ontogenie van het gedrag (motorische activiteit), onderzoek na spening (motorische activiteit en bepaling van leeftijd van geslachtsrijping) en testen van de cognitieve functie bij adolescente dieren.

12. Er wordt nog een set van 20 dieren/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) gebruikt voor testen van de motorische en sensorische functie (auditieve schrikreactie) en gedetailleerde klinische observaties. Van deze dieren worden 10 dieren/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) verdoofd en via perfusie gefixeerd aan het einde van het onderzoek (ongeveer PND 70). Na aanvullende in-situ-fixatie worden de hersenen uitgenomen, gewogen en bewerkt voor neuropathologische beoordeling.

13. Voor het testen van de cognitieve functie bij jongvolwassen dieren wordt nog een set van 20 jongen/geslacht/dosisniveau (d.w.z. 1 mannetje en 1 vrouwtje per nest) gebruikt. Van deze dieren worden 10 dieren/geslacht/groep (d.w.z. 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest) gedood aan het einde van het onderzoek en worden de hersenen uitgenomen en gewogen.

Tabel 3

Nr. jong ([a])		Aantal aan een test toegewezen jongen	Onderzoek/test
m	v		
1	5	10 m + 10 v	Hersengewicht/neuropathologie/morfometrie op PND 11
		10 m + 10 v	Hersengewicht op PND 11
2	6	20 m + 20 v	Ontogenie van het gedrag (motorische activiteit)
		20 m + 20 v	Motorische activiteit
		20 m + 20 v	Geslachtsrijping
		20 m + 20 v	Leervermogen- en geheugen (PND 27)

▼**M5**

Nr. jong ([a])		Aantal aan een test toegewezen jongen	Onderzoek/test
m	v		
3	7	20 m + 20 v	Auditieve schrikreactie (adolescente en jongvolwassen dieren)
		20 m + 20 v	Gedetailleerde klinische observaties
		10 m + 10 v	Hersengewicht/neuropathologie/ morfometrie op ~PND 70
4	8	20 m + 20 v	Leervermogen en geheugen (jongvolwassen dieren)
		10 m + 10 v	Hersengewicht van jongvolwassen dieren

([a]) Voor dit voorbeeld worden nesten uitgedund tot 4 mannetjes + 4 vrouwtjes; mannelijke jongen krijgen nr. 1-4, vrouwelijke jongen 5-8.

▼M5

Aanhangsel 2

Definities

Stof: een stof of mengsel.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M5

B.54. **UTEROTROFE BIOASSAY BIJ KNAAGDIEREN: EEN KORTLOPENDE SCREENINGSTEST OP OESTROGENE EIGENSCHAPPEN**

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 440 (2007) van de OESO. In 1998 is de OESO een actie gestart om bestaande richtlijnen te herzien en nieuwe richtlijnen te ontwikkelen voor het screenen op en testen van potentiële hormoonontregelaars (1), en heeft zij daaraan een hoge prioriteit toegekend. Een onderdeel van deze actie was het ontwikkelen van een testrichtlijn voor de uterotrofe bioassay bij knaagdieren. De uterotrofe bioassay bij knaagdieren werd vervolgens onderworpen aan een uitgebreid valideringsprogramma dat onder meer bestond uit het opstellen van een gedetailleerd achtergronddocument (2)(3) en het uitvoeren van uitgebreide intra- en interlaboratoriumonderzoeken om de relevantie en reproduceerbaarheid aan te tonen van de bioassay met een krachtig referentie-oestrogeen, zwakke oestrogeenreceptoragonisten, een sterke oestrogeenreceptorantagonist en een negatieve referentiestof (4)(5)(6)(7)(8)(9). Deze testmethode B.54 is het resultaat van de ervaring die is opgedaan tijdens het valideringstestprogramma en de daaruit verkregen resultaten met oestrogeenagonisten.

2. De uterotrofe bioassay bij knaagdieren is een kortlopende screeningstest die in de jaren 30 werd ontwikkeld (27)(28) en in 1962 voor het eerst werd gestandaardiseerd voor screening door een comité van deskundigen (32)(35). De test berust op de toename van het gewicht van de baarmoeder of de uterotrofe respons (zie 29 voor een overzichtsartikel). Beoordeeld wordt in welke mate een stof in staat is biologische activiteiten teweeg te brengen die overeenkomen met die van agonisten of antagonisten of natuurlijke oestrogenen (bv. 17b-estradiol); de test wordt echter veel minder vaak gebruikt voor de detectie van antagonisten dan voor de detectie van agonisten. De baarmoeder reageert op twee manieren op oestrogenen. In eerste instantie neemt het gewicht toe als gevolg van waterimbibitie. Deze respons wordt gevolgd door een gewichtstoename als gevolg van weefselgroei (30). De responsen van de baarmoeder bij ratten en muizen zijn kwalitatief vergelijkbaar.

3. Deze bioassay fungeert als een in-vivoscreeningstest en de toepassing ervan moet worden gezien in samenhang met het „Conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen” (aanhangsel 2). In dit conceptueel kader is de uterotrofe bioassay ondergebracht in niveau 3 als een in-vivotest waarmee gegevens kunnen worden verkregen over een enkel hormoonmechanisme, d.w.z. oestrogene werking.

4. De bedoeling is dat de uterotrofe bioassay wordt opgenomen in een reeks in-vitro- en in-vivotesten voor de identificatie van stoffen die mogelijk interactie vertonen met het hormoonsysteem, op basis waarvan uiteindelijk beoordelingen van het risico voor de gezondheid van de mens of het milieu tot stand komen. Het valideringsprogramma van de OESO maakte gebruik van zowel sterke als zwakke oestrogeenagonisten bij de beoordeling van de prestatie van de test voor de identificatie van oestrogene stoffen (4)(5)(6)(7)(8). De gevoeligheid van de testprocedure voor oestrogeenagonisten werd daarbij goed aangetoond, evenals een goede intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid.

5. Wat betreft negatieve stoffen werd slechts één „negatieve” referentiestof, waarvan al gerapporteerd was dat deze negatief was volgens een uterotrofe test alsook in-vitroreceptorbindings- en receptortesten, opgenomen in het valideringsprogramma. Daarnaast zijn echter aanvullende testgegevens beoordeeld die geen verband hielden met het OESO-valideringsprogramma, en hierdoor werd de specificiteit van de uterotrofe bioassay voor de screening van oesterogeenagonisten verder ondersteund (16).

▼M5

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

6. Oestrogeenagonisten en -antagonisten werken als liganden voor de oestrogeenreceptoren a en b en kunnen de transcriptiewerking van de receptoren respectievelijk activeren of remmen. Dit zou kunnen leiden tot schadelijke gevaren voor de gezondheid, waaronder effecten op de voortplanting en de ontwikkeling. Er bestaat daarom behoefte aan een snelle methode om een stof te beoordelen en te evalueren als een mogelijke oestrogeenagonist of -antagonist. De affiniteit van een ligand voor een oestrogeenreceptor of transcriptieactivering van reportergenen in vitro is wel informatief, maar is slechts een van de verschillende determinanten van mogelijk gevaar. Mogelijke andere determinanten zijn onder meer metabole activering en deactivering nadat de stof het lichaam is binnengetreden, distributie naar doelweefsels en klaring uit het lichaam, en zijn ten minste deels afhankelijk van de toedieningsweg en de betreffende stof. Hierdoor bestaat de behoefte de mogelijke activiteit van een stof *in vivo* te screenen onder relevante omstandigheden, tenzij de kenmerken van de stof wat betreft absorptie, distributie, metabolisme en eliminatie (ADME) al voldoende informatie opleveren. Baarmoederweefsels reageren met snelle en krachtige groei op stimulering door oestrogenen, met name bij proefknaagdieren, waarbij de oestruscyclus ongeveer vier dagen duurt. Knaagdiersoorten, in het bijzonder de rat, worden bovendien veel gebruikt in toxiciteitsonderzoeken naar karakterisering van gevaren. De baarmoeder van knaagdieren is daarom een geschikt doelorgaan voor de in-vivoscreening van oestrogeenagonisten en -antagonisten.

7. Deze testmethode is gebaseerd op de in het OESO-valideringsonderzoek toegepaste protocollen die betrouwbaar en herhaalbaar zijn gebleken in intra- en interlaboratoriumonderzoeken (5)(7). Op dit moment zijn er twee methoden beschikbaar, namelijk de methode met volwassen vrouwtjes die ovariëctomie hebben ondergaan (ovx-volwassen-methode), en de methode met onvolgroeide vrouwtjes die geen ovariëctomie hebben ondergaan (onvolgroeidmethode). In het OESO-valderingstestprogramma is aangetoond dat beide methoden wat betreft gevoeligheid en reproduceerbaarheid vergelijkbaar zijn. Vanwege de intacte hypothalamus-hypofyse-gonadeas (HPG-as), is het onvolgroeide dier weliswaar enigszins minder specifiek, maar heeft het een grotere onderzoeksreikwijdte dan het dier dat ovariëctomie heeft ondergaan, omdat het kan reageren op stoffen die interactie vertonen met de HPG-as en niet alleen met de oestrogeenreceptor. De HGP-as van de rat is functioneel vanaf een leeftijd van ongeveer 15 dagen. Eerder kan de puberteit niet met behandelingen als GnRH worden versneld. Als de vrouwtjes richting de puberteit gaan, heeft het vrouwtje vóór de vaginale opening verscheidene stille cycli die niet leiden tot vaginale opening of ovulatie, maar waarbij er wel enige hormonale schommelingen zijn. Als een stof de HPG-as direct of indirect stimuleert, leidt dit tot vroegtijdige puberteit, vroege eisprong en versnelde vaginale opening. Dit treedt niet alleen op bij stoffen die inwerken op de HPG-as, maar ook bepaald voer met een hogere metaboliseerbare energiewaarde dan ander voer stimuleert de groei en versnelt de vaginale opening zonder een oestrogene werking te hebben. Dergelijke stoffen induceren geen uterotrofe respons bij volwassen ovx-dieren, omdat hun HPG-as niet werkt.

8. Met het oog op dierenwelzijn moet de voorkeur worden gegeven aan de methode met onvolgroeide ratten, zodat dat operatieve voorbehandeling van de dieren wordt voorkomen en ook wordt voorkomen dat de dieren met aanwijzingen dat deze in de oestrus komen, mogelijk niet worden gebruikt (zie punt 30).

▼M5

9. De uterotrofe respons is niet geheel van oestrogene oorsprong, d.w.z. andere stoffen dan agonisten of antagonisten van oestrogenen kunnen ook een respons geven. Zo kunnen relatief hoge doses progesteron, testosteron of verscheidene synthetische progestinen allemaal leiden tot een stimulerende respons (30). Elke respons kan histologisch geanalyseerd worden op keratinisatie en verhoorning van de vagina (30). Ongeacht de mogelijke bron van de respons moet bij een positieve uitkomst van een uterotrofe bioassay normaliter actie worden ondernomen om meer duidelijkheid te verschaffen. Aanvullende aanwijzingen voor oestrogene werking kunnen komen uit in-vitrotesten, zoals de ER-bindingtesten en transcriptieactiveringstesten of uit andere in-vivotesten zoals de test op de puberale ontwikkeling bij vrouwtjes (female pubertal assay).

10. Aangezien de uterotrofe bioassay fungeert als een in-vivoscreeningstest, diende de gekozen valideringsaanpak zowel de overwegingen met het oog op dierenwelzijn als een gefaseerde teststrategie. Daartoe lag de focus meer op grondige validering van de reproduceerbaarheid en gevoeligheid voor oestrogene werking — de belangrijkste bron van zorg voor veel stoffen — dan op het anti-oestrogene deel van de test. Omdat het aantal stoffen met een duidelijk anti-oestrogeen profiel (niet vertroebeld door enige oestrogene activiteit) zeer beperkt is, werd slechts één anti-oestrogeen met sterke activiteit onderzocht. Deze testmethode heeft dus betrekking op het oestrogene protocol; het protocol waarin de antagonistmodus van de test wordt beschreven, is in een leidraad opgenomen (37). De reproduceerbaarheid en gevoeligheid van de test voor stoffen met zuiver anti-oestrogene activiteit wordt later duidelijker gedefinieerd, nadat de testprocedure enige tijd routinematig in gebruik is geweest en meer stoffen met dit type werking zijn geïdentificeerd.

11. Erkend wordt dat alle procedures waarbij dieren worden gebruikt, aan de plaatselijke normen voor de verzorging van dieren moeten voldoen. De beschrijvingen van verzorging en behandeling hieronder zijn minimale uitvoeringsnormen, die ondergeschikt zijn aan lokale regelgeving zoals Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (38). De OESO heeft nadere richtsnoeren voor de humane behandeling van dieren opgesteld (25).

12. Net als met alle testen waarbij levende dieren worden gebruikt, is het van essentieel belang om vóór de start van de test zeker te stellen dat de gegevens echt noodzakelijk zijn. Twee situaties waarbij de gegevens noodzakelijk kunnen zijn, zijn bijvoorbeeld:

— hoge potentiële blootstelling (niveau 1 van het conceptueel kader, aanhangsel 2) of aanwijzingen voor oestrogene werking (niveau 2), om te onderzoeken of dergelijke effecten kunnen plaatsvinden in vivo,

— effecten die wijzen op oestrogene werking bij in-vivotesten van niveau 4 of 5, om aan te tonen dat de effecten verband hielden met een oestrogeen mechanisme dat niet kan worden opgehelderd met een in-vitrotest.

13. De bij deze testmethode gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

▼M5

PRINCIPE VAN DE TEST

14. De gevoeligheid van de uterotrofe bioassay berust op een testsysteem met proefdieren waarbij de hypothalamus-hypofyse-gonadeas niet functioneel is, wat lage endogene concentraties van circulerend oestrogeen geeft. Dit zorgt voor een laag basisgewicht van de baarmoedergewicht op baseline en een maximaal bereik van de respons op toegediende oestrogenen. Twee oestrogeengevoelige toestanden van het vrouwelijke knaagdier voldoen aan deze eis:

i) onvolgroeide vrouwtjes na spening en vóór de puberteit, en

ii) jongvolwassen vrouwtjes na ovariëctomie waarbij er voldoende tijd is voor regressie van baarmoederweefsels.

15. De teststof wordt dagelijks toegediend via een orale maagsonde of subcutane injectie. De stof wordt in geleidelijk stijgende doses toegediend aan minimaal twee behandelgroepen (zie punt 33 voor richtsnoeren) van proefdieren met één dosisniveau per groep en een toedieningsperiode van drie opeenvolgende dagen voor de onvolgroeid-methode en een minimale toedieningsperiode van drie opeenvolgende dagen voor de ovx-volwassen-methode. Ongeveer 24 uur na de laatste dosis wordt obductie verricht op de dieren. Voor oestrogeenagonisten wordt beoordeeld of het gemiddelde baarmoedergewicht van de groepen met behandelde dieren statistisch significant is toegenomen ten opzichte van dat van de mediumgroep. Een statistisch significante toename van het gemiddelde baarmoedergewicht van een testgroep wijst op een positieve respons in deze bioassay.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Keuze van de diersoort

16. Voor de methode kunnen vaak gebruikte proefknaagdierstammen worden gebruikt. Tijdens de validering werden bijvoorbeeld de rattenstammen Sprague-Dawley en Wistar gebruikt. Stammen met baarmoeders waarvan bekend is of vermoed wordt dat het responsvermogen lager is, mogen niet worden gebruikt. Het laboratorium moet de gevoeligheid van de gebruikte stam aantonen, zoals beschreven in punten 26 en 27.

17. De rat en muis zijn al sinds de jaren 30 routinematig gebruikt voor de uterotrofe bioassay. De OESO-valideringsonderzoeken werden alleen met ratten verricht op grond van de aanname dat beide soorten naar verwachting gelijkwaardig zijn en dat één soort daarom voldoende moet zijn voor de wereldwijde validering, om zodoende te besparen op middelen en dieren. In de meeste onderzoeken naar reproductie- en ontwikkelingstoxiciteit is de rat de aangewezen soort. In aanmerking genomen dat er voor muizen een enorme historische databank bestaat werd er, om de reikwijdte van de testmethode van de uterotrofe bioassay bij knaagdieren uit te breiden met het gebruik van muizen als testsoorten, een beperkt follow-upvalideringsonderzoek met muizen uitgevoerd (16). Er is gekozen voor een overbruggingsaanpak met een beperkt aantal teststoffen, deelnemende laboratoria en zonder codering van monsters, in overeenstemming met de oorspronkelijke intentie om te besparen op middelen en dieren. Uit dit overbruggingsvalideringsonderzoek blijkt voor de uterotrofe bioassay bij jongvolwassen muizen die ovariëctomie hebben ondergaan, dat de bij ratten en muizen verkregen gegevens kwalitatief en kwantitatief goed met elkaar overeenkomen. Dit maakt het mogelijk, in het geval de uterotrofe bioassay inleidend is voor een langdurig onderzoek, in beide onderzoeken dieren van dezelfde stam en afkomst te gebruiken. Omdat de overbruggingsaanpak werd beperkt tot ovx-muizen en in het verslag geen robuuste dataset staat die het onvolgroeid-model valideert, valt het onvolgroeid-model voor muizen niet onder de reikwijdte van de huidige testmethode.

▼M5

18. In bepaalde gevallen kunnen dus muizen in plaats van ratten worden gebruikt. De keuze voor deze soort moet worden gemotiveerd op basis van toxicologische, farmacokinetische en/of andere criteria. Het kan noodzakelijk zijn om voor muizen van het protocol af te wijken. Zo is de voedselconsumptie van muizen op basis van lichaamsgewicht hoger dan die van ratten en moet daarom het gehalte aan fyto-oestrogenen in het voer voor muizen lager zijn dan voor ratten (9)(20)(22).

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

19. Alle procedures moeten verlopen conform de plaatselijke normen voor de verzorging van proefdieren. Deze beschrijvingen van de verzorging en behandeling zijn minimumnormen, die ondergeschikt zijn aan lokale regelgeving zoals Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (38). De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C te zijn (met een spreiding van ± 3 °C). De relatieve vochtigheid moet minimaal 30 % zijn en bij voorkeur niet hoger dan maximaal 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte). Er moet worden gestreefd naar een relatieve vochtigheid van 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht, met een dagelijkse lichtcyclus van 12 uur licht en 12 uur donker.

20. Proefdiervoer en drinkwater moeten ad libitum worden verstrekt. Jongvolwassen dieren kunnen elk apart of in groepjes van maximaal drie dieren worden ondergebracht. Vanwege de jonge leeftijd van de onvolgroeide dieren, wordt sociale groepshuisvesting aanbevolen.

21. Het is bekend dat hoge gehaltes aan fyto-oestrogenen in proefdiervoer het baarmoedergewicht bij knaagdieren in zodanige mate verhogen, dat dit de uterotrofe bioassay verstoort (13)(14)(15). Hoge gehaltes aan fyto-oestrogenen en hoge metaboliseerbare energiewaarden in proefdiervoer kan bij gebruik van onvolgroeide dieren ook leiden tot vroegtijdige pubertijd. De fyto-oestrogenen komen hoofdzakelijk uit soja- en luzerneproducten die in het proefdiervoer zijn verwerkt, en het is gebleken dat de concentratie fyto-oestrogenen in standaardproefdiervoer van partij tot partij varieert (23). Het lichaamsgewicht is een belangrijke variabele, omdat de hoeveelheid voedsel die ingenomen wordt, gerelateerd is aan het lichaamsgewicht. De feitelijke dosis fyto-oestrogenen die dieren via hetzelfde voer binnenkrijgen, kan daarom per soort en per leeftijd variëren (9). Voor onvolgroeide vrouwelijke ratten kan de voedselconsumptie op basis van lichaamsgewicht ongeveer een factor twee groter zijn dan die voor jongvolwassen vrouwtjes die ovariëctomie hebben ondergaan. Voor jongvolwassen muizen kan de voedselconsumptie op basis van lichaamsgewicht ongeveer een factor vier groter zijn dan die voor jongvolwassen vrouwelijke ratten die ovariëctomie hebben ondergaan.

22. Uit resultaten van uterotrofe testen (9)(17)(18)(19) blijkt echter dat beperkte hoeveelheden fyto-oestrogenen in voer aanvaardbaar zijn en de gevoeligheid van de bioassay niet verminderen. Als richtsnoer mogen de gehaltes aan fyto-oestrogenen in voer niet hoger zijn dan 350 µg genisteïne-equivalenten/gram proefdiervoer voor onvolgroeide vrouwelijke Sprague Dawley- en Wistar-ratten (6)(9). Dergelijk voer moet eveneens aangewezen zijn bij het testen van jongvolwassen ratten die ovariëctomie hebben ondergaan, omdat de voedselconsumptie op basis van lichaamsgewicht bij jongvolwassen dieren lager is dan bij onvolgroeide dieren. Als volwassen muizen die ovariëctomie hebben ondergaan, of ratten die gevoeliger zijn voor fyto-oestrogenen, gebruikt gaan worden, moet worden overwogen de gehaltes aan fyto-oestrogenen in voer op evenredige wijze te verlagen (20). Bovendien kunnen de verschillen in de beschikbare metabole energie die verschillend voer levert, leiden tot verschuiving van het moment waarop de pubertijd begint (21)(22).

▼M5

23. Voorafgaand aan het onderzoek moet zorgvuldig een voer zonder een verhoogd gehalte aan fyto-oestrogenen (zie (6)(9) voor richtsnoeren) of een verhoogde metaboliseerbare energiewaarde worden uitgekozen, omdat anders verstoring van de resultaten zou kunnen optreden (15)(17)(19)(22)(36). Erop toezien dat het door het laboratorium gebruikte testsysteem naar behoren presteert, zoals beschreven in punten 26 en 27, vormt een belangrijke controle op beide factoren. Als voorzorgsmaatregel in overeenstemming met goede laboratoriumpraktijken (GLP) moet van elke partij voer die tijdens het onderzoek wordt toegediend, een representatief monster worden genomen voor mogelijke analyse van het gehalte aan fyto-oestrogenen (bv. in het geval van een hoog controle-baarmoedergewicht ten opzichte van historische controles of een inadequate respons op het referentie-oesterogeen, 17-alfa-ethinylestradiol). Aliquots moeten als onderdeel van het onderzoek geanalyseerd worden of ingevroren worden bij – 20 °C of op zodanige wijze bewaard worden dat afbraak van het monster vóór analyse wordt voorkomen.

24. Bepaald strooisel kan natuurlijk voorkomende oestrogene of anti-oestrogene stoffen bevatten (het is bv. bekend dat maïsspil de cyclus van ratten beïnvloedt en een anti-oestrogene werking lijkt te hebben). Het gehalte aan fyto-oestrogenen in het gekozen strooisel moet minimaal zijn.

Voorbereiding van de dieren

25. Proefdieren zonder aanwijzingen voor ziekte of lichamelijke afwijkingen worden willekeurig toegewezen aan de controle- en behandelgroepen. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Aan de dieren moet een unieke code worden toegekend. Bij voorkeur moeten onvolgroeide dieren tijdens de acclimatisering tot de spening worden ondergebracht met moederdieren of pleegmoederdieren. De acclimatiseringsperiode vóór aanvang van het onderzoek moet ongeveer vijf dagen duren voor jongvolwassen dieren en voor de onvolgroeide dieren die zijn geleverd met moederdieren of pleegmoederdieren. Als de onvolgroeide dieren gespeende dieren zonder moederdieren zijn, kan het noodzakelijk worden de acclimatiseringsperiode te verkorten omdat de toediening direct na de spening moet beginnen (zie punt 29).

PROCEDURE

Verificatie van de geschiktheid van laboratoria

26. De geschiktheid van laboratoria kan op twee verschillende mogelijkheden geverifieerd worden:

— periodieke verificatie op basis van een inleidend positieve-controleonderzoek op baseline (zie punt 27). Ten minste elke zes maanden en elke keer dat er sprake is van een verandering die van invloed kan zijn op de prestatie van de test (bv. een nieuwe formulering van het voer, andere medewerkers die de excisies verrichten, andere stam of leverancier van de dieren), moet het responsvermogen van het testsysteem (diermodel) geverifieerd worden met een gepaste dosis (gebaseerd op het in punt 27 beschreven inleidende positieve-controleonderzoek op baseline) van een referentie-oestrogeen: 17a-ethinylestradiol (CAS-nr. 57-63-6) (EE);

— toepassing van gelijktijdige controles door opname van een groep die een gepaste dosis van het referentie-oestrogeen krijgt toegediend in elke test.

Als het systeem niet reageert zoals verwacht, moeten de testomstandigheden worden onderzocht en dienovereenkomstig worden gewijzigd. De aanbevolen dosis van het te gebruiken referentie-oestrogeen in beide aanpakken is ongeveer de ED 70 tot 80.

▼M5

27. **Positieve-controleonderzoek op baseline** — Voordat een laboratorium voor het eerst een onderzoek volgens deze testmethode uitvoert, moet eerst de geschiktheid van het laboratorium worden aangetoond door het responsvermogen van het diermodel te testen door de dosisrespons van het referentie-oestrogeen 17a-ethinylestradiol (CAS-nr. 57-63-6) (EE) te bepalen met minimaal vier doses. De respons op het baarmoedergewicht wordt vergeleken met vastgestelde historische gegevens (zie referentie (5)). Als dit positieve-controleonderzoek op baseline niet de verwachte resultaten oplevert, moeten de testomstandigheden worden onderzocht en gewijzigd.

Aantal en toestand van de dieren

28. De behandel- en controlegroepen moeten elk ten minste 6 dieren bevatten voor beide protocollen (methode met onvolgroeide dieren en methode met ovx-volwassen dieren).

Leeftijd van onvolgroeide dieren

29. Voor de uterotrofe bioassay met onvolgroeide dieren moet de geboortedatum vermeld worden. De toediening moet vroeg genoeg beginnen opdat aan het einde van de toediening van de stof de met de pubertijd samenhangende fysiologische stijging van endogene oestrogenen nog niet heeft plaatsgevonden. Anderzijds zijn er aanwijzingen dat zeer jonge dieren mogelijk minder gevoelig zijn. Voor het bepalen van de optimale leeftijd moet elk laboratorium rekening houden met de eigen achtergrondgegevens over rijping.

Als richtsnoer kan worden aangehouden dat de toediening bij ratten direct na vroegtijdig spening op postnatale dag 18 kan beginnen (waarbij de geboortedag postnatale dag 0 is). De toediening bij ratten moet bij voorkeur afgerond zijn op postnatale dag 21, maar in elk geval vóór postnatale dag 25, omdat na deze leeftijd de hypothalamus-hypofyse-gonadeas functioneel wordt en de endogene oestrogeenspiegels kunnen gaan stijgen met een daarmee gepaard gaande toename in gemiddeld baarmoedergewicht op baseline en een toename in de groep-standaarddeviaties (2)(3)(10)(11)(12).

Procedure voor ovariëctomie

30. Voor de vrouwelijke rat en muis die ovariëctomie hebben ondergaan (behandel- en controlegroepen) moet de ovariëctomie plaatsvinden op een leeftijd tussen 6 en acht weken. Voor ratten moet tussen de ovariëctomie en de eerste toedieningsdag een tussenpoos van minimaal 14 dagen worden aangehouden, zodat de baarmoeder kan terugkeren tot een minimale stabiele uitgangssituatie. Voor muizen moet tussen de ovariëctomie en de eerste toedieningsdag een tussenpoos van ten minste zeven dagen worden aangehouden. Omdat kleine stukjes eierstokweefsel voldoende zijn om significante circulerende oestrogeenspiegels te produceren (3), moeten de dieren vóór gebruik worden getest door observatie van epitheelcellen in een vaginaal uitstrijkje op ten minste vijf opeenvolgende dagen (bv. op dag 10-14 na ovariëctomie voor ratten). Als er aanwijzingen zijn dat de dieren in de oestrus komen, mogen deze dieren niet worden gebruikt. Verder moeten bij de obductie de eierstokstompjes worden onderzocht op aanwijzingen voor aanwezig eierstokweefsel. Zo ja, dan mogen de gegevens van dit dier niet worden meegenomen in de berekeningen (3).

31. De ovariëctomie-ingreep begint met het dier in ventrale ligging te positioneren, nadat het dier op correcte wijze onder narcose is gebracht. De incisie die de dorso-laterale buikwand opent moet ongeveer 1 cm in lengte zijn op het middelpunt tussen de inferiore ribgrens en de darmbeenkam (crista iliaca), en enkele millimeters lateraal aan de laterale marge van de lumbale spier. De eierstok moet uit de buikholte worden genomen en op een aseptisch vlak worden geplaatst. De eierstok moet worden losgemaakt bij de verbinding van de eileider met het baarmoederlichaam. Nadat is vastgesteld dat er geen grote bloedingen zijn, moet de buikwand worden gesloten met een hechting en de huid worden gesloten met nietjes of geschikt hechtdraad. De punten van afbinding staan schematisch weergegeven in figuur 1. Er moet passende postoperatieve analgesie worden gegeven volgens de aanbevelingen van een dierenarts met ervaring in de verzorging van knaagdieren.

▼M5

Lichaamsgewicht

32. Bij de ovx-volwassen-methode is er geen verband tussen het lichaamsgewicht en het baarmoedergewicht, omdat het baarmoedergewicht wordt beïnvloed door hormonen zoals oestrogenen en niet door de groeifactoren die de lichaamsgrootte reguleren. Bij het onvolgroeid-model hangt het lichaamsgewicht daarentegen wel samen met het baarmoedergewicht tot volwassenheid is bereikt (34). Aan het begin van het onderzoek mag bij het onvolgroeid-model het gewicht van de gebruikte dieren daarom slechts minimaal en niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken. Dit betekent dat de nestgrootte door de fokker gestandaardiseerd moet worden om ervoor te zorgen dat nakomelingen van verschillende moederdieren ongeveer hetzelfde worden gevoerd. Dieren moeten worden toegewezen aan (controle- en behandel-) groepen via gerandomiseerde gewichtsverdeling, zodat het gemiddelde lichaamsgewicht van elke groep niet statistisch afwijkt van alle andere groepen. Er moet zoveel mogelijk getracht worden toewijzing van nestgenoten aan dezelfde behandelgroep te voorkomen zonder daarvoor het aantal nesten voor het onderzoek te moeten verhogen.

Dosering

33. Om vast te stellen of een teststof oestrogene werking kan hebben in vivo, zijn twee dosisgroepen en een controlegroep normaal voldoende, en deze opzet verdient daarom de voorkeur met het oog op dierenwelzijn. Voor het opstellen van een dosis-responscurve of de extrapolatie naar lagere doses zijn ten minste 3 dosisgroepen nodig. Als meer informatie nodig is naast vaststelling van de oestrogene activiteit (zoals een schatting van de werkzaamheid), moet een ander doseringsschema worden overwogen. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld worden als de dieren in de testgroepen. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient de controlegroep dezelfde hoeveelheid medium te krijgen als voor de behandelgroepen is gebruikt (of het hoogste volume dat in de testgroepen is gebruikt als er verschillen in zijn).

34. Het doel van de uterotrofe bioassay is het bepalen van doses waarbij overleving van de dieren gewaarborgd is en er geen sprake is van significante toxiciteit of leed voor de dieren na drie opeenvolgende dagen van toediening van de stof tot een maximumdosis van 1 000 mg/kg/dag. Alle dosisniveaus moeten worden voorgesteld en gekozen in het licht van de bestaande gegevens over toxiciteit en (toxico)kinetica van de teststof of verwante stoffen. Bij het bepalen van het hoogste dosisniveau moet eerst rekening worden gehouden met informatie over de LD50 en/of acute toxiciteit om sterfte, ernstig lijden of ongerief bij de dieren te voorkomen (24)(25)(26). De hoogste dosis moet de maximaal verdraagbare dosis (maximum tolerated dose, MTD) zijn; een onderzoek uitgevoerd bij een dosisniveau dat een positieve uterotrofe respons induceerde, is ook aanvaardbaar. Als screening zijn grote intervallen (bv. eenheden van een halve log, overeenkomend met een verhoging van de dosis met een factor 3,2, tot zelfs eenheden van één log) tussen doseringen doorgaans aanvaardbaar. Als er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, kan een bereikbepalingonderzoek worden uitgevoerd om de orde van grootte van de te gebruiken doses te helpen bepalen.

35. Een andere mogelijkheid is om, als de oestrogene werkzaamheid van een agonist in vitro (of in silico) bepaald kan worden, deze gegevens in aanmerking te nemen bij het kiezen van de dosis. Een schatting van de hoeveelheid van de teststof die uterotrofe responsen zou produceren die equivalent zijn aan die van de referentieagonist (ethinylestradiol), wordt bijvoorbeeld gemaakt uit de relatieve in-vitrowerkzaamheid ervan ten opzichte van ethinylestradiol. De hoogste testdosis krijgt men dan door deze equivalente dosis te vermenigvuldigen met de juiste factor, bv. 10 of 100.

▼M5

Overwegingen voor bereikbepaling

36. Zo nodig kan met enkele dieren een inleidend bereikbepalingsonderzoek worden uitgevoerd. Daarbij kan de OESO-leidraad nr. 19 (25) worden geraadpleegd voor definities van klinische verschijnselen die wijzen op toxiciteit of leed bij de dieren. Als het mogelijk is binnen dit bereikbepalingsonderzoek na drie dagen toediening, kunnen de baarmoeders ongeveer 24 uur na de laatste dosis worden uitgesneden en gewogen. Deze gegevens kunnen vervolgens worden gebruikt bij het opzetten van het hoofdonderzoek (keuze van aanvaardbare maximum- en lagere doses en een aanbeveling voor het aantal dosisgroepen).

Toediening van de doses

37. De teststof wordt toegediend via een orale maagsonde of subcutane injectie. Bij het kiezen van de toedieningsweg moet rekening worden gehouden met zowel overwegingen met het oog op dierenwelzijn als toxicologische aspecten, zoals de relevantie voor de weg van blootstelling van de mens aan de stof (bv. orale maagsonde t.o.v. inname volgens het model, subcutane injectie t.o.v. inhalatie of dermale adsorptie volgens het model), de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof en met name bestaande toxicologische informatie en gegevens over metabolisme en kinetiek (bv. noodzaak om first-passmetabolisme te voorkomen, betere efficiëntie via een bepaalde weg).

38. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterige oplossing/suspensie te overwegen. Omdat de meeste oestrogeenliganden of de metabole voorlopers ervan vaak hydrofoob zijn, wordt echter doorgaans een oplossing/suspensie in olie gebruikt (bv. maïs-, pinda-, sesam- of olijfolie). Deze oliën verschillen echter in caloriewaarde en vetgehalte, zodat het medium van invloed kan zijn op de totale inname van metaboliseerbare energie (ME), waardoor gemeten eindpunten zoals het baarmoedergewicht mogelijk veranderen, met name bij de onvolgroeid-methode (33). Voorafgaand aan het onderzoek moet daarom elk te gebruiken medium worden getest tegen controles zonder media. De teststoffen kunnen worden opgelost in een minimale hoeveelheid 95 % ethanol of andere geschikte oplosmiddelen en verdund in het testmedium tot de eind-werkconcentraties. De toxische kenmerken van het oplosmiddel moeten bekend zijn en moeten worden getest in een aparte controlegroep met alleen oplosmiddel. Als de teststof als stabiel wordt beschouwd, kan het oplossen van de teststof worden bevorderd door voorzichtig verwarmen en krachtig mechanisch roeren. De stabiliteit van de teststof in het medium moet worden bepaald. Als de teststof stabiel is voor de duur van het onderzoek, kan van de teststof één startaliquot worden bereid, waaruit de gespecificeerde doseringsverdunningen dagelijks worden bereid.

39. De toedieningstijdstippen hangen af van het gebruikte model (zie punt 29 voor het onvolgroeid-model en punt 30 voor het ovx-volwassen-model). Onvolgroeide vrouwelijke ratten krijgen de teststof dagelijks toegediend, op drie opeenvolgende dagen. Een driedaagse behandeling wordt eveneens aanbevolen voor vrouwelijke ratten die ovariëctomie hebben ondergaan, maar langere blootstellingen zijn aanvaardbaar en kunnen de detectie van zwak actieve stoffen verbeteren. Met vrouwelijke muizen die ovariëctomie hebben ondergaan, moet voor sterke oestrogeenagonisten een toedieningsduur van drie dagen voldoende zijn zonder dat verlenging tot zeven dagen significant voordeel oplevert. Dit verband werd echter niet aangetoond voor zwakke oestrogenen in het valideringsonderzoek (16), zodat de dosering moet worden verlengd tot 7 opeenvolgende dagen bij ovx-volwassen muizen. De dosis moet elke dag op hetzelfde tijdstip worden toegediend. Zo nodig moeten de doses worden aangepast om het dosisniveau per lichaamsgewicht van het dier constant te houden (bv. mg teststof per kg lichaamsgewicht per dag). Variatie van het testvolume op basis van lichaamsgewicht moet tot het minimum beperkt worden door de concentratie van de doseeroplossing zodanig aan te passen, dat per lichaamsgewicht een constant volume wordt gegeven bij alle dosisniveaus en voor elke toedieningsweg.

▼M5

40. Indien de teststof via een maagsonde wordt toegediend, moet dit in één enkele dosis dagelijks gebeuren met gebruikmaking van een maagbuisje of een geschikte intubatiecanule. Het maximale volume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. De plaatselijke richtlijnen voor dierverzorging moeten in acht worden genomen, maar het volume mag niet groter zijn dan 5 ml/kg lichaamsgewicht, tenzij het om een waterige oplossing gaat: in dat geval mag 10 ml/kg lichaamsgewicht worden gebruikt.

41. Wordt de teststof toegediend via subcutane injectie, dan moet dit dagelijks gebeuren in een enkele dosis. Doses moeten met een steriele naald (bv. 23 of 25 gauge) en een tuberculinespuit worden toegediend in de dorso-scapulaire of lumbale regio. Eventueel kan de injectieplaats worden geschoren. Eventueel verlies, weglekken op de injectieplaats of onvolledige toediening moet worden opgetekend. Het totale volume dat per rat per dag wordt geïnjecteerd mag niet groter zijn dan 5 ml/kg lichaamsgewicht, verdeeld over 2 injectieplaatsen, tenzij het om een waterige oplossing gaat: in dat geval mag 10 ml/kg lichaamsgewicht worden gebruikt.

Observaties

Algemene en klinische observaties

42. Algemene klinische observaties moeten ten minste eenmaal per dag worden verricht en vaker wanneer verschijnselen van toxiciteit worden waargenomen. De observaties moeten bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip plaatsvinden en met inachtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. Alle dieren moeten worden geobserveerd op ziekteverschijnselen, sterfte en algemene klinische verschijnselen zoals veranderingen in gedrag, huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding, en onwillekeurige reacties zoals traanvorming, recht opstaan van het haar, verandering van de pupilgrootte of een ongewoon ademhalingspatroon.

Lichaamsgewicht en consumptie van voer

43. Alle dieren moeten dagelijks worden gewogen op 0,1 g nauwkeurig, te beginnen vlak voor de behandeling start, d.w.z. wanneer de dieren over de groepen worden verdeeld. Eventueel kan de hoeveelheid voer die tijdens de behandelperiode geconsumeerd wordt, per kooi gemeten worden door de voerbak te wegen. De voerconsumptiegegevens moeten worden genoteerd in gram per rat per dag.

Excisie van de baarmoeder en gewichtsbepaling

44. Vierentwintig uur na de laatste behandeling worden de ratten op humane wijze gedood. In het ideale geval wordt de volgorde van obductie gerandomiseerd over de groepen ter voorkoming van rechtstreeks verloop in de volgorde waarin de dosisgroepen afgegaan worden, wat de gegevens subtiel kan beïnvloeden. Doel van de bioassay is het meten van het gewicht van de natte en de drooggedepte baarmoeder. Onder het natte gewicht wordt het gewicht van de baarmoeder en het luminale vocht erin verstaan. Het drooggedepte („blotted”) gewicht wordt gemeten nadat de luminale inhoud van de baarmoeder is uitgedrukt en verwijderd.

45. Vóór de excisie wordt bij onvolgroeide dieren onderzocht of de vagina geopend is. De excisie begint met het openen van de buikwand vanaf de symphysis pubica. Daarna worden de baarmoederhoorn en eierstokken, indien aanwezig, losgemaakt van de dorsale buikwand. De blaas en urineleiders worden weggenomen van de ventrale en laterale zijde van de baarmoeder en de vagina. De vezelige hechting tussen de endeldarm en de vagina wordt losgemaakt tot de overgang van de vaginaopening naar de huid van het perineum kan worden geïdentificeerd. De baarmoeder en vagina worden losgemaakt van het lichaam door insnijding van de vaginawand net

▼M5

boven de overgang tussen de huid van het perineum, zie figuur 2. De baarmoeder moet losgemaakt worden van het lichaam door voorzichtig doorsnijden van het baarmoedermesenterium bij het bevestigingspunt ervan over de volle lengte van de dorsolaterale zijde van elke baarmoederhoorn. Na uitname uit het lichaam moet de baarmoeder snel genoeg worden verwerkt om uitdroging van de weefsels te voorkomen. Gewichtsverlies als gevolg van uitdroging wordt belangrijker bij kleinere weefsels zoals de baarmoeder (23). Indien eierstokken aanwezig zijn, worden deze verwijderd bij de eileider, waarbij moet worden voorkomen dat het luminale vocht uit de baarmoederhoorn lekt. Na ovariëctomie van het dier moeten de stompjes worden onderzocht op eventueel aanwezig eierstokweefsel. Overmatig vet en bindweefsel moeten worden weggesneden. De vagina wordt net onder de baarmoederhals verwijderd uit de baarmoeder, zodat de baarmoederhals bevestigd blijft aan het baarmoederlichaam, zie figuur 2.

46. Elke baarmoeder moet worden overgebracht in een gewogen houder met een unieke code (bv. een petrischaaltje of een kunststof weegschaaltje), waarbij er voortdurend op wordt gelet dat vóór het wegen geen uitdroging plaatsvindt (plaats bv. filterpapier dat enigszins is bevochtigd met zoutoplossing in de houder). De baarmoeder met luminaal vocht wordt gewogen op 0,1 mg nauwkeurig (nat baarmoedergewicht).

47. Elke baarmoeder wordt daarna apart verwerkt om het luminale vocht te verwijderen. Beide baarmoederhoornen worden doorboord of in de lengterichting ingesneden. De baarmoeder wordt op een licht bevochtigd filtreerpapier geplaatst (bv. Whatman nr. 3) en voorzichtig uitgedrukt met een twee stuk licht bevochtigd filtreerpapier om het luminale vocht volledig te verwijderen. De baarmoeder zonder luminale inhoud wordt gewogen op 0,1 mg nauwkeurig (gewicht van drooggedepte baarmoeder).

48. Het baarmoedergewicht aan het einde kan worden gebruikt om te controleren of de onvolgroeide intacte rat niet ouder was dan de passende leeftijd. De historische gegevens van de door het laboratorium gebruikte rattenstam zijn in dit opzicht echter doorslaggevend (zie punt 56 voor de interpretatie van de resultaten).

Facultatieve onderzoeken

49. Na het wegen kan de baarmoeder gefixeerd worden in 10 % neutraal gebufferd formaline voor histopathologisch onderzoek na haematoxyline-eosinekleuring (H&E-kleuring). De vagina kan dienovereenkomstig onderzocht worden (zie punt 9). Daarnaast kan ter kwantitatieve vergelijking morfometrische meting van het endometriumepitheel worden verricht.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

50. De onderzoeksgegevens moeten bestaan uit:

— het aantal dieren bij aanvang van de test,

— het aantal en de identiteit van de dieren die dood zijn aangetroffen tijdens de test of om humane redenen zijn gedood, samen met de datum en het tijdstip van sterfte of humane doding,

— het aantal en de identiteit van de dieren met verschijnselen van toxiciteit en een beschrijving van de waargenomen verschijnselen van toxiciteit, waaronder het tijdstip van ontstaan en de ernst van eventuele toxische effecten, en

— het aantal en de identiteit van de dieren met letsel en een beschrijving van het type letsel.

▼**M5**

51. Per dier moeten gegevens geregistreerd worden over het lichaamsgewicht en het gewicht van de natte en de drooggedepte baarmoeder. Er moet gebruikgemaakt worden van eenzijdige statistische analyses voor agonisten om te bepalen of de toediening van een teststof resulteerde in een statistisch significante ($p < 0,05$) toename van het baarmoedergewicht. Om te testen op behandelingsgerelateerde veranderingen in gewicht van de natte en de drooggedepte baarmoeder moeten passende statistische analyses worden gedaan. De gegevens kunnen bijvoorbeeld worden beoordeeld door middel van een analyse van covariantie (Ancova) met lichaamsgewicht bij de obductie als de covariabele. Voorafgaand aan de gegevensanalyse kan een variantie-stabiliserende logaritmische transformatie worden uitgevoerd met de baarmoedergegevens. De Dunnett- en Hsu-test zijn geschikt om van elke dosisgroep paarsgewijze vergelijkingen te maken met mediumcontroles en de betrouwbaarheidsintervallen te berekenen. Gestudentiseerde residuplots kunnen worden gebruikt om mogelijke uitschieters te detecteren en homogeniteit van variantie te beoordelen. Deze procedures werden toegepast bij het OESO-valideringsprogramma, waarbij gebruik werd gemaakt van het PROC GLM in het statistische analysesysteem (SAS Institute, Cary, NC), versie 8 (6)(7).

52. Een eindverslag moet bestaan uit:

Testinstelling:

— de verantwoordelijke medewerkers en hun verantwoordelijkheden met betrekking tot het onderzoek,

— gegevens van de positieve-controletest op baseline en gegevens van periodieke positieve controles (zie punten 26 en 27).

Teststof:

— karakterisering van teststoffen,

— fysische toestand en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen,

— methode en frequentie van de bereiding van verdunningen,

— alle gegenereerde gegevens over stabiliteit,

— alle analyses van doseeroplossingen.

Medium:

— karakterisering van testmedium (aard, leverancier en partij),

— motivering van de keuze van het medium (wanneer dat geen water is).

Proefdieren:

— soort en stam en motivering van de keuze ervan,

— leverancier en specifieke instelling van de leverancier,

— leeftijd bij levering met geboortedatum,

— bij onvolgroeide dieren: of het dier geleverd is met moederdier of pleegmoederdier en datum van spening,

— gedetailleerde gegevens over wijze van acclimatisering van het dier,

— aantal dieren per kooi,

— gegevens en methode van identificatie van individuele dieren en groepen.

Testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over randomiseringsproces (d.w.z. de gebruikte methode),

— motivering van de keuze van de dosis,

▼M5

— gedetailleerde gegevens over de formulering van de teststof, de bereikte concentraties ervan, stabiliteit en homogeniteit,

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof en motivering van de keuze van de blootstellingsweg,

— voer (naam, type, leverancier, samenstelling en, indien bekend, gehaltes aan fyto-oestrogenen),

— herkomst water (bv. kraanwater of gefiltreerd water) en toevoer (via een slang uit een grote tank, in flessen enz.),

— strooisel (naam, type, leverancier, samenstelling),

— registratie van kooiomstandigheden, lichtcyclus, kamertemperatuur en vochtigheid; reiniging van de ruimte,

— gedetailleerde beschrijving van obductie en procedures voor gewichtsbepaling van de baarmoeder,

— beschrijving van statistische procedures.

Resultaten

Voor elk dier:

— alle dagelijks gemeten individuele lichaamsgewichten (vanaf toewijzing aan groepen tot aan obductie) (op 0,1 g nauwkeurig),

— leeftijd van elk dier (in dagen, met geboortedag als dag 0) vanaf toediening van teststof,

— datum en tijdstip van elke toediening van een dosis,

— berekend volume en toegediende dosering en observaties van eventuele dosisverliezen tijdens of na toediening,

— dagelijkse registratie van de status van het dier, waaronder relevante symptomen en observaties,

— vermoedelijke doodsoorzaak (indien tijdens het onderzoek stervend of dood aangetroffen),

— datum en tijdstip van om humane redenen doden met tijdsduur tot laatste toediening,

— gewicht van natte baarmoeder (op 0,1 mg nauwkeurig) en eventuele observaties van verlies van luminaal vocht tijdens excisie en voorbereiding voor de gewichtsbepaling,

— gewicht drooggedepte baarmoeder (op 0,1 mg nauwkeurig).

Voor elke groep dieren:

— gemiddelde dagelijks gemeten lichaamsgewichten (op 0,1 g nauwkeurig) en standaarddeviaties (vanaf toewijzing aan groepen tot aan obductie),

— gemiddelde gewichten van natte en van drooggedepte baarmoeder (op 0,1 mg nauwkeurig) en standaarddeviaties,

— dagelijkse voerconsumptie (berekend als per dier geconsumeerd gram voer), indien gemeten,

▼M5

— de resultaten van statistische analyses waarbij het gewicht van natte en van drooggedepte baarmoeders van behandelde groepen wordt vergeleken met die van de mediumcontrolegroepen, die verder op dezelfde wijze zijn behandeld,

— de resultaten van statistische analyse waarbij het totale lichaamsgewicht en de toename in lichaamsgewicht van behandelde groepen wordt vergeleken met die van de mediumcontrolegroepen, die verder op dezelfde wijze zijn behandeld.

53. Samenvatting van belangrijke richtsnoeren van de testmethode

	Rat	**Muis**
Dieren		
Stam	Vaak gebruikte proefknaagdierstam	
Aantal dieren	Minimaal 6 dieren per dosisgroep	
Aantal groepen	Minimaal 2 testgroepen (zie punt 33 voor richtsnoeren) en een negatieve-controlegroep Zie punten 26 en 27 voor richtsnoeren over positieve-controlegroepen	
Huisvestings- en voedingsomstandigheden		
Temp. in verblijfsruimte	22 °C ± 3 °C	
Relatieve vochtigheid	50-60 % en niet lager dan 30 % of hoger dan 70 %	
Dagelijkse lichtcyclus	12 uur licht, 12 uur donker	
Voer en drinkwater	Ad libitum	
Huisvesting	individueel of in groepen van maximaal drie dieren (voor onvolgroeide dieren wordt sociale groepshuisvesting aanbevolen)	
Voer en strooisel	In voer en strooisel wordt een laag gehalte aan fyto-oestrogenen aanbevolen	
Protocol		
Methode	Onvolgroeid-methode (d.w.z. geen ovariëctomie, verdient de voorkeur) Ovx-volwassen-methode (met vrouwtjes die ovariëctomie hebben ondergaan)	Ovx-volwassen-methode (met vrouwtjes die ovariëctomie hebben ondergaan)
Toedieningsleeftijd voor onvolgroeide dieren	Op z'n vroegst op PND 18 Toediening moet worden afgerond vóór PND 25	Niet relevant in het kader van de huidige testmethode
Leeftijd van ovariëctomie	Tussen 6 en acht weken oud	
Toedieningsleeftijd voor dieren die ovariëctomie hebben ondergaan	Tussen de ovariëctomie en de eerste toedieningsdag moet een tussenpoos van minimaal 14 dagen worden aangehouden.	Tussen de ovariëctomie en de eerste toedieningsdag moet een tussenpoos van minimaal zeven dagen worden aangehouden.
Lichaamsgewicht	Het lichaamsgewicht mag slechts minimaal en niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.	

▼M5

	Rat	Muis
Toediening		
Toedieningsweg	Orale maagsonde of subcutane injectie	
Toedieningsfrequentie	Dagelijks een enkele dosis	
Volume voor sonde en injectie	≤ 5 ml/kg lichaamsgewicht (of maximaal 10 ml/kg lichaamsgewicht in geval van waterige oplossingen) (in 2 injectieplaatsen voor de subcutane weg)	
Toedieningsduur	3 opeenvolgende dagen voor onvolgroeid-model Minimaal 3 opeenvolgende dagen voor het ovx-model	7 opeenvolgende dagen voor het ovx-model
Tijdstip van obductie	Ongeveer 24 uur na de laatste dosis	
Resultaten		
Positieve respons	Statistisch significante toename van het gemiddelde baarmoedergewicht (nat en/of drooggedept)	
Referentieoestrogeen	17α-ethinylestradiol	

RICHTSNOEREN VOOR DE INTERPRETATIE EN ACCEPTATIE VAN DE RESULTATEN

54. In het algemeen moet een test op oestrogene werking worden beschouwd als positief als er ten minste bij het hoge dosisniveau een statistisch significante ($p < 0,05$) toename van het baarmoedergewicht is ten opzichte van de oplosmiddelcontrolegroep. Een positief resultaat wordt verder ondersteund door bewijs van een vanuit biologisch oogpunt aannemelijk verband tussen de dosis en de grootte van de respons, daarbij rekening houdend met het feit dat overlappende oestrogene en anti-oestrogene activiteiten van de teststof van invloed kunnen zijn op de vorm van de dosis-responscurve.

55. Om de gegevens op betekenisvolle wijze te kunnen interpreteren moet erop worden toegezien de maximaal aanvaardbare dosis niet te overschrijden. Afname van lichaamsgewicht, klinische verschijnselen en andere bevindingen moeten met het oog daarop grondig worden beoordeeld.

56. Een belangrijke overweging voor de acceptatie van de gegevens van de uterotrofe bioassay zijn de baarmoedergewichten van de mediumcontrolegroep. Hoge controlewaarden kunnen het responsvermogen van de bioassay en het vermogen om zeer zwakke oestrogeenagonisten te detecteren negatief beïnvloeden. Overzichtsartikelen en de gegevens die zijn verkregen tijdens de validering van de uterotrofe bioassay, wijzen erop dat gevallen van hoge controlegemiddelden niet spontaan optreden, in het bijzonder bij onvolgroeide dieren (2)(3)(6)(9). Omdat het baarmoedergewicht van onvolgroeide ratten afhankelijk is van veel variabelen, zoals stam of lichaamsgewicht, kan er geen beslissende bovengrens voor het baarmoedergewicht worden gegeven. Als richtsnoer moeten resultaten als verdacht worden beschouwd als gewichten van drooggedepte baarmoeders bij onvolgroeide controleratten tussen 40 en 45 mg liggen, en baarmoedergewichten van meer dan 45 mg kunnen een reden zijn de test opnieuw te doen. Dit moet echter per geval worden bekeken (3)(6)(8). Als volwassen ratten worden getest waarbij onvolledige ovariëctomie heeft plaatsgevonden, blijft er eierstokweefsel achter dat endogeen oestrogeen kan produceren en de regressie van het baarmoedergewicht kan vertragen.

▼**M5**

57. Gewichten van drooggedepte baarmoeders in een mediumcontrolegroep die minder dan 0,09 % van het lichaamsgewicht uitmaken voor onvolgroeide vrouwelijke ratten en minder dan 0,04 % voor jongvolwassen vrouwtjes die ovariëctomie hebben ondergaan, lijken aanvaardbare resultaten te geven (zie tabel 31 (2)). Als de procentuele baarmoedergewichten in de controlegroep hoger zijn dan de bovengenoemde percentages, moeten verscheidene factoren nader onderzocht worden, waaronder de leeftijd van de dieren, correcte uitvoering van de ovariëctomie, fyto-oestrogenen in voer enz., en moet een negatief testresultaat (geen aanwijzingen voor oestrogene activiteit) met voorzichtigheid worden gebruikt.

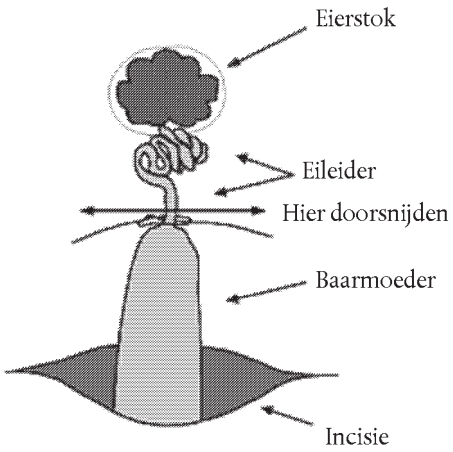
58. Historische gegevens voor mediumcontrolegroepen moeten in het laboratorium worden behouden. Historische gegevens voor responsen op positieve referentieoestrogenen, zoals 17a-ethinylestradiol, moeten eveneens in het laboratorium worden behouden. Laboratoria kunnen ook de respons op bekende zwakke oestrogeenagonisten testen. Al deze gegevens kunnen worden vergeleken met beschikbare gegevens (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) om te controleren of de door het laboratorium toegepaste methoden voldoende gevoelig zijn.

59. De gewichten van drooggedepte baarmoeders vertoonden minder variabiliteit in de loop van het OESO-valideringsonderzoek dan de gewichten van de natte baarmoeders (6)(7). Een significante respons in een van beide testen wijst er echter op dat de teststof positief is voor oestrogene activiteit.

60. Hoewel de uterotrofe respons niet geheel van oestrogene oorsprong is, moet een positief resultaat van de uterotrofe bioassay doorgaans geïnterpreteerd worden als een aanwijzing voor mogelijke oestrogene activiteit in vivo en moet op basis hiervan actie worden ondernomen om meer duidelijkheid te verschaffen (zie punt 9 en het „Conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen", aanhangsel 2).

Figuur 1

Schematisch diagram van de operatieve verwijdering van de eierstokken



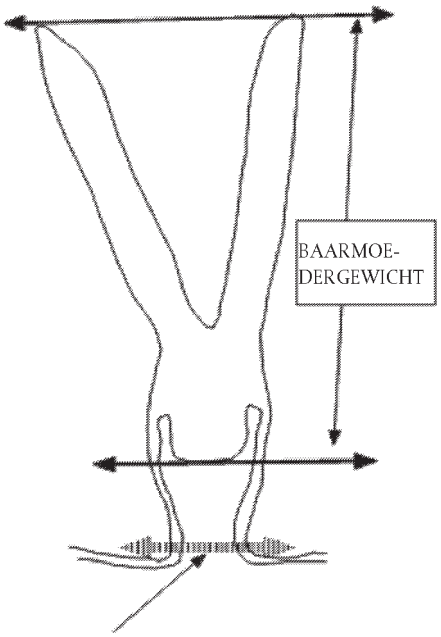
Mesometrium, vasculatuur en vetkwab worden niet getoond

De ingreep begint met het openen van de dorso-laterale buikwand op het middelpunt tussen de inferiore ribgrens en de darmbeenkam (crista iliaca), en enkele millimeters lateraal aan de laterale marge van de lumbale spier. De eierstokken bevinden zich in de buikholte. Op een aseptisch vlak worden de eierstokken vervolgens fysiek verwijderd uit de buikholte: er wordt een ligatuur geplaatst tussen de eierstok en de baarmoeder om bloedingen onder controle te houden en de eierstok wordt losgemaakt door middel van een incisie boven de ligatuur bij de verbinding van de eileider met elke baarmoederhoorn. Nadat is vastgesteld dat er geen grote bloedingen meer zijn, moet de buikwand worden gesloten met een hechting en de huid worden gesloten met bv. nietjes of hechtdraad. Men moet de dieren laten herstellen en het baarmoedergewicht gedurende minimaal 14 dagen vóór gebruik de tijd geven voor regressie.

▼**M5**

Figuur 2

De verwijdering en voorbereiding van de baarmoederweefsels voor de gewichtsbepaling



De ingreep begint met het openen van de buikwand bij de symphysis pubica. Daarna worden elke eierstok, indien aanwezig, en de baarmoederhoorn losgemaakt van de dorsale buikwand. De blaas en urineleiders worden weggenomen van de ventrale en laterale zijde van de baarmoeder en de vagina. De vezelige hechting tussen de endeldarm en de vagina wordt losgemaakt tot de overgang van de vaginaopening naar de huid van het perineum kan worden geïdentificeerd. De baarmoeder en vagina worden losgemaakt van het lichaam door insnijding van de vaginawand net boven de overgang tussen de huid van het perineum, zie figuur. De baarmoeder moet losgemaakt worden van het lichaam door voorzichtig doorsnijden van het baarmoedermesenterium bij het bevestigingspunt ervan over de volle lengte van de dorsolaterale zijde van elke baarmoederhoorn. Na uitname uit het lichaam wordt het overmatige vet en bindweefsel weggesneden. Indien eierstokken aanwezig zijn, worden deze verwijderd bij de eileider, waarbij moet worden voorkomen dat het luminale vocht uit de baarmoederhoorn lekt. Na ovariëctomie van het dier moeten de stompjes worden onderzocht op eventueel aanwezig eierstokweefsel. De vagina wordt net onder de baarmoederhals verwijderd uit de baarmoeder, zodat de baarmoederhals bevestigd blijft aan het baarmoederlichaam, zie figuur. De baarmoeder kan dan worden gewogen.

▼M5

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Anti-oestrogene werking is het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme de werking van 17b-estradiol te onderdrukken.

Stof betekent een stof of mengsel.

Geboortedatum is postnatale dag 0.

Dosering is een algemene term die de dosis, de frequentie en de duur van de toediening omvat.

Dosis isde toegediende hoeveelheid teststof. Voor de uterotrofe bioassay wordt de dosis uitgedrukt als gewicht van de teststof per eenheid lichaamsgewicht van het proefdier per dag (bv. mg/kg lichaamsgewicht/dag).

Maximaal verdraagbare dosis (MTD) is de grootste hoeveelheid van een stof die bij inbrenging in het lichaam geen proefdieren doodt (aangeduid als LD_0) (IUPAC, 1993).

Oestrogene werking is het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme als 17b-estradiol te werken.

Postnatale dag x is de x'e levensdag na de geboortedag.

Gevoeligheid is het deel van alle positieve/werkzame stoffen dat door de test op correcte wijze wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categorale resultaten oplevert, en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een testmethode.

Specificiteit is het deel van alle negatieve/niet-werkzame stoffen dat door de test op correcte wijze wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categorale resultaten oplevert, en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een testmethode.

Teststof betekentalle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Uterotroof is een term waarmee een positieve invloed op de groei van baarmoederweefsels wordt beschreven.

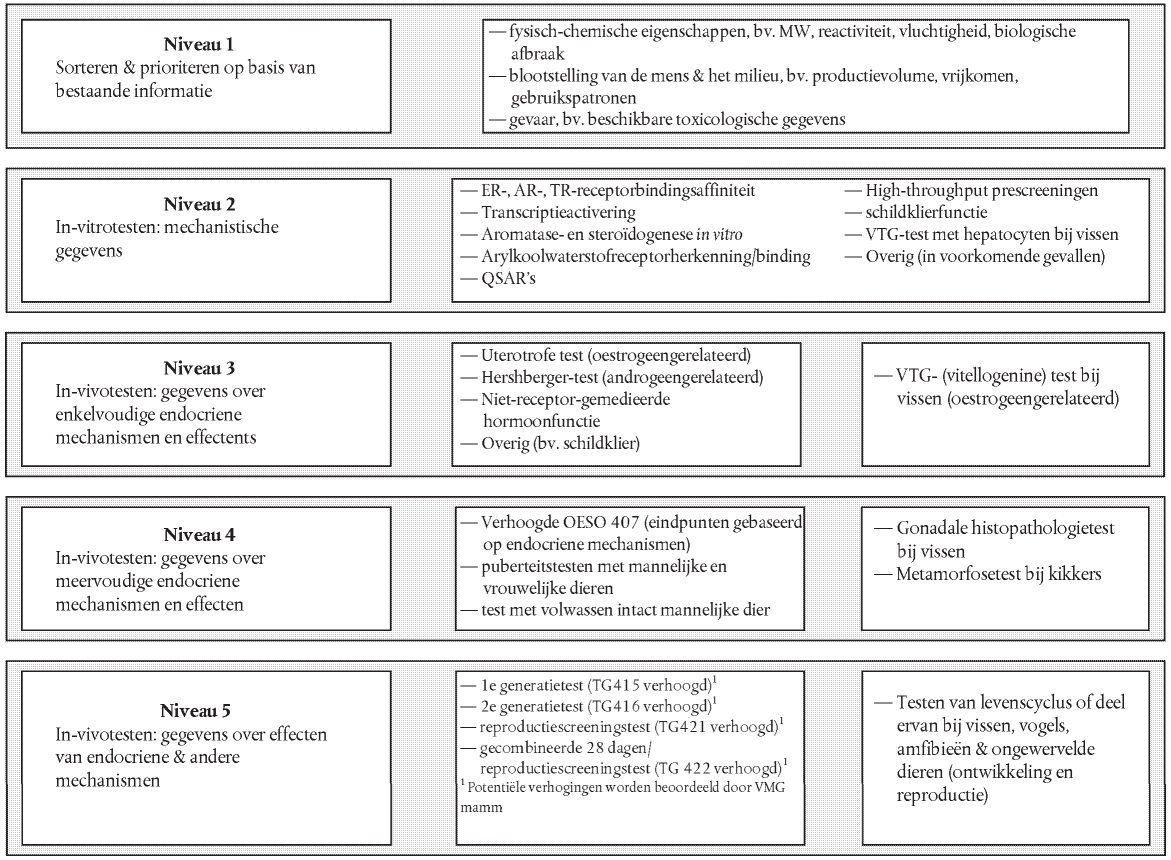
Validering is een wetenschappelijke methode die erop gericht is om de operationele vereisten en beperkingen van een testmethode te beschrijven en de betrouwbaarheid en relevantie ervan voor een bepaald doel aan te tonen.

▼M5

Aanhangsel 2

Noot: Document opgesteld door het Secretariaat van het testrichtlijnprogramma uit hoofde van de overeenkomst die werd bereikt op de 6e bijeenkomst van de EDTA Task Force

Conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 866

▼**M5**

OPMERKINGEN BIJ HET KADER

Opmerking 1: het is mogelijk om op alle niveaus in- en uit te stappen. Dit hangt af van de soort informatie waaraan behoefte bestaat voor gevaar- en risicobeoordelingsdoeleinden.

Opmerking 2: in niveau 5 moet de ecotoxicologie eindpunten omvatten die duiden op mechanismen van schadelijke effecten en potentiële schade voor de populatie.

Opmerking 3: als een multimodaal model enkele van de testen met een enkel eindpunt omvat, vervangt dat model het gebruik van deze testen met een enkel eindpunt.

Opmerking 4: de beoordeling van elke stof moet per geval plaatsvinden, rekening houdend met alle beschikbare informatie en de functie van de niveaus van het kader.

Opmerking 5: het kader moet op dit moment niet worden beschouwd als alomvattend. Op niveaus 3, 4 en 5 voorziet het kader in testen die al beschikbaar zijn of waarvan de validering nog loopt. De laatstgenoemde testen zijn daarom als voorlopig opgenomen. Na de ontwikkeling en validering ervan worden deze testen formeel toegevoegd aan het kader.

Opmerking 6: niveau 5 moet niet worden beschouwd als een niveau dat alleen beslissende testen omvat. De in dat niveau opgenomen testen worden beschouwd als bij te dragen aan de algemene gevaar- en risicobeoordeling.

▼M5

LITERATUUR

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

2. OESO (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. OESO (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. OESO (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}]iodeoxyuridine. 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. OESO (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. OESO (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

25. OESO (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. OESO (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

27. Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320-333.

28. Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33-41.

29. Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288-305.

30. Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284-291.

31. OESO (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Parijs.

32. Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

33. Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

▼**M5**

34. Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

35. Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

36. Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

37. OESO (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

38. Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33).

▼M5

B.55. **HERSHBERGER-BIOASSAY BIJ RATTEN: EEN KORTLOPENDE SCREENINGSTEST OP (ANTI)ANDROGENE EIGENSCHAPPEN**

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 441 (2009) van de OESO. In 1998 is de OESO een actie gestart om bestaande richtlijnen te herzien en nieuwe richtlijnen te ontwikkelen voor het screenen op en testen van potentiële hormoonontregelaars (1), en heeft zij daaraan een hoge prioriteit toegekend. Een onderdeel van deze actie was het ontwikkelen van een testrichtlijn voor de Hershberger-bioassay bij ratten. Na enkele decennia gebruik in de farmaceutische industrie werd deze assay voor het eerst in 1962 gestandaardiseerd door een officiële commissie van deskundigen als screening op androgene stoffen (2). Van 2001-2007 heeft de Hershberger-bioassay bij de rat een uitgebreid valideringsprogramma ondergaan waaronder de samenstelling van een Background Review Document (23), samenstelling van een gedetailleerd document over methoden (3), ontwikkeling van een gids voor sectie (21) en de uitvoering van uitgebreide studies binnen en tussen laboratoria om de betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid van de bioassay aan te tonen. Deze valideringsstudies werden verricht met een krachtig referentieandrogeen (testosteronpropionaat (TP)), twee krachtige synthetische androgenen (trenbolonacetaat en methyltestosteron), een krachtig antiandrogeen farmaceuticum (flutamide), een krachtige remmer van de synthese (finasteride) van het natuurlijke androgeen (dihydrotestosteron-DHT), verschillende zwak antiandrogene pesticiden (linuron, vinclozoline, procymidon, p,p' DDE), een krachtige 5a-reductaseremmer (finasteride) en twee bekende negatieve stoffen (dinitrofenol en nonylfenol) (4) (5) (6) (7) (8). Deze testmethode is het resultaat van de langdurige ervaring met de bioassay en de ervaring die is opgedaan tijdens het valideringstestprogramma en de daarbij verkregen resultaten.

2. De Hershberger-bioassay is een kortlopende in-vivoscreeningstest op weefsel van de mannelijke secundaire geslachtsorganen. De bepaling is oorspronkelijk ontwikkeld in de jaren 1930; na aanpassing in de jaren 1940 konden ook op androgenen reagerende spieren uit de mannelijke geslachtsorganen worden gebruikt. (2) (9-15). In de jaren 1960 werden meer dan 700 mogelijke androgenen beoordeeld aan de hand van de gestandaardiseerde versie van het protocol (2) (14), en gebruik van de bepaling voor zowel androgenen als antiandrogenen werd in de jaren 1960 als standaard beschouwd (2) (15). De huidige bioassay is gebaseerd op de veranderingen in gewicht van vijf androgeenafhankelijke weefsels bij de gecastreerde peripuberale mannetjesrat. Aan de hand van de bepaling wordt het vermogen van de stof beoordeeld om biologische activiteiten teweeg te brengen die overeenkomen met androgeenagonisten, -antagonisten of 5a-reductaseremmers. De vijf androgeen-afhankelijke doelweefsels bij deze testmethode zijn ventrale prostaat (VP), zaadblaasje (seminal vesicle — SV) (plus vloeistoffen en coagulans uitscheidende klieren), m.levator ani-bulbocavernosus (LABC), paarsgewijze Cowperse klieren (COW) en de glans penis (GP). Bij de gecastreerde peripuberale mannetjesrat reageren al deze vijf weefsels op androgenen met een toename in absoluut gewicht. Als deze zelfde weefsels gestimuleerd worden om zwaarder te worden door toediening van een krachtig referentieandrogeen, reageren deze vijf weefsels alle op antiandrogenen met een afname in absoluut gewicht. Het primaire model voor de Hershberger-bioassay is het chirurgisch gecastreerde peripuberale mannetjesdier, dat in fasen 1, 2 en 3 van het Hershberger-valideringsprogramma gevalideerd is.

3. De Hershberger-bioassay dient als een mechanistische in-vivoscreeningstest voor androgeenagonisten, androgeenantagonisten en 5a-reductaseremmers en de toepassing ervan moet worden gezien in de context van het „Conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen”, aanhangsel 2). In dit conceptuele kader bevindt de Hershberger-bioassay zich op niveau 3 als een in-vivobepalingdie gegevens oplevert over één endocrien mechanisme, te weten (anti)androgeniteit. De

▼M5

bedoeling is dat de assay wordt opgenomen in een reeks in-vitro- en in-vivotesten voor de identificatie van stoffen die mogelijk interactie vertonen met het hormoonsysteem, op basis waarvan uiteindelijk beoordelingen van het gevaar en het risico voor de gezondheid van de mens of het milieu tot stand komen.

4. Vanwege zorgen om dierwelzijn bij de castratieprocedure werd gestreefd naar een alternatief model voor de Hershberger-bioassay met het intact (ongecastreerd) gestimuleerd, pas gespeend mannetjesdier om de castratiestap te kunnen vermijden. De testmethode met het gestimuleerd pas gespeend mannetjesdier werd gevalideerd (24); maar in de valideringsstudies leek de versie met het gespeende dier van de Hershberger-bioassay niet in staat te zijn om effecten van zwakke antiandrogenen op het gewicht van androgeenafhankelijke organen bij de onderzochte doses consistent te detecteren. Daarom is deze niet in deze testmethode opgenomen. Omdat de toepassing ervan echter niet alleen het dierwelzijn ten goede kan komen maar ook informatie kan opleveren over andere werkingsmechanismen, is deze beschikbaar in OESO-leidraad nr. 115 (25).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

5. Androgeenagonisten en -antagonisten fungeren als liganden voor de androgeenreceptor en kunnen de door de receptor gestuurde gentranscriptie activeren resp. remmen. Daarnaast remmen sommige stoffen in bepaalde androgene doelweefsels de omzetting van testosteron in het krachtigere natuurlijke androgeen dihydrotestosteron (5a-reductaseremmers). Deze stoffen kunnen gevaar voor de gezondheid opleveren, waaronder effecten op de voortplanting en de ontwikkeling. Er bestaat daarom behoefte aan een snelle methode om een stof te beoordelen en te evalueren als een mogelijke androgeenagonist of -antagonist of 5a-reductaseremmer. Hoewel de affiniteit van een ligand voor een androgeenreceptor, gemeten door receptorbinding of transcriptionele activatie van reportergenen in vitro wel informatief is, is het niet de enige determinant van mogelijk gevaar. Andere determinanten zijn metabole activatie en deactivatie als het in het lichaam komt, chemische verdeling naar doelweefsels, en klaring uit het lichaam. Daarom moet de mogelijke activiteit van een stof in vivo onder relevante omstandigheden en blootstelling worden gescreend. Beoordeling in vivo is minder essentieel als de kenmerken van de stof voor wat betreft absorptie, distributie, metabolisme en eliminatie (ADME) bekend zijn. Androgeenafhankelijke weefsels reageren op stimulering door androgenen met een snelle en krachtige groei, vooral bij gecastreerde peripuberale mannetjesratten. Knaagdiersoorten, in het bijzonder de rat, worden bovendien veel gebruikt in toxiciteitsonderzoeken naar karakterisering van gevaren. Daarom zijn de bepaling met de gecastreerde peripuberale rat en de vijf doelweefsels van deze bepaling geschikt voor de screening in vivoop androgeenagonisten en -antagonisten en 5a-reductaseremmers.

6. Deze testmethode is gebaseerd op de protocols die in de OESO-valideringsstudie zijn gebruikt waarvan is aangetoond dat zij in studies binnen en tussen laboratoria betrouwbaar en reproduceerbaaar zijn (4)(5)(6)(7)(8). In deze testmethode worden procedures voor zowel androgenen als antiandrogenen gepresenteerd.

7. Hoewel er tussen de verschillende laboratoria enige variatie was in de gebruikte dosis TP om antiandrogenen in het Hershberger Bioassay-valideringsprogramma van de OESO te detecteren (0,2 versus 0,4 mg/kg/d, subcutane injectie), was er weinig verschil tussen deze twee protocolvarianten in het vermogen om zwakke of sterke antiandrogene activiteit te detecteren. Het is evenwel duidelijk dat de dosis TP niet zo hoog mag zijn dat de effecten van zwakke androgeenreceptor (AR)-antagonisten worden geblokkeerd of zo laag dat de androgene weefsels een geringe groeirespons vertonen, zelfs zonder gelijktijdige toediening van antiandrogenen.

▼M5

8. De groeirespons van de individuele androgeenafhankelijke weefsels is niet geheel van androgene oorsprong; stoffen anders dan androgeenagonisten kunnen ook het gewicht van bepaalde weefsels veranderen. Maar de groeirespons van verschillende weefsels tegelijkertijd vormt bewijs voor een meer androgeenspecifiek mechanisme. Zo kunnen hoge doses van krachtige oestrogenen het gewicht van de zaadblaasjes verhogen, zonder dat de andere androgeenafhankelijke weefsels in de bepaling op soortgelijke wijze reageren. Antiandrogene stoffen kunnen als androgeenreceptorantagonist of 5a-reductaseremmer fungeren. 5a-reductaseremmers hebben een variabel effect omdat de omzetting in het krachtigere dihydrotestosteron per weefsel verschilt. Antiandrogenen die 5a reductase remmen, zoals finasteride, hebben een meer uitgesproken effect in de ventrale prostaat dan andere weefsels in vergelijking met een krachtige AR-antagonist, zoals flutamide. Dit verschil in weefselrespons kan worden gebruikt om te differentiëren tussen door AR en 5a — reductase gemedieerde werkingsmechanismen. Daarnaast is de androgeenreceptor evolutionair gerelateerd aan de receptor van andere steroïdhormonen; sommige andere hormonen kunnen zich bij toediening in hoge, suprafysiologische doseringen binden aan TP en de groeibevorderende effecten ervan antagoneren (13). Bovendien is het plausibel dat een verhoogd steroïdmetabolisme en een daaropvolgende verlaging van het serumtestosteron de groei van androgeenafhankelijke weefsels kan verminderen. Daarom moet een positief resultaat van de Hershberger-bioassay normaliter worden beoordeeld op basis van gewicht van bewijs, zoals uit bepalingen in vitro, zoals de AR- en estrogeenreceptor (ER)-bindingsassays en corresponderende transcriptionele activatieassays, of uit andere bepalingen in vivo die soortgelijke androgene doelweefsels onderzoeken, zoals de male pubertal assay, 15-day intact adult male assay, of 28-day of 90-day repeat dose studies.

9. De ervaring leert dat xenobiotische androgenen zeldzamer zijn dan xenobiotische antiandrogenen. De verwachting is dan dat de Hershberger-bioassay het meest wordt gebruikt voor de screening op antiandrogenen. Niettemin kan de procedure om op androgenen te testen eventueel worden aanbevolen voor steroïde of steroïd-achtige stoffen of voor stoffen waarvoor een indicatie van een mogelijk androgeen effect verkregen is uit methoden in niveau 1 of 2 van het conceptuele kader (aanhangsel 2). Zo ook kunnen bij bepalingen in niveau 5 bijwerkingen in samenhang met (anti)androgene profielen worden waargenomen, waardoor het nodig is om te beoordelen of een stof via een endrocrien werkingsmechanisme werkt.

10. Erkend wordt dat alle procedures waarbij dieren worden gebruikt, aan de plaatselijke normen voor de verzorging van dieren moeten voldoen; de hieronder beschreven zorg en behandeling zijn minimale normen en zijn ondergeschikt aan lokale regelgeving zoals Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (26). De OESO heeft nadere richtsnoeren voor de humane behandeling van dieren opgesteld (17).

11. Zoals geldt voor elke bioassay bij proefdieren, moet de noodzaak van de uitvoering van dit onderzoek zorgvuldig worden overwogen. In basis kunnen er twee redenen voor een dergelijk besluit zijn:

— hoge potentiële blootstelling (niveau 1 van het conceptueel kader) of aanwijzingen voor (anti)androgeniteit in bepalingen in vitro (niveau 2) die onderzoek rechtvaardigen of dergelijke effecten ook in vivo kunnen optreden,

— effecten die passen bij (anti)androgeniteit bij niveau 4- of 5-tests in vivo die onderzoek naar het specifieke werkingsmechanisme rechtvaardigen, bijvoorbeeld om vast te stellen of de effecten het gevolg waren van een (anti)androgeen mechanisme.

▼M5

12. De in deze testmethode gebruikte definities staan in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

13. De Hershberger-bioassay verkrijgt haar gevoeligheid door mannetjesdieren te gebruiken met minimale androgeenproductie. Dit wordt bereikt door gebruik van gecastreerde mannetjesdieren mits voldoende tijd na castratie wordt gelaten zodat de doelweefsels kunnen afnemen naar een minimaal en uniform baselinegewicht. Als dan bij screening op mogelijke androgene activiteit er lage endogene concentraties circulerende androgenen zijn, wordt de hypothalamus-hypofyse-gonadeas weerhouden om te compenseren via een terugkoppelingsmechanisme, is het vermogen van de weefsels om te reageren maximaal, en is de variabiliteit in weefselgewicht bij aanvang minimaal. Bij screening op mogelijke antiandrogene activiteit kan een consistente toename in weefselgewicht worden bereikt als de weefsels worden gestimuleerd door een referentieandrogeen. Daarom vereist de Hershberger-bioassay slechts 6 dieren per dosisgroep terwijl andere bepalingen met intacte puberale of volwassen mannetjesdieren vaak 15 mannetjesdieren per dosisgroep gebruiken.

14. Castratie van peripuberale mannetjesratten moet op passende wijze plaatsvinden met goedgekeurde anesthetica en aseptische techniek. Gedurende de eerste paar dagen na chirurgie moeten pijnstillers worden toegediend om postchirurgische pijn te elimineren. Castratie verhoogt de precisie waarmee de bepaling zwakke androgenen en antiandrogenen detecteert door compensatoire endocriene terugkoppelingsmechanismen te elimineren die in het intacte dier aanwezig zijn en die de effecten van toegediende androgenen en antiandrogenen kunnen afzwakken, en door de grote interindividuele variabiliteit in het serumtestosteron te elimineren. Daardoor wordt het aantal benodigde dieren voor screening op deze endocriene activiteiten door castratie verminderd.

15. Bij screening op mogelijke androgene activiteit wordt de teststof dagelijks via een maagsonde of subcutane (sc) injectie toegediend gedurende een periode van tien opeenvolgende dagen. Teststoffen worden toegediend aan minimaal twee behandelingsgroepen met proefdieren met één doseringsniveau per groep. Ongeveer 24 uur na de laatste dosis wordt obductie verricht op de dieren. Een statistisch significante verhoging in twee of meer doelorgaangewichten in de teststofgroep in vergelijking met de mediumcontrolegroep wijst erop dat de teststof positief is voor mogelijk androgene activiteit (zie paragraaf 60). Androgenen zoals trenbolon waarbij 5a-reductie niet kan plaatsvinden, hebben een meer uitgesproken effect op de LABC en GP dan TP, maar alle weefsels moeten meer groei vertonen.

16. Bij de screening op mogelijke antiandrogene activiteit wordt de teststof dagelijks toegediend via maagsonde of subcutane injectie gedurende een periode van tien opeenvolgende dagen samen met dagelijkse doses TP (0,2 of 0,4 mg/kg/d) per sc injectie. In het valideringsprogramma is vastgesteld dat hetzij 0,2 hetzij 0,4 mg/kg/d TP gebruikt kan worden, omdat beide effectief waren voor het detecteren van antiandrogenen; daarom moet voor de bepaling slechts één dosis worden geselecteerd. Trapsgewijs stijgende doses van de teststof worden toegediend aan minimaal drie behandelingsgroepen met proefdieren met één dosisniveau per groep. Ongeveer 24 uur na de laatste dosis wordt obductie verricht op de dieren. Een statistisch significante afname in twee of meer doelorgaangewichten in de groepen met de teststof en TP in vergelijking met de controlegroep met TP alleen wijst erop dat de teststof positief is voor mogelijke antiandrogene activiteit (zie paragraaf 61).

▼M5

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Selectie van diersoort en stam

17. Sinds de jaren 1930 wordt de rat standaard gebruikt in de Hershberger-bioassay. Hoewel het biologisch plausibel is dat zowel de rat als de muis soortgelijke responsen zouden vertonen, is op basis van 70 jaar ervaring met het rattenmodel de rat de geprefereerde diersoort voor de Hershberger-bioassay. Daarnaast, omdat gegevens uit de Hershberger-bioassay aan de basis kunnen staan van een langdurig multigenerationeel onderzoek, is het op deze manier mogelijk om dieren uit dezelfde diersoort, stam en bron te gebruiken in beide studies.

18. In dit protocol kunnen laboratoria de in de bepaling te gebruiken rattenstam selecteren, welke over het algemeen de stam moet zijn die meestal door het deelnemende laboratorium wordt gebruikt. Veel in het laboratorium gebruikte rattenstammen kunnen worden gebruikt; maar stammen die aanmerkelijk later dan na 42 dagen volwassen worden mogen niet worden gebruikt omdat bij castratie van deze mannetjesdieren op een leeftijd van 42 dagen mogelijk niet het gewicht van de glans penis gemeten kan worden, wat alleen kan worden gedaan nadat de voorhuid van de penisschacht teruggetrokken is. Daarom mogen stammen die zijn verkregen uit de Fisher 344-rat, niet worden gebruikt, behalve in uitzonderlijke gevallen. De Fisher 344-rat heeft een ander tijdsverloop van de seksuele ontwikkeling dan andere vaker gebruikte stammen zoals Sprague Dawley- of Wistar-stammen (16). Als een dergelijke stam gebruikt gaat worden, moet het laboratorium deze op iets hogere leeftijd castreren en de gevoeligheid van de te gebruiken stam kunnen aantonen. Het laboratorium moet een heldere motivering voor de keuze van de rattenstam kunnen geven. Waar de screeningstest vooraf kan gaan aan een onderzoek met herhaalde orale doses, een voortplantings- en ontwikkelingsonderzoek, of een langdurig onderzoek, moeten in alle onderzoeken bij voorkeur dieren uit dezelfde stam en bron worden gebruikt.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

19. Alle procedures moeten in overeenstemming zijn met alle plaatselijke normen voor de verzorging van proefdieren. Deze beschrijvingen van de verzorging en behandeling zijn minimumnormen, die ondergeschikt zijn aan striktere lokale regelgeving zoals Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (26). De temperatuur in de proefdierruimte dient 22 °C te zijn (met een spreiding van ± 3 °C). De relatieve luchtvochtigheid moet minimaal 30 % zijn en bij voorkeur niet hoger zijn dan 70 %, behalve bij reiniging van de ruimte. Er moet worden gestreefd naar een relatieve vochtigheid van 50-60 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht, met een dagelijkse lichtcyclus van 12 uur licht en 12 uur donker.

20. De dieren samen onderbrengen is te verkiezen boven isolatie gezien de jonge leeftijd van de dieren en het feit dat de ratten sociale dieren zijn. Met twee of drie dieren per kooi wordt overbevolking en daarmee samenhangende stress voorkomen die de hormonale controle van de ontwikkeling van de weefsels van de secundaire geslachtsorganen kan verstoren. De kooien worden grondig gereinigd om eventuele verontreinigingen te verwijderen en zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Met kooien van adequate omvang (~2 000 vierkante centimeter) wordt overbevolking voorkomen.

21. Elk dier moet door middel van een humane methode individueel geïdentificeerd worden (bv. oormerk of identificatieplaatje). De identificatiemethode moet worden vastgelegd.

▼M5

22. Proefdiervoer en drinkwater moeten ad libitum worden verstrekt. Laboratoria die de Hershberger-bioassay uitvoeren moeten het laboratoriumvoer gebruiken dat zij normaliter in hun onderzoek van stoffen gebruiken. In de valideringsstudies van de bioassay werden geen effecten of variabiliteit waargenomen die aan het voer waren toe te schrijven. Het gebruikte voer wordt vastgelegd en een monster van het laboratoriumvoer moet worden bewaard voor eventuele analyse in de toekomst.

Prestatiecriteria voor androgeenafhankelijk orgaangewicht

23. Tijdens de valideringsstudie waren er geen aanwijzingen dat de afname van het lichaamsgewicht van invloed was op toename of afname van de groei van het gewicht van doelweefsels (d.w.z. die in dit onderzoek gewogen moeten worden)).

24. Bij de verschillende rattenstammen die met succes in het valideringsprogramma zijn gebruikt, is het androgeenafhankelijke orgaangewicht bij de zwaardere rattenstammen hoger dan bij de lichtere stammen. Daarom wordt in de prestatiecriteria van de Hershberger-bioassay geen absoluut verwacht orgaangewicht genoemd voor positieve en negatieve controles.

25. Omdat het Variatiecoëfficiënt (CV) van een weefsel een omgekeerde evenredigheid vertoont met statistisch onderscheidingsvermogen, zijn de prestatiecriteria voor de Hershberger-bioassay gebaseerd op maximale CV-waarden voor elk weefsel (tabel 1). De CV's zijn verkregen uit de OESO-valideringsstudies. In het geval van negatieve resultaten moeten laboratoria de CV's voor de controlegroep en de met de hoge doses behandelde groep onderzoeken om vast te stellen of de maximale CV-prestatiecriteria overschreden zijn.

26. Het onderzoek wordt herhaald als: 1) drie of meer van de tien mogelijke individuele CV's in de controlegroep en de met de hoge doses behandelde groep de maxima te boven gaan die voor agonisten- en antagonistenstudies zijn vastgesteld in tabel 1, en 2) minstens twee doelweefsels marginaal insignificant zijn, dat wil zeggen p-waarden tussen 0,05 en 0,10.

Tabel 1

Maximaal toegestane CV's vastgesteld voor doelweefsels van secundaire geslachtsorganen voor het castraatmodel in de OESO-valideringsstudies ([1]).

Weefsel	Antiandrogene effecten	Androgene effecten
Zaadblaasjes	40 %	40 %
Ventrale prostaat	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowperse klieren	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

([1]) De drempel-CV voor een gegeven weefsel werd vastgesteld op basis van de grafiek van CV-waarden — gerangschikt van laagste opeenvolgend naar hoogste — voor alle gemiddelden uit alle experimenten in de validering met gebruikmaking van een specifiek model (agonist of antagonist). De drempel-CV werd afgelezen vanaf het punt waarbij de tussenliggende stappen naar de volgende hoogste CV's in de serie aanzienlijk groter zijn dan de voorgaande paar CV's- het „breekpunt". Hier zij opgemerkt dat, hoewel deze analyse relatief betrouwbare „breekpunten" identificeerde voor het antagonistmodel van de bepaling, CV-curves voor de agonistbepaling een uniformere toename te zien gaven, waardoor de identificatie van een drempel-CV met deze methode enigszins arbitrair is.

▼M5

PROCEDURE

Naleving van de wet en laboratoriumverificatie

27. In tegenstelling tot de Uterotrofe bepaling (hoofdstuk B.54 van deze bijlage), hoeft de competentie van een laboratorium voor de Hershberger-assay niet voor aanvang van het onderzoek te worden aangetoond, omdat positieve (testosteronpropionaat en flutamide) en negatieve controles tegelijkertijd plaatsvinden als integraal onderdeel van de bepaling.

Aantal en toestand van de dieren

28. Elke behandelings- en controlegroep moet minimaal 6 dieren omvatten. Dit geldt voor zowel de androgene als de antiandrogene protocols.

Castratie

29. Na ontvangst van de dieren moet er een eerste acclimatisatieperiode van enkele dagen worden ingeruimd om er zeker van te zijn dat de dieren gezond zijn en gedijen. Omdat bij dieren die voor een leeftijd van 42 dagen of postnatale dag (pnd) 42 de voorhuid mogelijk niet is teruggetrokken, moeten dieren worden gecastreerd op pnd 42 of later, niet daarvoor. De dieren worden onder anesthesie gecastreerd door een incisie in het scrotum aan te brengen en beide testes en epididymides te verwijderen waarbij bloedvaten en zaadbuisjes worden afgebonden. Na bevestiging dat er geen bloeding optreedt, kan het scrotum met hechtingen of autoclips worden gesloten. Dieren moeten de eerste dagen na chirurgie met pijnstillers worden behandeld om postchirurgische pijn te verlichten. Als gecastreerde dieren van een dierleverancier worden betrokken, moeten de leeftijd van de dieren en het stadium van de seksuele rijping door de leverancier worden gegarandeerd.

Acclimatisatie na castratie

30. Acclimatisatie van de dieren aan de laboratoriumomstandigheden moet worden voortgezet zodat het doelweefselgewicht minimaal zeven dagen na castratie kan afnemen. De dieren moeten dagelijks worden geobserveerd, en alle dieren met aanwijzingen van ziekte of lichamelijke afwijkingen moeten worden verwijderd. Behandeling en instelling van de toediening (in onderzoek) kan dus beginnen vanaf een leeftijd van pnd 49 dagen, maar niet later dan pnd 60. De leeftijd bij obductie mag niet hoger zijn dan pnd 70. Met deze flexibiliteit kan een laboratorium het werk aan het experiment efficiënt plannen.

Lichaamsgewicht en groeprandomisatie

31. Verschillen in individueel lichaamsgewicht zijn een bron van variabiliteit in weefselgewicht zowel binnen als tussen groepen dieren. Toenemende variabiliteit in weefselgewicht leidt tot een hogere variatiecoëfficiënt (CV) en vermindert het statistisch onderscheidingsvermogen van de bepaling (soms de gevoeligheid van de bepaling genoemd). Daarom moeten variaties in lichaamsgewicht zowel experimenteel als statistisch gereguleerd worden.

32. Experimentele regulering houdt in het bereiken van geringe variaties in lichaamsgewicht binnen en tussen de onderzoeksgroepen. In de eerste plaats moeten ongebruikelijk kleine of grote dieren worden vermeden en niet in de onderzoekscohort worden opgenomen. Bij aanvang van het onderzoek moet de gewichtvariatie van de gebruikte dieren niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht zijn (bv. 175 g ± 35 g voor gecastreerde peripuberale ratten). Ten tweede moeten dieren worden toegewezen aan (controle- en behandel-) groepen via gerandomiseerde gewichtsverdeling, zodat het gemiddelde lichaamsgewicht van elke groep niet statistisch afwijkt van alle andere groepen. De toegepaste blokrandomisatieprocedure moet worden vastgelegd.

▼M5

33. Omdat toxiciteit het lichaamsgewicht van de behandelde groep ten opzichte van de controlegroep kan verminderen, moet het lichaamsgewicht op de eerste dag van de toediening van de teststof worden gebruikt als statistische covariabele, niet het lichaamsgewicht bij obductie.

Dosering

34. Om vast te stellen of de teststof in vivo een androgene werking kan hebben, zijn twee dosisgroepen van de teststof plus positieve en medium (negatieve) controles (zie paragraaf 43) normaliter voldoende, en daarom geniet deze opzet de voorkeur uit het oogpunt van dierwelzijn. Als het doel is om een dosisresponscurve te verkrijgen of naar lagere doses te extrapoleren, zijn minstens 3 dosisgroepen nodig. Als informatie naast identificatie van androgene activiteit (zoals een schatting van de potentie) nodig is, moet een ander dosisregime worden overwogen. Om te testen op antiandrogenen wordt de teststof samen toegediend met een referentieandrogeenagonist. Er moeten minimaal 3 testgroepen met verschillende doses van de teststof en een positieve en negatieve controle worden gebruikt (zie paragraaf 44). Afgezien van de toediening van de teststof worden de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld als de dieren in de testgroepen. Indien bij de toediening van de teststof van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden.

35. De dosisniveaus moeten worden voorgesteld en gekozen in het licht van de bestaande gegevens over toxiciteit en (toxico)kinetica van de teststof en verwante stoffen. Bij het hoogste dosisniveau moet in de eerste plaats rekening worden gehouden met de LD_{50} en/of informatie over acute toxiciteit om overlijden, ernstig lijden of stress voor de dieren te voorkomen (17) (18) (19) (20) en, in de tweede plaats, met de beschikbare informatie over de doses die in de subchronische en chronische studies gebruikt zijn. In het algemeen zou de hoogste dosis geen verlaging van het uiteindelijke lichaamsgewicht van de dieren van meer dan 10 % van het controlegewicht moeten veroorzaken. De hoogste dosis moet zijn hetzij 1) de hoogste dosis die overleving van het dier waarborgt en die geen aanzienlijke toxiciteit of stress aan de dieren geeft na 10 opeenvolgende dagen van toediening tot een maximale dosis van 1 000 mg/kg/dag (zie paragraaf 36) of 2) een dosis die (anti)androgene effecten opwekt, afhankelijk van welke lager is. Bij screening zijn grote intervallen, bijvoorbeeld een half log eenheden (overeenkomend met een dosisprogressie van 3,2) of zelfs één log eenheden, tussen toedieningen aanvaardbaar. Als er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, kan een bereikbepalingonderzoek worden uitgevoerd (zie paragraaf 37) om de te gebruiken doses te helpen bepalen.

Maximale dosis

36. Als een test bij de maximale dosis van 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag en een lagere dosis met de voor dit onderzoek voorgeschreven procedures geen statistisch significante verandering in het gewicht van de geslachtsorganen geeft, dan kunnen overige dosisniveaus onnodig worden geacht. De maximale dosis is van toepassing, behalve wanneer op grond van gegevens over blootstelling bij de mens een hoger dosisniveau nodig wordt geacht.

Overwegingen voor bereikbepaling

37. Waar nodig kan een preliminair bereikbepalingsonderzoek plaatsvinden met enkele dieren om de geschikte dosisgroepen te selecteren [aan de hand van methoden voor testen op acute toxiciteit (hoofdstukken B.1 bis, B.1 tris van deze bijlage (27), OESO TG 425 (19))]. De doelstelling in het geval van de Hershberger-bioassay is om doses te selecteren waarbij de dieren overleven en die geen aanmerkelijke toxiciteit of stress aan de dieren veroorzaken na

▼M5

tien opeenvolgende dagen van toediening van de stof tot een maximale dosis van 1 000 mg/kg/d zoals opgemerkt in paragrafen 35 en 36. Hierbij kan een OESO-leidraad (17) worden gebruikt waarin de klinische tekenen worden gedefinieerd die wijzen op toxiciteit of stress voor de dieren. Waar mogelijk kunnen binnen dit bereikbepalingsonderzoek na tien dagen toediening de doelweefsels worden uitgesneden en gewogen, ongeveer 24 uur na toediening van de laatste dosis. Deze gegevens kunnen dan worden gebruikt om te helpen bij het selecteren van de dosis in het hoofdonderzoek.

Referentiestoffen en medium

38. De referentieandrogeenagonist moet zijn testosteronpropionaat (TP), CAS nr 57-82-5. De referentie-TP-dosering kan zijn hetzij 0,2 mg/kg-lg/d of 0,.4 mg/kg-lg/d. De referentieandrogeenantagonist moet zijn flutamide (FT), CAS nr 1311-84-7. De referentie-FT-dosering moet zijn 3 mg/kg-lg/d, en FT moet gelijktijdig worden toegediend met de referentie-TP-dosering.

39. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig(e) oplosmiddel/suspensie te overwegen. Maar omdat veel androgeenliganden of hun metabole precursors over het algemeen hydrofoob zijn, is de meest gangbare benadering om een oplossing/suspensie in olie te gebruiken (bv. maïs-, pinda-, sesam- of olijfolie). Teststoffen kunnen worden opgelost in een minimale hoeveelheid 95 % ethanol of andere geschikte oplosmiddelen en verdund tot de uiteindelijke werkconcentraties in het testmedium. De toxische eigenschappen van het oplosmiddel moeten bekend zijn, en moeten in een aparte controlegroep met alleen oplosmiddel worden getest. Als de teststof stabiel wordt geacht, kan voorzichtige verwarming en krachtig schudden worden gebruikt om te helpen bij het oplossen van de teststof. De stabiliteit van de teststof in het medium moet worden bepaald. Als de teststof gedurende het onderzoek stabiel is, kan één beginaliquot van de teststof worden bereid, en kunnen de gespecificeerde oplossingen dagelijks worden bereid, waarbij vervuiling en morsen van de monsters wordt vermeden.

Toediening van de doses

40. TP moet worden toegediend door subcutane injectie en FT via maagsonde.

41. De teststof wordt toegediend via maagsonde of subcutane injectie. Bij het kiezen van de toedieningsroute moet rekening worden gehouden met dierwelzijn en de fysische/chemische eigenschappen van de teststof. Daarnaast moet rekening worden gehouden met toxicologische aspecten zoals de relevantie van de humane route van blootstelling aan de stof (bv. maagsonde voor modelingestie, subcutane injectie voor modelinhalatie of dermale absorptie) en bestaande toxicologische informatie en gegevens over metablisme en kinetiek (bv. noodzaak om first-passmetabolisme te voorkomen, betere effectiviteit via een bepaalde route) voordat uitvoerige en langdurige tests worden gestart als positieve resultaten met injectie worden verkregen.

42. De dieren moeten gedurende tien opeenvolgende dagen met intervallen van ongeveer 24 uur op dezelfde manier en op hetzelfde tijdstip een dosis ontvangen. Het dosisniveau moet dagelijks worden aangepast op basis van gelijktijdig verrichte meting van het lichaamsgewicht. Het volume van de dosis en de tijd waarop deze is toegediend moet op elke blootstellingsdag worden vastgelegd. Er moet voor worden gezorgd dat de maximale dosis die in paragraaf 35 is beschreven niet wordt overschreven om zo een zinvolle interpretatie van de gegevens mogelijk te maken. Vermindering van lichaamsgewicht, klinische tekenen, en andere bevindingen moeten in dit opzicht grondig worden beoordeeld. Bij voeding via een orale maagsonde

▼M5

moet een geschikte buis of intubatiecanule worden gebruikt. Het maximale volume dat in één keer kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het dier. De lokale richtlijnen voor dierverzorging moeten worden gevolgd, maar het volume mag niet hoger zijn dan 5 ml/kg lichaamsgewicht, behalve in het geval van oplossingen in water waarbij 10 ml/kg lichaamsgewicht aangehouden kan worden. Voor subcutane injecties moeten de doses worden toegediend in het dorsoscapulaire en of lumbale gebied via een steriele naald (bv. 23- of 25-gauge) en een tuberculinespuit. Het scheren van de injectieplaats is facultatief. Elk(e) verlies of lekkage op de injectieplaats of onvolledige toediening moet worden vastgelegd. Het totale per rat geïnjecteerde volume per dag mag niet hoger zijn dan 0,5 ml/kg lichaamsgewicht.

Specifieke procedures voor androgeenagonisten

43. Voor de androgeenagonisttest is het medium de negatieve controle, de met TP behandelde groep is de positieve controle. Biologische activiteit die past bij androgeenagonisten wordt getest door toediening van een teststof aan behandelingsgroepen in geselecteerde doses gedurende 10 opeenvolgende dagen. Het gewicht van de vijf weefsels van secundaire geslachtsorganen uit de teststofgroepen wordt vergeleken met de mediumgroep op statistisch significante gewichtstoenames.

Specifieke procedures voor androgeenantagonisten en 5a-reductaseremmers

44. Voor de androgeenantagonisten- en 5a-reductaseremmerstest is de met TP behandelde groep de negatieve controle, en de groep met gelijktijdige toediening van referentiedoses TP en FT de positieve controle. Er wordt getest op biologische activiteit die past bij androgeenantagonisten en 5a-reductaseremmers door toediening van een referentiedosis TP en toediening van de teststof gedurende 10 opeenvolgende dagen. Het gewicht van de vijf weefsels uit secundaire geslachtsorganen uit de groepen met TP en teststof worden vergeleken met de referentiegroep met alleen TP op statistisch significante gewichtsafnames.

WAARNEMINGEN

Klinische waarnemingen

45. Minstens eenmaal per dag, en vaker als er tekenen van toxiciteit worden waargenomen, moeten algemene klinische waarnemingen worden gedaan. De waarnemingen worden bij voorkeur elke dag op het/dezelfde tijdstip(pen) verricht waarbij rekening wordt gehouden met de periode met verwachte piekeffecten na toediening. Alle dieren moeten worden geobserveerd op mortaliteit, morbiditeit, en algemene klinische tekenen zoals veranderingen in gedrag, huid, vacht, ogen, slijmvliezen, uitscheidingen en afscheidingen en autonome activiteiten (zoals traanvorming, rechtopstaan van het haar, pupilgrootte, ongebruikelijk ademhalingspatroon).

46. Elk dood aangetroffen dier moet worden verwijderd en afgevoerd zonder verdere gegevensanalyse. Alle mortaliteit van dieren vóór obductie moet in het onderzoeksverslag worden opgenomen samen met een eventuele kennelijke reden voor de mortaliteit.. Stervende dieren moeten op humane wijze worden gedood. Alle stervende en gedode dieren moeten worden opgenomen in het onderzoeksverslag met de kennelijke redenen voor de morbiditeit.

▼M5

Lichaamsgewicht en consumptie van voer

47. Alle dieren moeten dagelijks worden gewogen op 0,1 g nauwkeurig, te beginnen vlak voor de behandeling start, d.w.z. wanneer de dieren over de groepen worden verdeeld. Eventueel kan de hoeveelheid voer die tijdens de behandelperiode geconsumeerd wordt, per kooi gemeten worden door de voerbak te wegen. De voerconsumptiegegevens moeten worden genoteerd in gram per rat per dag.

Sectie en meting van weefsel- en orgaangewicht

48. Ongeveer 24 uur na de laatste toediening van de teststof moeten de ratten worden gedood met aftappen van bloed volgens normale procedures van het uitvoerende laboratorium, en obductie worden verricht. De wijze van humaan doden moet in het laboratoriumrapport worden vermeld.

49. Idealiter moet de volgorde van obductie worden gerandomiseerd tussen de groepen om opeenvolgende stijgende of dalende doses te vermijden, wat de gegevens zou kunnen beïnvloeden. Alle bevindingen bij obductie, met name pathologische veranderingen/zichtbare laesies moeten worden opgemerkt en gerapporteerd.

50. De vijf androgeenafhankelijke weefsels (VP, SV, LABC, COW, GP) moeten worden gewogen. Deze weefsels moeten worden uitgesneden, waarbij aanliggend weefsel en vet zorgvuldig worden weggesneden, en hun verse (niet gefixeerde) gewicht wordt vastgesteld. Elk weefsel moet met grote zorg worden behandeld om verlies van vocht en uitdroging te voorkomen, wat aanmerkelijke fouten en variabiliteit kan veroorzaken doordat het vastgelegde gewicht lager is. Verschillende weefsels kunnen heel klein of moeilijk te ontleden zijn, en dit zal tot variabiliteit leiden. Daarom is het belangrijk dat de personen die de sectie op de weefsels van de secundaire geslachtsorganen verrichten bekend zijn met de standaard sectieprocedures voor deze weefsels. Een standard operating procedure (SOP)-gids voor sectie is beschikbaar bij de OESO (21). Met zorgvuldige training volgens de SOP-gids wordt mogelijke variabiliteit in het onderzoek tot een minimum beperkt. Idealiter is steeds dezelfde prosector verantwoordelijk voor de sectie van een bepaald weefsel om interindividuele verschillen in de verwerking van weefsels te elimineren. Als dat niet mogelijk is, moet de obductie zo worden ingericht dat elke prosector sectie verricht op een bepaald weefsel uit alle behandelingsgroepen in plaats van dat één persoon sectie verricht op alle weefsels uit een controlegroep, terwijl iemand anders verantwoordelijk is voor de behandelde groepen. Alle secundaire geslachtsweefsels moeten zonder droogdeppen worden gewogen, afgerond op 0,1 mg, en het gewicht wordt voor elk dier vastgelegd.

51. Sommige weefsels kunnen heel klein zijn waardoor sectie moeilijk te verrichten is, en dit zal tot variabiliteit leiden. In het verleden is gebleken dat variatiecoëfficiënten (CV's) kunnen verschillen als gevolg van verschillen in vaardigheid van het laboratorium. In enkele gevallen zijn bij een bepaald laboratorium grote verschillen in het absolute gewicht van de weefsels zoals de VP en COWS waargenomen.

52. Meting van gewicht van lever, nieren paarsgewijs, en bijnieren paarsgewijs, is facultatief. Ook hier moeten weefsels worden ontdaan van aanliggend bindweefsel en vet. Het gewogen levergewicht moet worden vastgelegd, afgerond op 0,1 g, en de nieren en bijnieren moeten paarsgewijs worden gewogen en afgerond op 0,1 mg. De lever, nieren en bijnieren worden niet alleen door androgenen beïnvloed; ze leveren ook bruikbare indices op van systemische toxiciteit.

▼M5

53. Meting van luteïniserend hormoon (LH), follikelstimulerend hormoon (FSH) en testosteron (T) in het serum is facultatief. Serum T-concentraties zijn nuttig voor het vaststellen of de teststof metabolisme van testosteron door de lever induceert waardoor de serumconcentraties dalen. Zonder de T-gegevens zou zo'n effect kunnen lijken plaats te vinden via een antiandrogeen mechanisme. De LH-concentraties geven informatie over het vermogen van een antiandrogeen om niet alleen het orgaangewicht te verminderen, maar ook de hypothalamus-hypofysefunctie te beïnvloeden, wat in langetermijnstudies testistumoren kan induceren. FSH is een belangrijk hormoon voor de spermatogenese. Serum-T4 en -T3 zijn ook optionele metingen die nuttige aanvullende informatie kunnen geven over het vermogen om de homeostase van het thyroïdhormoon te verstoren. Als hormoonmetingen gedaan worden, moeten de ratten vóór obductie onder narcose worden gebracht en wordt bloed met een hartpunctie afgenomen; de wijze van verdoving moet zorgvuldig worden gekozen zodat deze de hormoonmeting niet beïnvloedt. De methode van serumbereiding, de herkomst van de radioimmunoassay of andere sets voor meting, de analystische procedures, en de resultaten moeten worden vastgelegd. LH-concentraties worden vermeld als ng per ml serum, en T moet ook worden vermeld als ng per ml serum.

54. Sectie op de weefsels wordt als volgt beschreven met een gedetailleerde sectiegids met foto's, gepubliceerd als aanvullend materiaal in het kader van het valideringsprogramma (21). Een sectievideo is ook beschikbaar op de webpagina van de Korea Food and Drug Administration (22).

— Stel met de buikzijde van het dier omhoog vast of de voorhuid van de penis is losgekomen van de glans penis. Zo ja, trek de voorhuid dan terug en verwijder de glans penis, weeg deze (afronden op 0,1 mg), en noteer het gewicht.

— Open de buikhuid en -wand, waardoor de ingewanden worden blootgelegd. Als de optionele organen gewogen worden, verwijder de lever dan en weeg deze, rond af op 0,1 g, verwijder de maag en darmen, verwijder en weeg paarsgewijs de nieren en bijnieren, rond af op 0,1 mg. Met deze sectie wordt de blaas blootgelegd en kan worden begonnen met de sectie van de gewenste secundaire geslachtsweefsels.

— Voor sectie van de VP wordt de blaas van de ventrale spierlaag losgemaakt door het bindweefsel langs de middellijn door te snijden. Schuif de blaas in anterieure richting opzij naar de zaadblaasjes (SV), waardoor de linker- en rechterlobben van de ventrale prostaat (bedekt door een vetlaag) zichtbaar worden. Verwijder voorzichtig het vet van de rechter- en linkerlobben van de VP. Trek voorzichtig de rechter VP-lob van de urethra af en snijd de lob van de urethra los. Terwijl de rechter VP-lob nog wordt vastgehouden, wordt voorzichtig de linker VP-lob van de urethra afgetrokken en losgesneden; weeg en rond af op 0,1 mg en noteer het gewicht.

— Voor sectie van de SVCG wordt de blaas in caudale richting verschoven, waardoor de vas deferens en rechter- en linkerlobben van de zaadblaasjes plus coagulans uitscheidende klieren (SVCG) zichtbaar worden. Voorkom lekkage van vocht door een hemostaatklem aan de basis van de SVCGs te plaatsen, waar de vas deferens samenkomt met de urethra. Snijd voorzichtig de SVCGs los, met de hemostaat op zijn plaats, verwijder vet en adnexa, leg in een getarreerde weger, verwijder de hemostaat, weeg en rond af op 0,1 mg, en noteer het gewicht.

▼M5

— Voor sectie van de m. levator ani plus bulbocavernosus (LABC) worden de spieren en de basis van de penis blootgelegd. De LA-spieren liggen rond de colon, terwijl de anterieure LA- en BC-spieren aan de bulbus penis gehecht zijn. De huid en adnexa van het perianale gebied vanaf de basis van de penis tot het anterieure uiteinde van de anus worden verwijderd. De BC-spieren worden een voor een van de bulbus penis en weefsels losgemaakt. De colon wordt doorgesneden en de volledige LABC kan worden uitgesneden en verwijderd. De LABC moet worden ontdaan van vet en adnexa, gewogen met afronding op 0,1 mg, en het gewicht moet worden genoteerd.

— Na verwijdering van de LABC zijn de ronde Cowperse of bulbo-urethrale klieren (COW) zichtbaar aan de basis van, en enigszins dorsaal van, de bulbus penis. Zorgvuldige sectie is geboden om te voorkomen dat het dunne kapsel wordt doorgeprikt om zo vochtlekkage te vermijden. Weeg de COW paarsgewijs, rond af op 0,1 mg, en noteer het gewicht.

— Daarnaast moet eventueel verlies van vocht uit een klier tijdens obductie en sectie worden genoteerd.

55. Als de beoordeling van elke stof de obductie van meer dieren vereist dan voor één dag redelijk is, kan het begin van het onderzoek over twee opeenvolgende dagen worden verspreid, waardoor obductie en verwante werkzaamheden ook over twee dagen worden verspreid. Als de werkzaamheden zo worden gespreid, moet per dag de helft van de dieren per behandelingsgroep worden verwerkt.

56. Na obductie moeten de karkassen op passende wijze worden afgevoerd.

RAPPORTAGE

Gegevens

57. Gegevens moeten individueel worden gemeld (te weten lichaamsgewicht, gewicht secundaire geslachtsweefsels, optionele metingen en andere responsen en waarnemingen) en voor elke groep dieren (gemiddelden en standaarddeviaties van alle verrichte metingen). De gegevens moeten in tabelvorm worden samengevat. De gegevens moeten het aantal dieren laten zien aan het begin van de test, het aantal dieren dat tijdens de test dood is aangetroffen of met tekenen van toxiciteit, een omschrijving van de waargenomen tekenen van toxiciteit, waaronder tijd van begin, duur en ernst.

58. Een eindrapport moet het volgende bevatten:

Testinstelling:

— naam instelling, locatie,

— onderzoeksleider en andere medewerkers en hun verantwoordelijkheden met betrekking tot het onderzoek,

— begin- en einddatum van het onderzoek, te weten de eerste dag van toediening van de teststof resp. laatste dag van obductie.

Teststof:

— herkomst, partij/chargenummer, identiteit, zuiverheid, volledig adres van leverancier en kenmerken van de teststof,

— fysische toestand en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen,

— opslagomstandigheden en methode en frequentie van bereiding van verdunning,

— alle gegenereerde gegevens over stabiliteit,

— alle analyses van doseeroplossingen/suspensies.

▼**M5**

Medium:

— kenmerken van het medium (identiteit, leverancier en partijnummer),

— motivering van de keuze van het medium (wanneer dat geen water is).

Procedures voor proefdieren en dierhouderij:

— gebruikte diersoort/stam en motivering van de keuze,

— herkomst of leverancier van dieren, inclusief volledig adres,

— aantal en leeftijd van geleverde dieren,

— huisvesting (temperatuur, verlichting enz.),

— voer (naam, type, leverancier, partijnummer, inhoud en indien bekend, concentraties fyto-oestrogenen),

— strooisel (naam, type, leverancier, samenstelling),

— omstandigheden in de kooi en aantal dieren per kooi.

Testomstandigheden:

— leeftijd bij castratie en duur van acclimatisatie na castratie,

— individueel gewicht van de dieren bij aanvang van het onderzoek (afgerond op 0,1 g),

— randomisatieproces en een vastlegging van de toewijzing aan medium, referentie, teststofgroepen, en kooien,

— gemiddelde en standaarddeviatie van lichaamsgewicht voor elke groep voor elke weegdag in het onderzoek,

— motivering van de keuze van de dosis,

— Toedieningsroute van teststof en motivering van keuze van de blootstellingsweg,

— indien een bepaling voor antiandrogeniteit, de TP-behandeling (dosis en volume),

— behandeling met teststof (dosis en volume),

— tijdstip van toediening,

— obductieprocedures, inclusief wijze van aftappen van bloed en eventuele narcose,

— Indien serumanalyses worden verricht, moeten details van de methode worden gegeven. Bijvoorbeeld, als RIA wordt gebruikt, moet de RIA-procedure, herkomst van RIA-sets, vervaldata van sets, procedure voor scintillatietelling, en standaardisatie worden vermeld.

Resultaten:

— Dagelijkse observaties voor elk dier tijdens toediening, waaronder:

— lichaamsgewicht (afgerond op 0,1 g),

— klinische tekenen (indien aanwezig),

— eventuele meting van of opmerking over voerconsumptie.

— Observaties bij obductie voor elk dier, waaronder:

▼M5

— datum obductie,

— behandelingsgroep van het dier,

— dier-ID,

— prosector,

— tijdstip dat necropsie en sectie wordt verricht,

— leeftijd dier,

— uiteindelijk lichaamsgewicht bij obductie, met opmerking van eventuele statistisch significante toename of afname,

— volgorde van aftappen van bloed en sectie bij obductie,

— gewicht van de vijf androgeenafhankelijke doelweefsels:

— ventrale prostaat (afgerond op 0,1 mg),

— zaadblaasjes plus coagulans uitscheidende klieren, inclusief vocht (paarsgewijs, afgerond op 0,1 mg),

— m levator ani plus bulbocavernosuscomplex (afgerond op 0,1 mg),

— Cowperse klieren (vers gewicht — paarsgewijs, afgerond op 0,1 mg),

— glans penis (vers gewicht afgerond op 0,1 mg),

— gewicht van optionele weefsels, indien verricht:

— lever (afgerond op 0,1 g),

— nieren (paarsgewijs, afgerond op 0,1 mg),

— bijnieren (paarsgewijs, afgerond op 0,1 mg),

— algemene opmerkingen.

— Analyses van serumhormonen, indien verricht:

  — serum-LH (facultatief — ng per ml serum), en

  — serum-T (facultatief — ng per ml serum), en

— algemene opmerkingen.

Samenvatting van gegevens

Gegevens moeten worden samengevat in tabelvorm met steekproefgrootte voor elke groep, gemiddelde van de waarde, en de standaardfout of standaarddeviatie. Tabellen moeten lichaamsgewicht bij obductie, veranderingen in lichaamsgewicht vanaf begin van toediening tot obductie, gewicht secundaire geslachtsdoelweefsels, en eventuele optionele orgaangewichten bevatten.

Bespreking van de resultaten.

Analyse van resultaten

59. Het lichaams- en orgaangewicht bij obductie moeten statistisch worden geanalyseerd op kenmerken zoals homogeniteit van variantie met passende datatransformaties waar nodig. Behandelingsgroepen moeten worden vergeleken met een controlegroep aan de hand van technieken als ANOVA gevolgd door paarsgewijze vergelijkingen (bv. eenzijdige Dunnett-test) en het criterium voor statistisch verschil, bijvoorbeeld $p \leq 0{,}05$. Groepen die statistische significantie bereiken moeten worden geïdentificeerd. Maar „relatief orgaangewicht” moet worden vermeden vanwege de ongeldige statistische aannamen die aan deze gegevensbewerking ten grondslag liggen.

▼**M5**

60. Voor androgeenagonisme moet de controle de testgroep met alleen medium zijn. De kenmerken van het werkingsmechanisme van de teststof kunnen tot verschillende relatieve responsen in weefsels leiden, bijvoorbeeld trenbolon, waarbij 5a-reductie niet mogelijk is, heeft een meer uitgesproken effect op het LABC en GP dan TP. Een statistisch significante verhoging ($p \leq 0,05$) in het gewicht van twee of meer van de vijf androgeenafhankelijke doelweefsels (VP, LABC, GP, CG en SVCG) moet worden beschouwd als een positief androgeenagonistresultaat, en alle doelweefsels moeten enige mate van groeitoename vertonen. Een gecombineerde beoordeling van de respons van de weefsels van alle secundaire geslachtsorganen (ASO) kan worden bereikt met passende multivariabele gegevensanalyse. Dit kan de analyse verbeteren, vooral in gevallen waar slechts één weefsel een statistisch significante respons vertoont.

61. Voor androgeenantagonisme moet de controle de testgroep met het referentieandrogeen (alleen testosteronpropionaat) zijn. De kenmerken van het werkingsmechanisme van een teststof kunnen tot een verschillende relatieve respons in weefsels leiden; zo hebben 5a-reductaseremmers als finasteride een meer uitgesproken effect op de ventrale prostaat dan andere weefsels in vergelijking met krachtige AR-antagonisten, zoals flutamide. Een statistisch significante verlaging ($p \leq 0,05$) in het weefselgewicht van twee of meer van de vijf androgeenafhankelijke doelweefsels (VP, LABC, GP, CG en SVCG) wordt beschouwd als een positief androgeenantagonistresultaat, en alle doelweefsels moeten enige mate van groeiafname vertonen. Een gecombineerde beoordeling van alle ASO-weefselresponsen kan worden bereikt met passende multivariabele gegevensanalyse. Dit kan de analyse verbeteren, vooral in gevallen waar slechts één weefsel een statistisch significante respons vertoont.

62. De gegevens moeten worden samengevat in tabelvorm met gemiddelde, standaardfout (standaarddeviatie zou ook acceptabel zijn) en steekproefgrootte voor elke groep. Ook individuele datatabellen moet worden toegevoegd. De individuele waarden, gemiddelden, SE (SD) en CV-waarden voor de controlegegevens moeten worden geverifieerd om vast te stellen of ze aan aanvaardbare criteria voldoen voor consistentie met verwachte historische waarden. Aan de hand van CV's die de CV-waarden in tabel 1 (zie paragraaf 25 en 26) voor elk orgaangewicht te boven gaan, moeten worden vastgesteld of er fouten zijn in het vastleggen of invoeren van gegevens, dan wel of het laboratorium een accurate sectie van androgeenafhankelijke weefsels nog niet beheerst en aanvullende training/oefening gerechtvaardigd is. Over het algemeen zijn CV's (de standaarddeviatie gedeeld door het gemiddelde orgaangewicht) van lab tot lab en van onderzoek tot onderzoek reproduceerbaar. De gepresenteerde gegevens moeten ten minste bevatten: ventrale prostaat, zaadblaasje, m levator ani plus bulbocavernosus, Cowperse klieren, glans penis, lever, en lichaamsgewicht en verandering in lichaamsgewicht vanaf begin van toediening tot obductie. Gegevens kunnen ook worden gepresenteerd na aanpassing voor covariantie voor lichaamsgewicht, maar dit moet niet in de plaats komen van het presenteren van de onaangepaste gegevens. Daarnaast, als het loskomen van de voorhuid (preputial separation — PPS) niet in een van de groepen optreedt, moet de incidentie van PPS worden vastgelegd en statistisch vergeleken met de controlegroep aan de hand van de Fisher Exact test.

▼**M5**

63. Bij controle op juistheid van de ingegeven computergegevens door vergelijking met de oorspronkelijke gegevensformulieren, moeten waarden voor orgaangewicht die niet biologisch plausibel zijn of met meer dan drie standaarddeviaties van het gemiddelde van die behandelingsgroep afwijken, zorgvuldig worden onderzocht en mogelijk worden genegeerd, omdat het waarschijnlijk fouten in de vastlegging zijn.

64. Vergelijking van onderzoeksresultaten met OESO-waarden (in tabel 1) is vaak een belangrijke stap in het interpreteren van de validiteit van de onderzoeksresultaten. In het laboratorium moeten historische gegevens voor mediumcontrolegroepen worden bijgehouden. Historische gegevens voor responsen op positieve referentiestoffen, zoals TP en FT, moeten eveneens in het laboratorium worden bijgehouden. Laboratoria kunnen ook periodiek de respons op bekende zwakke androgeenagonisten en -antagonisten testen en deze gegevens bijhouden. Deze gegevens kunnen worden vergeleken met beschikbare OESO-gegevens om ervoor te zorgen dat de methoden in het laboratorium voldoende statistisch(e) precisie en onderscheidingvermogen opleveren.

▼**M5**

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Androgeen is een term waarmee een positieve invloed op de groei van androgeenafhankelijke weefsels wordt beschreven.

Antiandrogeen is het vermogen van een stof om in een zoogdierorganisme de werking van TP te onderdrukken.

Stof betekent een stof of mengsel.

Geboortedatum is postnatale dag 0.

Dosis: de toegediende hoeveelheid teststof. Voor de Hershberger-bioassay wordt de dosis uitgedrukt als gewicht van de teststof per eenheid lichaamsgewicht van het proefdier per dag (bv. mg/kg lichaamsgewicht/dag).

Dosering is een algemene term die de dosis, de frequentie en de duur van de toediening omvat.

Stervend wil zeggen een dier dat op het punt van overlijden staat.

Postnatale dag x is de x'e levensdag na de geboortedag.

Gevoeligheid is het vermogen van de testmethode om correct stoffen te identificeren die de eigenschap hebben waarop wordt getest.

Specificiteit is het vermogen van een testmethode om correct stoffen te identificeren die niet de eigenschap hebben waarop wordt getest.

Teststof betekentalle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

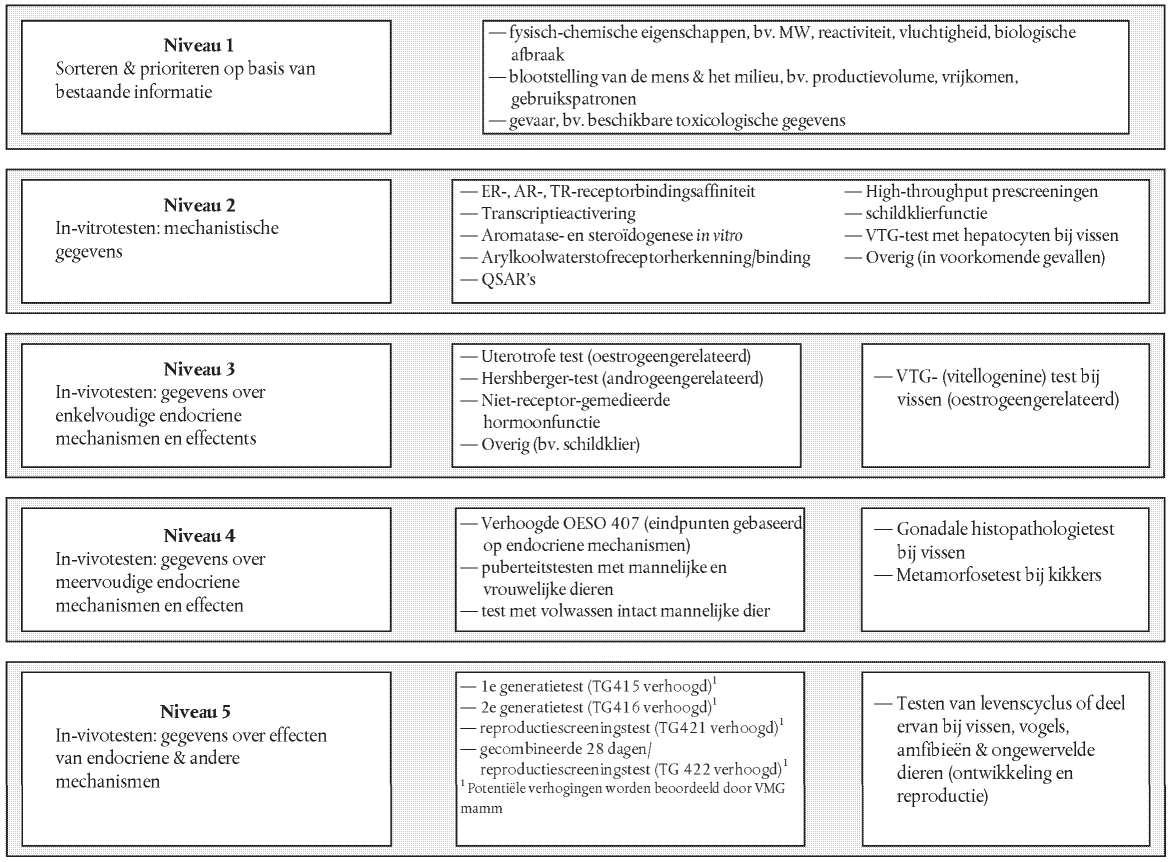
Validering is een wetenschappelijke methode die erop gericht is om de operationele vereisten en beperkingen van een testmethode te beschrijven en de betrouwbaarheid en relevantie ervan voor een bepaald doel aan te tonen.

▼M5

Aanhangsel 2

Noot: Document opgesteld door het Secretariaat van het testrichtlijnprogramma uit hoofde van de overeenkomst die werd bereikt op de 6e bijeenkomst van de EDTA Task Force

Conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

▼M5

OPMERKINGEN BIJ HET KADER

Opmerking 1: het is mogelijk om op alle niveaus in- en uit te stappen. Dit hangt af van de soort informatie waaraan behoefte bestaat voor gevaar- en risicobeoordelingsdoeleinden.

Opmerking 2: in niveau 5 moet de ecotoxicologie eindpunten omvatten die duiden op mechanismen van schadelijke effecten en potentiële schade voor de populatie.

Opmerking 3: als een multimodaal model enkele van de testen met een enkel eindpunt omvat, vervangt dat model het gebruik van deze testen met een enkel eindpunt.

Opmerking 4: de beoordeling van elke stof moet per geval plaatsvinden, rekening houdend met alle beschikbare informatie en de functie van de niveaus van het kader.

Opmerking 5: het kader moet op dit moment niet worden beschouwd als alomvattend. Op niveaus 3, 4 en 5 voorziet het kader in testen die al beschikbaar zijn of waarvan de validering nog loopt. De laatstgenoemde testen zijn daarom als voorlopig opgenomen. Na de ontwikkeling en validering ervan worden deze testen formeel toegevoegd aan het kader.

Opmerking 6: niveau 5 moet niet worden beschouwd als een niveau dat alleen beslissende testen omvat. Tests die in dat niveau zijn opgenomen worden geacht aan de algehele beoordeling van gevaar en risico bij te dragen.

LITERATUUR

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

2. Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

3. Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: Current Protocols in Toxicology 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

4. OESO (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and antiandrogenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

5. OESO (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. OESO (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

7. Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼M5

8. Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

9. Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413-422.

10. Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

11. Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

12. Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

13. Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

14. Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

15. Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

16. Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

17. OESO (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. OESO (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Parijs.

19. OESO (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

20. OESO (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. OESO (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. OESO (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

25. OESO (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 Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33).

27. De volgende hoofdstukken van deze bijlage:

B.1 bis, Acute orale toxiciteit — Procedure met vaste doses

B.1 tris, Acute orale toxiciteit — Methode ter bepaling van de acute-toxiciteitsklasse.

▼M5

B.56. UITGEBREID ONDERZOEK NAAR REPRODUCTIETOXICITEIT OVER ÉÉN GENERATIE

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 443 (2012) van de OESO. De methode is gebaseerd op het voorstel van het Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) Technical Committee van het International Life Science Institute (ILSI)-Health and Environmental Sciences Institute (HESI) voor een uitgebreid reproductieonderzoek over één generatie met betrekking tot levensfase F_1, zoals gepubliceerd in Cooper et al., 2006 (1). Er zijn verscheidene verbeteringen en verduidelijkingen aangebracht in de opzet van het onderzoek om de flexibiliteit te vergroten en te benadrukken dat het van belang is uit te gaan van bestaande kennis bij het gebruik van observaties bij levende dieren om de testen richting te geven en af te stemmen. Deze testmethode voorziet in een gedetailleerde beschrijving van de operationele uitvoering van een uitgebreid onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie. Hierin worden drie cohorten van F_1-dieren beschreven:

cohort 1: beoordeelt reproductie/ontwikkelingseindpunten; deze cohort kan worden uitgebreid met een F_2-generatie,

cohort 2: beoordeelt de potentiële invloed van blootstelling aan stoffen op het ontwikkelende zenuwstelsel,

cohort 3: beoordeelt de potentiële invloed van blootstelling aan stoffen op het immuunsysteem.

2. Beslissingen over het al dan niet beoordelen van de tweede generatie en het achterwege laten van de ontwikkelingsneurotoxiciteitscohort en/of ontwikkelingsimmunotoxiciteitscohort, moeten gebaseerd zijn op bestaande kennis over de te beoordelen stof alsook op de behoeften van verscheidene regelgevende instanties. De testmethode heeft tot doel nadere gegevens te verstrekken over de wijze waarop het onderzoek kan worden uitgevoerd en elke cohort moet worden beoordeeld.

3. De procedure voor de beslissing over het intern triggeren van de productie van een tweede generatie wordt beschreven in OESO-leidraad nr. 117 (39) voor de regelgevende instanties die interne triggers toepassen.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN DOELSTELLINGEN

4. Het hoofddoel van het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie is het beoordelen van specifieke levensfasen die niet in andere typen toxiciteitsonderzoeken aan de orde komen en het testen op effecten die kunnen optreden als gevolg van pre- en postnatale blootstelling aan een stof. Voor reproductie-eindpunten is het de bedoeling dat, als een eerste stap en indien beschikbaar, informatie van onderzoeken met herhaalde toediening (zoals screeningsonderzoeken naar reproductietoxiciteit, bv. OESO TG 422 (32)) of kortlopende screeningstesten op hormoonontregelaars (bv. uterotrofe test — testmethode B.54 (36), en de Hershberger-test — testmethode B.55 (37)) wordt gebruikt om effecten op de geslachtsorganen bij mannetjes en vrouwtjes te detecteren. Dit kan onder meer spermatogenese (testiculaire histopathologie) voor mannetjes en oestruscycli, aantal follikels/eicelrijping en integriteit van de eierstokken (histopathologie) voor vrouwtjes omvatten. Het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie dient dan als een test voor reproductie-eindpunten waarvoor de interactie van mannetjes met vrouwtjes, vrouwtjes met een foetus en vrouwtjes met nakomelingen en de F_1-generatie tot na de geslachtsrijping nodig is (zie OESO-leidraad nr. 151 voor ondersteuning van deze testmethode (40)).

▼M5

5. De testmethode is bedoeld om de pre- en postnatale effecten van stoffen op de ontwikkeling te beoordelen alsook de systemische toxiciteit bij drachtige en zogende vrouwtjes en jonge en volwassen nakomelingen grondig te beoordelen. Door gedetailleerd onderzoek van belangrijke ontwikkelingseindpunten, zoals levensvatbaarheid van nakomelingen, neonatale gezondheid, ontwikkelingsstatus bij de geboorte en de lichamelijke en functionele ontwikkeling tot volwassenheid kunnen naar verwachting specifieke doelorganen bij de nakomelingen worden vastgesteld. Daarnaast wordt door middel van het onderzoek informatie verkregen en/of bevestigd over de effecten van een teststof op de integriteit en werking van de voortplantingssystemen van volwassen mannetjes en vrouwtjes. Met name, maar niet aansluitend, komen daarbij de volgende parameters aan de orde: gonadale functie, de oestruscyclus, epididymalespermarijping, paringsgedrag, conceptie, dracht, werpen en zogen. Verder worden met de informatie verkregen uit de beoordelingen van de ontwikkelingsneurotoxiciteit en ontwikkelingsimmunotoxiciteit mogelijke effecten op deze systemen gekarakteriseerd. Met de uit deze testen verkregen gegevens kunnen bepalingen worden gedaan van het niveau waarbij geen schadelijk effect werd vastgesteld (no-observed-adverse-effect level, NOAEL), het laagste niveau waarbij een schadelijk effect werd vastgesteld (lowest-observed-adverse-effect level, LOAEL) en/of benchmarkdoses voor de verscheidene eindpunten en/of deze gegevens kunnen worden gebruikt om effecten te karakteriseren die naar voren zijn gekomen uit eerdere onderzoeken met herhaalde toediening en/of dienen als een richtsnoer voor latere testen.

6. In figuur 1 wordt het protocol schematisch weergegeven. De teststof wordt continu toegediend in geleidelijk stijgende doses aan diverse groepen van geslachtsrijpe mannetjes en vrouwtjes. Deze parentale (P) generatie krijgt de stof toegediend gedurende een gedefinieerde periode vóór paring (gekozen op grond van de beschikbare informatie voor de teststof, maar minimaal twee weken) en een twee weken durende paringsperiode. P-mannetjes worden ten minste verder behandeld tot spening van de F_1 en moeten minimaal tien weken worden behandeld. Ze kunnen langer worden behandeld als effecten op de voortplanting helder gekregen moeten worden. De behandeling van de P-vrouwtjes wordt voortgezet tijdens de dracht en zoogperiode tot het einde na de spening van hun nesten (d.w.z. 8-tien weken behandeling). De F_1-nakomelingen worden verder behandeld met de teststof vanaf de spening tot volwassenheid. Bij beoordeling van een tweede generatie (zie OESO-leidraad nr. 117 (39)) blijven de F_1-nakomelingen behandeling krijgen tot spening van de F_2 of tot het einde van het onderzoek.

7. Met alle dieren worden klinische observaties en pathologische onderzoeken gericht op verschijnselen van toxiciteit verricht, met speciale nadruk op de integriteit en werking van de mannelijke en vrouwelijke voortplantingssystemen en de gezondheid, groei, ontwikkeling en functionering van de nakomelingen. Bij de spening worden geselecteerde nakomelingen toegewezen aan specifieke subgroepen (cohorten 1-3, zie punten 33 en 34 en figuur 1) voor nader onderzoek, waaronder geslachtsrijping, integriteit en functie van de voortplantingsorganen, neurologische en gedragseindpunten en immuunfuncties.

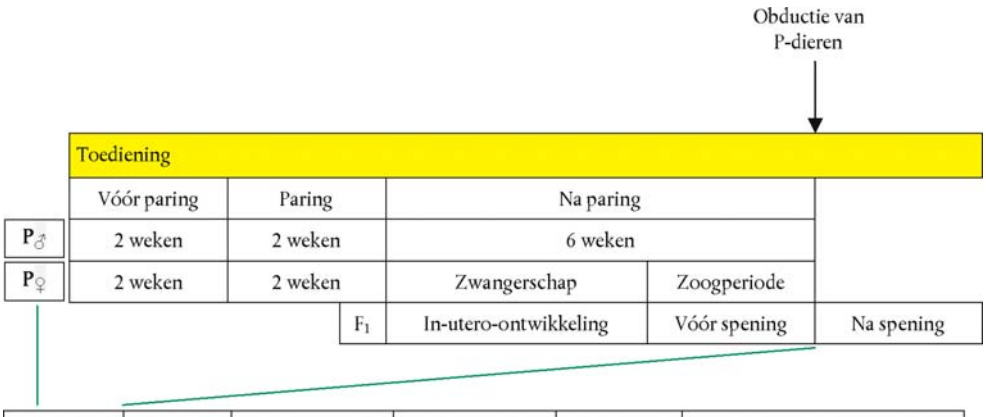
8. Bij het uitvoeren van het onderzoek moeten de richtsnoeren en overwegingen worden gevolgd die worden beschreven in de OESO-leidraad nr. 19 over het herkennen, beoordelen en gebruiken van klinische verschijnselen als humane eindpunten voor proefdiergebruik bij veiligheidsbeoordelingen (34).

▼M5

9. Als er voldoende onderzoeken beschikbaar zijn om vast te stellen wat de impact is van deze nieuwe onderzoeksopzet, wordt de testmethode beoordeeld en indien nodig herzien in het licht van opgedane ervaring.

Figuur 1

Schema van het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie



Parentale generatie	Cohort	Aanduiding	Dieren/cohort	Geslachtsrijping	Geschatte leeftijd bij obductie (weken)
Doel is 20 nesten per groep	1A	Voortplanting	20 M + 20 V	Ja	13
	1B	Voortplanting	20 M + 20 V	Ja	14 of 20-25 indien geactiveerd
	2A	Neurotoxiciteit	10 M + 10 V @	Ja	11-12
	2B	Neurotoxiciteit	10 M + 10 V @	Nee	3
	3	Immunotoxiciteit	10 M + 10 V @	Ja	8
	Extra	Reserve		Nee	3

@ één per nest en representatief voor 20 nesten in totaal, zo mogelijk

BESCHRIJVING VAN DE METHODE/VOORBEREIDINGEN VOOR DE TEST

Dieren

Keuze van diersoort en stam

10. De keuze van de soort voor de reproductietoxiciteitstest moet zorgvuldig overwogen worden in het licht van alle beschikbare informatie. Vanwege de omvang van de achtergrondgegevens en de vergelijkbaarheid met algemene toxiciteitstesten, is de rat echter normaliter de voorkeurssoort en hebben de bij deze testmethode gegeven criteria en aanbevelingen betrekking op deze soort. Wordt een andere soort gebruikt, dan moet dit gemotiveerd worden en zijn passende aanpassingen van het protocol noodzakelijk. Stammen met een lage vruchtbaarheid of een algemeen bekende hoge incidentie van spontane afwijkingen in de ontwikkeling mogen niet worden gebruikt.

Leeftijd, lichaamsgewicht en inclusiecriteria

11. Er worden gezonde P-dieren gebruikt waarop geen eerdere proeven zijn uitgevoerd. Zowel de mannetjes als de vrouwtjes worden onderzocht en de vrouwtjes moeten nullipara's zijn en niet drachtig zijn. De P-dieren moeten geslachtsrijp, bij aanvang van de toediening van gelijk gewicht (binnen hetzelfde geslacht) en bij het paren van gelijke leeftijd zijn (ongeveer 90 dagen), en het moeten representatieve exemplaren zijn van de soort en stam die worden onderzocht. De dieren moeten na levering ten minste vijf dagen acclimatiseren. De dieren worden willekeurig toegewezen aan de controle- en behandelgroepen. Dit moet zodanig gebeuren, dat dit vergelijkbare waarden voor het gemiddelde lichaamsgewicht van de groepen geeft (d.w.z. ± 20 % van het gemiddelde).

▼M5

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

12. De temperatuur in de proefdierruimte moet 22 °C (± 3 °C) zijn. De relatieve vochtigheid moet tussen 30 en 70 % liggen, idealiter tussen 50 en 60 %. De cyclus van het kunstlicht moet worden ingesteld op 12 uur licht en 12 uur donker. Het gewone proefdiervoer mag worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. Er dient goed gelet te worden op het gehalte aan fyto-oestrogenen in het voer, aangezien een hoog gehalte van invloed kan zijn op bepaalde reproductie-eindpunten. Gestandaardiseerd voer zonder voorgeschreven samenstelling met een verlaagd gehalte aan oestrogene stoffen wordt aanbevolen (2) (30). De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof in het voer wordt toegediend. Het gehalte, de homogeniteit en de stabiliteit van de teststof in het voer moet gecontroleerd worden. Het voer en drinkwater moeten regelmatig op onzuiverheden worden onderzocht. Van elke partij voer die tijdens het onderzoek wordt gebruikt moeten monsters onder de juiste omstandigheden worden bewaard (bv. ingevroren bij – 20 °C) tot het rapport afgerond is voor het geval de resultaten nadere analyse van de bestanddelen van het voer noodzakelijk maken.

13. De dieren moeten in kleine groepen van hetzelfde geslacht en dezelfde behandelgroep worden ondergebracht. Ze kunnen elk apart worden gehuisvest om mogelijk letsel te voorkomen (bv. mannetjes na de paringsperiode). Het paren moet plaatsvinden in geschikte kooien. Na gebleken copulatie worden vrouwtjes die geacht worden drachtig te zijn elk apart gehuisvest in kooien die zijn bestemd voor werpen of moederschap, waar ze worden voorzien van geschikt en gedefinieerd nestmateriaal. Nesten worden tot de spening met hun moeders gehuisvest. F_1-dieren moeten vanaf de spening tot het einde in kleine groepen van hetzelfde geslacht en dezelfde behandelgroep worden gehuisvest. Dieren kunnen elk apart worden gehuisvest als daarvoor een wetenschappelijke motivering wordt gegeven. Het gehalte aan fyto-oestrogenen in het gekozen strooisel moet minimaal zijn.

Aantal dieren en identificatie

14. Normaal moet elke test- en controlegroep een voldoende aantal paringskoppels bevatten om ten minste 20 drachtige vrouwtjes per dosisgroep op te leveren. Het doel is voldoende drachten tot stand te brengen om een betekenisvolle evaluatie van de mogelijke invloed van de stof op de vruchtbaarheid, dracht en het moederlijke gedrag van de P-generatie en de groei en ontwikkeling van de F_1-nakomelingen, vanaf de conceptie tot de volwassenheid, mogelijk te maken. Wordt het gewenste aantal drachtige dieren niet gehaald, dan maakt dit het onderzoek niet noodzakelijkerwijs ongeldig en moet dit per geval worden geëvalueerd, rekening houdend met een mogelijk oorzakelijk verband met de teststof.

15. Aan elk P-dier wordt een uniek identificatienummer toegekend alvorens de toediening start. Als historische laboratoriumgegevens erop wijzen dat een aanzienlijk deel van de vrouwtjes mogelijk geen regelmatige oestruscyclus (van 4 of vijf dagen) vertoont, wordt aanbevolen de oestruscycli te beoordelen vóór aanvang van de behandeling. Een andere mogelijkheid is de groepsgrootte te vergroten, zodat ten minste 20 vrouwtjes in elke groep bij aanvang van de behandeling regelmatige oestruscycli (van 4 of vijf dagen) hebben. Alle F_1-nakomelingen krijgen een unieke identificatie bij het eerste onderzoek als pasgeborene op postnatale dag (PND) 0 of 1. Van alle F_1-dieren, en F_2-dieren indien van toepassing, moeten de gegevens over het nest van herkomst het hele onderzoek worden bewaard.

▼M5

Teststof

Beschikbare informatie over de teststof

16. Het is van belang om op basis van beoordeling van bestaande informatie beslissingen te nemen over de toedieningsweg, de keuze van het medium, de keuze van de diersoort, de keuze van doseringen en mogelijke aanpassingen van het doseringsschema. Alle relevante beschikbare informatie over de teststof, d.w.z. fysisch-chemische, toxicokinetische (waaronder soortspecifiek metabolisme) en toxicodynamische eigenschappen, structuur-activiteitrelaties (SAR's), metabole processen in vitro, resultaten van eerdere toxiciteitsonderzoeken en relevante informatie over structuuranaloga, moet daarom in aanmerking worden genomen bij het plannen van het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie. Verkennende informatie over absorptie, distributie, metabolisme en eliminatie (ADME) en bioaccumulatie kan worden verkregen uit de chemische structuur, fysisch-chemische gegevens, mate van plasma-eiwitbinding of toxicokinetiekonderzoeken (TK-onderzoeken), terwijl resultaten van toxiciteitsonderzoeken aanvullende informatie geven, bv. over NOAEL, metabolisme of inductie van metabolisme.

Overweging van toxicokinetische gegevens

17. Hoewel TK-gegevens van eerder uitgevoerde doseringsbereikonderzoeken of andere onderzoeken niet vereist zijn, zijn ze buitengewoon nuttig bij het opzetten van het onderzoek, de keuze van dosisniveaus en interpretatie van resultaten. Bijzonder nuttig zijn gegevens die: 1) de blootstelling van ontwikkelende foetussen en jongen aan de teststof beoordelen (of relevante metabolieten), 2) een schatting geven van interne dosimetrie, en 3) potentiële dosisafhankelijke verzadiging van kinetische processen evalueren. Aanvullende TK-gegevens, zoals metabolietprofielen, concentratie-tijdcurves enz., moeten ook in aanmerking worden genomen, indien beschikbaar. Aanvullende TK-gegevens kunnen ook worden verzameld tijdens het hoofdonderzoek, mits dit niet de verzameling en interpretatie van de eindpunten voor het hoofdonderzoek verstoort.

Als algemeen richtsnoer is de volgende TK-dataset nuttig bij het plannen van het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie:

— late dracht (bv. drachtdag 20) — bloed van moederdier en foetus,

— halverwege zoogperiode (PND 10) — bloed van moederdier en jong en/of melk,

— vlak na spening (bv. PND 28) — bloedmonsters van gespeende dieren.

Bij het bepalen van de specifieke analyten (bv. moederstof en/of metabolieten) en/of het monsternameschema moet flexibel te werk worden gegaan. Zo is het aantal te nemen monsters en de tijdstippen ervan op een gegeven monsternamedag afhankelijk van de blootstellingsweg en eerder opgedane kennis van TK-eigenschappen bij niet-drachtige dieren. Voor onderzoeken met toediening via het voer is monstername op één vast tijdstip op elk van deze dagen voldoende, terwijl bij toediening via een maagsonde aanvullende monsternamepunten nodig kunnen zijn om een betere schatting te krijgen van de spreiding van de inwendige doses. Het is echter niet noodzakelijk om op een van de monsternamedagen het volledig verloop van de concentratie in de tijd vast te leggen. Indien noodzakelijk kan bloed per geslacht binnen nesten worden samengevoegd voor foetale en neonatale analyses.

▼M5

Toedieningsweg

18. Bij het kiezen van de weg moet(en) de weg(en) worden betrokken die het relevantste is/zijn voor menselijke blootstelling. Hoewel het protocol bedoeld is voor toediening van de teststof via het voer, kan dit worden aangepast voor toediening via andere wegen (drinkwater, maagsonde, inhalatie, dermaal), afhankelijk van de kenmerken van de stof en de vereiste informatie.

Keuze van het medium

19. Waar nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspendeerd. Aanbevolen wordt eerst te bezien of het mogelijk is een waterige oplossing/suspensie te gebruiken en als dit niet kan een oplossing/suspensie in olie (bv. maïsolie) te overwegen. Wanneer een ander medium dan water wordt gebruikt, moeten de toxische kenmerken daarvan bekend zijn. Het gebruik van media met potentiële intrinsieke toxiciteit moet worden vermeden (bv. aceton, DMSO). De stabiliteit van de teststof in het medium moet worden bepaald. Bij gebruik van een medium of een ander additief om toediening te vergemakkelijken, moet met de volgende factoren rekening worden gehouden: effecten op de absorptie, de distributie, het metabolisme of de retentie van de teststof; effecten op de chemische eigenschappen van de teststof die de toxische kenmerken daarvan kunnen veranderen, en effecten op de voedsel- of waterconsumptie of de voedingsstatus van de dieren.

Keuze van de dosis

20. Normaliter moet het onderzoek ten minste drie dosisniveaus en een gelijktijdige controle omvatten. Bij het kiezen van de juiste dosisniveaus moet de onderzoeker rekening houden met alle beschikbare informatie, waaronder de toedieningsinformatie van eerdere onderzoeken, TK-gegevens van drachtige en niet-drachtige dieren, de mate van uitscheiding in de moedermelk en schattingen van de menselijke blootstelling. Als er TK-gegevens beschikbaar zijn die wijzen op dosisafhankelijke verzadiging van TK-processen, moet erop worden gelet hoge dosisniveaus die duidelijk verzadiging vertonen te vermijden, mits uiteraard menselijke blootstellingen naar verwachting ruim onder dat verzadigingspunt liggen. In dat geval moet het hoogste dosisniveau op of net boven het buigpunt voor overgang naar niet-lineair TK-gedrag liggen.

21. Bij afwezigheid van relevante TK-gegevens moeten de dosisniveaus gebaseerd zijn op toxische effecten, tenzij de fysisch-chemische aard van de teststof dit beperkt. Als de dosisniveaus gebaseerd zijn op toxiciteit, moet de hoogste dosis zodanig worden gekozen, dat enige systemische toxiciteit geïnduceerd wordt, maar geen sterfte of ernstig lijden van de dieren.

22. Er moet een dalende reeks dosisniveaus worden gekozen om een eventueel dosisgerelateerd effect aan te kunnen tonen en NOAEL's of doses nabij de detectiegrens te kunnen bepalen waarmee een benchmarkdosis kan worden afgeleid voor het/de gevoeligste eindpunt(en). Om grote dosisintervallen tussen NOAEL's en LOAEL's te voorkomen, zijn intervallen van een factor twee tot vier vaak optimaal. Het is vaak beter een vierde testgroep toe te voegen dan een zeer groot interval (bv. meer dan een factor tien) tussen de doseringen te gebruiken.

23. Afgezien van de behandeling met de teststof worden de dieren in de controlegroep op identieke wijze behandeld als de dieren in de testgroepen. Deze groep wordt niet behandeld of krijgt placebo of krijgt, als bij de toediening van de teststof een medium wordt gebruikt, medium toegediend. Indien van een medium gebruik wordt gemaakt, dient dit aan de controlegroep in het hoogste gebruikte volume toegediend te worden.

▼M5

Grenstest

24. Als er bij een dosis van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag in onderzoeken met herhaalde toediening geen aanwijzingen zijn voor toxiciteit of als geen toxiciteit wordt verwacht op grond van gegevens van qua structuur en/of metabolisme verwante stoffen, die wijzen op vergelijkbare metabole eigenschappen in vivo/in vitro, is een onderzoek met verscheidene dosisniveaus wellicht niet noodzakelijk. In dat geval moet het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie worden uitgevoerd met een controlegroep en een enkele dosis van ten minste 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag. Worden er bij deze grensdosis echter aanwijzingen gevonden voor reproductie- of ontwikkelingstoxiciteit, dan zijn verdere onderzoeken bij lagere dosisniveaus noodzakelijk om een NOAEL vast te kunnen stellen. Deze overwegingen omtrent de grenstest zijn alleen van toepassing wanneer de menselijke blootstelling niet duidt op de noodzaak van een hoger dosisniveau.

PROCEDURES

Blootstelling van nakomelingen

25. Blootstelling via het voer is de toedieningsmethode die de voorkeur verdient. Bij onderzoeken met maagsondes moet worden opgemerkt dat de jongen normaliter de teststof alleen indirect binnenkrijgen, via de melk, totdat voor hen de directe toediening start vanaf de spening. In onderzoeken met toediening via voer of drinkwater krijgen de jongen daarnaast de teststof direct binnen wanneer ze zelf gaan eten tijdens de laatste week van de zoogperiode. Het moet worden overwogen de onderzoeksopzet aan te passen wanneer de mate van uitscheiding van de teststof in melk laag is en wanneer er onvoldoende aanwijzingen zijn voor continue blootstelling van de nakomelingen. In dat geval moet directe toediening van jongen tijdens de zoogperiode worden overwogen op grond van beschikbare TK-informatie, toxiciteit bij nakomelingen of veranderingen in biomarkers (3) (4). De voor- en nadelen moeten zorgvuldig overwogen worden alvorens onderzoeken uit te voeren met directe toediening aan jongen die worden gezoogd (5).

Doseringsschema en toediening van doses

26. Uit eerdere toxiciteitsonderzoeken met herhaalde toediening met een toereikende duur kan bepaalde informatie over oestruscycli, histopathologie van het mannelijke en vrouwelijke voortplantingssysteem en testiculaire/epididymale sperma-analyse beschikbaar zijn. De duur van de behandeling vóór paring in het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie is er daarom op gericht effecten op functionele veranderingen te detecteren die kunnen interfereren met paringsgedrag en bevruchting. De behandeling vóór paring moet lang genoeg zijn om steady-state blootstellingsomstandigheden te bereiken bij P-mannetjes en -vrouwtjes. In de meeste gevallen wordt voor beide geslachten een twee weken durende behandeling vóór paring toereikend geacht. Voor vrouwtjes beslaat dit 3-4 volledige oestruscycli, wat voldoende moet zijn voor de detectie van eventuele schadelijke effecten op de cyclus. Voor mannetjes is dit gelijkwaardig aan de tijd die nodig is voor epididymale doorvoer van rijpende spermatozoa en kunnen hierin post-testiculaire effecten op sperma gedetecteerd worden (tijdens de eindfasen van spermiatie en epididymale spermarijping) bij de paring. Aan het einde van het onderzoek, wanneer testiculaire en epididymale histopathologie en analyse van spermaparameters staan ingepland, zijn de P- en F_1-mannetjes blootgesteld geweest gedurende ten minste één volledig spermatogeneseproces ((6) (7) (8) (9) en OESO-leidraad nr. 151 (40)).

▼**M5**

27. Blootstellingsscenario's vóór paring voor mannetjes kunnen worden aangepast indien in eerdere onderzoeken testiculaire toxiciteit (verstoorde spermatogenese) of effecten op de integriteit en functie van sperma duidelijk zijn vastgesteld. Evenzo kunnen voor vrouwtjes bekende effecten van de teststof op de oestruscyclus en dus op de seksuele ontvankelijkheid verschillende blootstellingsscenario's vóór paring rechtvaardigen. In speciale gevallen kan het aanvaardbaar zijn de behandeling van de P-vrouwtjes pas te starten na een spermapositief uitstrijkje (zie OESO-leidraad nr. 151 (40)).

28. Na vaststelling van de doseringsperiode vóór paring moeten de dieren continu, zeven dagen per week tot aan de obductie, met de teststof worden behandeld. De toedieningsmethode moet voor alle dieren hetzelfde zijn. De toediening moet doorgaan tijdens de twee weken durende paringsperiode en voor P-vrouwtjes gedurende de dracht en zoogperiode tot de dag van het einde na spening. Mannetjes moeten op dezelfde manier worden behandeld tot het einde op het moment dat de F_1-dieren worden gespeend. Voor de obductie moet prioriteit moet worden gegeven aan vrouwtjes waarop op (ongeveer) dezelfde zoogdag obductie moet worden verricht. De obductie van mannetjes kan over een groter aantal dagen worden verspreid, afhankelijk van de laboratoriumfaciliteiten. Tenzij er al mee gestart is tijdens de zoogperiode, moet de directe toediening van de geselecteerde F_1-mannetjes en -vrouwtjes beginnen bij de spening en doorgaan tot de ingeplande obductie, afhankelijk van de cohorttoewijzing.

29. Wanneer stoffen via de voeding of het drinkwater worden toegediend, moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden van de teststof niet interfereren met de normale voedings- of waterbalans. Wanneer de teststof via het voer wordt toegediend, kan een constante concentratie in het voer (in ppm) of een constante dosis in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier worden gebruikt; de gekozen mogelijkheid moet gespecificeerd worden.

30. Wanneer de teststof via een maagsonde wordt toegediend, mag de in één keer toegediende hoeveelheid vloeistof normaliter niet meer zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht (maximaal 0,4 ml/100 g lichaamsgewicht voor olie, bv. maïsolie). Behalve bij irriterende of bijtende stoffen, die normaliter bij hogere concentraties hevigere effecten hebben, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er bij alle dosisniveaus hetzelfde volume wordt toegediend. De behandeling moet elke dag op hetzelfde tijdstip worden gegeven. De dosis voor elk dier moet gewoonlijk gebaseerd zijn op de meest recente individuele lichaamsgewichtsbepaling en ten minste wekelijks worden aangepast bij volwassen mannetjes en volwassen niet-drachtige vrouwtjes en elke twee dagen bij drachtige vrouwtjes en F_1-dieren tijdens de toedieningsperiode vóór spening en de twee weken na spening. Als TK-gegevens wijzen op een lage overdracht van de teststof via de placenta, moet de dosis via de maagsonde tijdens de laatste week van de dracht mogelijk worden aangepast om te voorkomen dat het moederdier een te grote toxische dosis krijgt. De behandeling van vrouwtjes mag op de dag van werpen niet plaatsvinden via een maagsonde of een andere weg waarbij het dier moet worden behandeld; het verdient de voorkeur toediening van de teststof die dag over te slaan om het geboorteproces niet te verstoren.

▼M5

Paring

31. Elk P-vrouwtje moet worden geplaatst met één willekeurig geselecteerd niet-verwant mannetje uit dezelfde dosisgroep (1:1-koppels) tot observatie van aanwijzingen voor copulatie of nadat twee weken zijn verstreken. Bij een ontoereikend aantal mannetjes, bijvoorbeeld als gevolg van sterfte van mannetjes vóór de koppeling, kan/kunnen (een) mannetje(s) die al gepaard heeft/hebben worden gekoppeld (1:1) met een tweede vrouwtje, zodat alle vrouwtjes gekoppeld worden. Dag 0 van de dracht wordt gedefinieerd als de dag waarop aanwijzingen voor paring worden bevestigd (observatie van een vaginale plug en/of sperma). De dieren moeten zo snel mogelijk worden gescheiden na observatie van aanwijzingen voor copulatie. Als na twee weken geen paring heeft plaatsgevonden, worden de dieren gescheiden zonder nog mogelijkheid te geven voor paring. Gegevens over paringskoppels moeten duidelijk geregistreerd worden.

Nestgrootte

32. Op dag 4 na de geboorte kan de grootte van de nesten worden aangepast door eliminatie van extra jongen door willekeurige selectie, zodat elk nest uiteindelijk zoveel mogelijk bestaat uit vijf mannetjes en vijf vrouwtjes. Selectieve eliminatie van jongen, bijvoorbeeld op grond van lichaamsgewicht, is niet gepast. Als het door het aantal mannelijke of vrouwelijke jongen niet mogelijk is om op vijf per geslacht per nest uit te komen, is gedeeltelijke aanpassing (bv. zes mannetjes en vier vrouwtjes) aanvaardbaar.

Selectie van jongen voor onderzoek na spening (zie figuur 1)

33. Bij de spening (omstreeks PND 21) worden jongen van alle beschikbare nesten tot 20 per dosis- en controlegroep geselecteerd voor verdere onderzoeken en aangehouden tot de geslachtsrijping (tenzij eerder testen noodzakelijk is). De jongen worden willekeurig geselecteerd, behalve dat duidelijk ondermaatse dieren (dieren met een lichaamsgewicht dat meer dan twee standaarddeviaties onder het gemiddelde gewicht van de jongen van het desbetreffende nest ligt) niet mogen worden opgenomen omdat dit geen representatieve exemplaren van de behandelgroep kunnen zijn.

Op PND 21 worden de geselecteerde F_1-jongen als volgt willekeurig toegewezen aan een van drie dierencohorten:

cohort 1 (1A en 1B) = testen op reproductie/ontwikkelingstoxiciteit,

cohort 2 (2A en 2B) = testen op ontwikkelingsneurotoxiciteit,

cohort 3 = testen op ontwikkelingsimmunotoxiciteit.

Cohort 1A: één mannetje en één vrouwtje/nest/groep (20/geslacht/groep): voorkeursselectie voor primaire beoordeling van effecten op voortplantingssystemen en van algemene toxiciteit.

Cohort 1B: één mannetje en één vrouwtje/nest/groep (20/geslacht/groep): voorkeursselectie voor follow-upbeoordeling van het voortplantingsvermogen door F_1-dieren te paren als deze beoordeeld zijn (zie OESO-leidraad nr. 117 (39)) en om aanvullende histopathologische gegevens te verkrijgen in geval van stoffen die worden verdacht van toxiciteit voor de voortplanting of het hormoonsysteem, of wanneer de resultaten van cohort 1A onduidelijk zijn.

Cohort 2A: in totaal 20 jongen per groep (10 mannetjes en 10 vrouwtjes per groep; één mannetje of één vrouwtje per nest), toegewezen voor neurogedragstesten gevolgd door neurohistopathologische beoordeling als volwassenen.

Cohort 2B: in totaal 20 jongen per groep (10 mannetjes en 10 vrouwtjes per groep; één mannetje of één vrouwtje per nest), toegewezen voor neurohistopathologische beoordeling bij de spening (PND 21 of PND 22). Bij een ontoereikend aantal dieren verdient het de voorkeur dieren toe te wijzen aan cohort 2A.

▼M5

Cohort 3: in totaal 20 jongen per groep (10 mannetjes en 10 vrouwtjes per groep; één per nest, waar mogelijk). Mogelijk zijn extra jongen uit de controlegroep nodig om te fungeren als positieve-controledieren in de T-cel-afhankelijke antilichaamresponstest (TDAR) op PND 56 ± 3.

34. Als het aantal jongen in een nest ontoereikend is om alle cohorten te kunnen vullen, heeft cohort 1 voorrang omdat deze cohort kan worden uitgebreid door productie van een F_2-generatie. In geval van een specifiek probleem, bv. als een stof wordt verdacht van neurotoxiciteit, immunotoxiciteit of reproductietoxiciteit, kunnen aanvullende jongen worden toegewezen aan een van de cohorten. Deze jongen kunnen worden gebruikt voor onderzoeken op verschillende tijdspunten of voor de beoordeling van aanvullende eindpunten. Jongen die niet aan cohorten zijn toegewezen, worden onderworpen aan klinisch biochemisch onderzoek (punt 55) en macroscopische obductie (punt 68).

Tweede paring van de P-dieren

35. Voor de P-dieren wordt een tweede paring gewoonlijk niet aanbevolen omdat dit ten koste gaat van belangrijke informatie over het aantal innestelingsplaatsen (en dus ten koste van gegevens over postinnestelings- en perinatale verliezen, indicatoren van een mogelijk teratogeen potentieel) voor het eerste nest. Als het nodig is een effect bij blootgestelde vrouwtjes te verifiëren of te verhelderen, kan het onderzoek beter uitgebreid worden met een paring van de F_1-generatie. Een tweede paring van de P-mannetjes met onbehandelde vrouwtjes is echter altijd een mogelijkheid om onduidelijke bevindingen te verhelderen of voor verdere karakterisering van bij de eerste paring waargenomen effecten op de vruchtbaarheid.

OBSERVATIES BIJ LEVENDE DIEREN

Klinische observaties

36. Voor de P- en de geselecteerde F_1-dieren wordt eenmaal daags een algemene klinische observatie verricht. In geval van toediening via een maagsonde moeten de klinische observaties vóór en na toediening plaatsvinden (vanwege mogelijke verschijnselen van toxiciteit samenhangend met piekplasmaconcentratie). Relevante gedragsveranderingen, verschijnselen van moeilijke of langdurige worp en alle verschijnselen van toxiciteit worden geregistreerd. Tweemaal daags, tijdens het weekend eenmaal daags, worden alle dieren geobserveerd op ernstige toxiciteit, ziekelijkheid en sterfte.

37. Daarnaast worden alle P- en F_1-dieren wekelijks uitgebreider onderzocht (na spening). Het is handig dit te doen op het moment dat het dier wordt gewogen, om stress van vastpakken tot een minimum te beperken. De observaties moeten zorgvuldig worden verricht en geregistreerd met scoringssystemen die zijn gedefinieerd door het testlaboratorium. Er moet zoveel mogelijk worden gezorgd dat variaties in de testomstandigheden minimaal zijn. Tekenen waarop moet worden gelet zijn onder meer (maar niet alleen): veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding, en onwillekeurige reacties zoals traanvorming, rechtopstaan van het haar, verandering van de pupilgrootte of een ongewoon ademhalingspatroon. Ook verandering in gang, houding en reactiviteit op vastpakken, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotiep gedrag (bv. overmatige lichaamsverzorging, herhaaldelijk ronddraaien) of bizar gedrag (bv. zelfverminking, achteruitlopen) moeten worden opgetekend.

▼M5

Lichaamsgewicht en consumptie van voedsel en water

38. Op de eerste toedieningsdag en ten minste wekelijks daarna worden de P-dieren gewogen. Daarnaast worden P-vrouwtjes gewogen tijdens de zoogperiode op dezelfde dagen dat de jongen in hun nesten worden gewogen (zie punt 44). Alle F_1-dieren worden elk apart gewogen bij de spening (PND 21) en ten minste wekelijks daarna. Het lichaamsgewicht wordt ook geregistreerd op de dag dat ze in de pubertijd komen (volledige loslating van de voorhuid of opening van de vagina). Alle dieren worden gewogen op het moment dat ze worden gedood.

39. Tijdens het onderzoek wordt de voedsel- en waterconsumptie (bij toediening van de teststof via het drinkwater) ten minste wekelijks geregistreerd op dezelfde dagen als de lichaamsgewichten (behalve tijdens cohabitatie). De voedselconsumptie van elke kooi met F_1-dieren wordt wekelijks geregistreerd vanaf de selectie tot een bepaalde cohort.

Oestruscycli

40. Uit eerdere toxiciteitsonderzoeken met herhaalde toediening kan al voorlopige informatie over teststof-gerelateerde effecten op de oestruscyclus beschikbaar zijn, die kan worden gebruikt bij het opzetten van een teststof-specifiek protocol voor het uitgebreide onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie. De beoordeling van de oestruscyclus (door vaginale cytologie) start gewoonlijk bij het begin van de behandelperiode en duurt tot paring bevestigd is of tot het einde van de twee weken durende paringsperiode. Als vrouwtjes zijn gescreend op normale oestruscycli vóór de behandeling, is het nuttig uitstrijkjes te blijven maken als de behandeling start, maar als er bezorgdheid bestaat over niet-specifieke effecten bij de start van de behandeling (zoals een initiële duidelijk verminderde voedselconsumptie), kunnen de dieren gedurende maximaal twee weken vóór de start van de twee weken durende uitstrijkjesperiode voorafgaand aan de koppeling op behandeling worden gezet. Als de behandelperiode voor vrouwtjes op deze wijze wordt verlengd (d.w.z. tot een behandeling vóór paring van vier weken), moet worden overwogen jongere dieren aan te schaffen en de behandelperiode voor mannetjes vóór de koppeling te verlengen. Wanneer monsters van vaginale/cervicale cellen worden genomen, moet erop worden gelet verstoring van het slijmvlies en latere inductie van schijndracht te voorkomen (10) (11).

41. Vaginale uitstrijkjes moeten dagelijks onderzocht worden voor alle F_1-vrouwtjes in cohort 1A na het optreden van vaginale opening tot het eerste uitstrijkje met verhoornde cellen is geregistreerd, zodat het tijdsinterval hiertussen kan worden bepaald. De oestruscycli voor alle F_1-vrouwtjes in cohort 1A moeten eveneens gecontroleerd worden gedurende een periode van twee weken, vanaf ongeveer PND 75. Mocht paring van de F_1-generatie noodzakelijk zijn, dan moet daarnaast de vaginale cytologie in cohort 1B worden gevolgd vanaf het moment van koppelen tot aanwijzingen voor paring zijn gedetecteerd.

Paring en dracht

42. Naast de standaardeindpunten (bv. lichaamsgewicht, voedselconsumptie, klinische observaties zoals controles op sterfte en ziekelijkheid) worden de data van koppeling, de datum van inseminatie en de datum van werpen geregistreerd en het interval vóór coïtus (koppeling tot inseminatie) en de drachtduur (inseminatie tot bevalling) berekend. De P-vrouwtjes moeten op het verwachte moment van werpen zorgvuldig onderzocht worden op verschijnselen van dystokie. Eventuele afwijkingen in nestgedrag of zoogactiviteit moeten geregistreerd worden.

▼M5

43. De dag van werpen is zoogdag 0 (lactation day 0, LD 0) voor het moederdier en postnatale dag 0 (PND 0) voor de nakomelingen. Een andere mogelijkheid is alle vergelijkingen te baseren op de tijd na coïtus om verstoring van postnatale ontwikkelingsgegevens door verschillen in drachtduur te elimineren; de tijd ten opzichte van de worp moet echter ook geregistreerd worden. Dit is met name van belang als de teststof van invloed is op de drachtduur.

Parameters met betrekking tot de nakomelingen

44. Elk nest moet zo snel mogelijk na de worp (PND 0 of 1) onderzocht worden om het aantal en geslacht van de jongen, doodgeborenen, levendgeborenen en de aanwezigheid van macroscopische afwijkingen (uitwendig zichtbare afwijkingen, zoals een gespleten gehemelte, onderhuidse bloedingen; afwijkende kleur of textuur van de huid, aanwezigheid van navelstreng; afwezigheid van melk in de maag; aanwezigheid van gedroogde afscheidingen) vast te stellen. Daarnaast moet het eerste klinische onderzoek van de neonaten een kwalitatieve beoordeling omvatten van de lichaamstemperatuur, activiteitstoestand en reactie op vastpakken. Jongen die dood zijn aangetroffen op PND 0 of op een later tijdstip moeten onderzocht worden op mogelijke afwijkingen en doodsoorzaak. Levende jongen worden geteld en elk apart gewogen op PND 0 of PND 1 en regelmatig daarna, bv. ten minste op PND 4, 7, 14 en 21. Klinische onderzoeken, zoals van toepassing voor de leeftijd van de dieren, moeten worden herhaald als de nakomelingen worden gewogen of vaker als bij de geboorte gevalspecifieke bevindingen zijn geconstateerd. Verschijnselen waarop moet worden gelet zijn onder meer (maar niet alleen): uitwendige afwijkingen, veranderingen in huid, vacht, ogen, slijmvliezen, optreden van af- en uitscheiding en onwillekeurige reacties. Ook verandering in gang, houding en reactiviteit op vastpakken, alsmede de aanwezigheid van klonische of tonische bewegingen, stereotiep gedrag of bizar gedrag moeten worden opgetekend.

45. De anogenitale afstand (AGD) van elk jong moet ten minste één keer worden gemeten vanaf PND 0 tot en met PND 4. Het lichaamsgewicht van elk jong moet worden bepaald op de dag dat de AGD wordt gemeten en de AGD moet genormaliseerd worden tot een maat voor jonggrootte, bij voorkeur de derdemachtswortel van het lichaamsgewicht (12). De aanwezigheid van tepels/tepelhof bij mannelijke jongen moet gecontroleerd worden op PND 12 of 13.

46. Alle geselecteerde F_1-dieren worden dagelijks beoordeeld op loslaten van de voorhuid van de eikel of vaginale opening voor respectievelijk mannetjes/vrouwtjes, te beginnen vóór de verwachte dag om deze eindpunten te verkrijgen en aan de hand daarvan eventuele vroege geslachtsrijping te detecteren. Alle afwijkingen van de geslachtsorganen, zoals aanhoudende vaginale thread, hypospadie of gespleten penis, moeten worden genoteerd. De geslachtsrijpheid van F_1-dieren wordt vergeleken met de lichamelijke ontwikkeling door bepaling van de leeftijd en het lichaamsgewicht bij het loslaten van de voorhuid van de eikel of de vaginale opening voor respectievelijk mannetjes/vrouwtjes (13).

Beoordeling van potentiële ontwikkelingsneurotoxiciteit (cohorten 2A en 2B)

47. Voor neurotoxiciteitsbeoordelingen worden van elke behandelgroep 10 mannelijke en 10 vrouwelijke dieren in cohort 2A en 10 mannelijke en 10 vrouwelijke dieren in cohort 2B (voor elke cohort: 1 mannetje of 1 vrouwtje per nest; alle nesten zijn met ten minste 1 jong vertegenwoordigd; willekeurig geselecteerd) gebruikt. Dieren in cohort 2A moeten worden onderworpen aan testen van de auditieve schrikreactie, „functional observational battery”, motorische activiteit (zie punten 48-50) en neuropathologische beoordelingen (zie punten 74-75). Er moet zoveel mogelijk

▼M5

worden gezorgd dat variaties in alle testomstandigheden minimaal zijn en niet systematisch samenhangen met de behandeling. Variabelen die van invloed kunnen zijn op gedrag zijn geluidsniveau (bv. intermitterend geluid), temperatuur, vochtigheid, verlichting, geuren, tijdstip van de dag en afleiding uit de omgeving. De resultaten van neurotoxiciteitstesten moeten geïnterpreteerd worden in samenhang met passende historische controlenormaalwaarden. Dieren in cohort 2B moeten worden gebruikt voor neuropathologische beoordeling op PND 21 of PND 22 (zie punten 74-75).

48. Met dieren in cohort 2A wordt een test van de auditieve schrikreactie gedaan op PND 24 (± één dag). De testdag moet evenwichtig worden verdeeld over de behandel- en controlegroepen. Elke sessie bestaat uit 50 onderzoeken. Bij de test van de auditieve schrikreactie moet de gemiddelde responsamplitude van elk blok van 10 onderzoeken (5 blokken van 10 onderzoeken) worden bepaald, met testomstandigheden die geoptimaliseerd zijn om te komen tot gewenning binnen een sessie. Deze procedures moeten worden uitgevoerd conform testmethode B.53 (35).

49. Op een passend tijdstip tussen PND 63 en PND 75 worden de dieren in cohort 2A onderworpen aan een „functional observational battery" en een geautomatiseerde test van de motorische activiteit. Deze procedures moeten worden uitgevoerd conform testmethoden B.43 (33) en B.53 (35). De „functional observational battery" omvat een uitvoerige beschrijving van het uiterlijk, het gedrag en de functionele integriteit van het proefdier. Dit wordt beoordeeld door observaties in de verblijfskooi, na verplaatsing naar een standaardarena voor observatie (open veld) waarbij het dier zich vrij beweegt en door manipulatieve testen. De testen moeten worden gedaan in volgorde van minst naar meest interactieve test. In aanhangsel 1 staat een lijst met parameters. Alle dieren moeten zorgvuldig geobserveerd worden door getrainde observeerders die niet weten welke behandeling een gegeven dier krijgt met behulp van gestandaardiseerde procedures om te zorgen voor minimale observer-variabiliteit. Waar mogelijk is het raadzaam een dier in een gegeven test door steeds dezelfde observeerder te laten beoordelen. Als dit niet mogelijk is, wordt bewijs van interobserver-betrouwbaarheid vereist. Voor elke parameter in de reeks gedragstesten moeten expliciet operationeel gedefinieerde schalen en scoringscriteria worden gebruikt. Indien mogelijk moeten objectieve kwantitatieve parameters worden ontwikkeld voor observationele eindpunten, die subjectief zijn gerangschikt. Voor de motorische activiteit wordt elk dier apart getest. De testsessie moet lang genoeg duren om gewenning binnen een sessie voor controles aan te kunnen tonen. De motorische activiteit moet worden gecontroleerd met een geautomatiseerd activiteitsregistratieapparaat dat zowel toenames als afnames in activiteit moet kunnen detecteren (d.w.z. de door het apparaat gemeten activiteit op baseline moet niet zo laag zijn dat afnames niet kunnen worden gedetecteerd en ook niet zo hoog dat toenames in activiteit niet kunnen worden gedetecteerd). Elk apparaat moet volgens standaardprocedures worden getest om een betrouwbare werking van alle apparaten op alle dagen te waarborgen, voor zover mogelijk. De behandelgroepen moeten zoveel mogelijk evenwichtig worden verdeeld over de apparaten. De behandelgroepen moeten evenwichtig worden verspreid over de testtijden om verstoring te vermijden door circadiaanse activiteitritmes.

50. Als uit bestaande informatie blijkt dat andere functietesten noodzakelijk zijn (bv. sensorisch, sociaal, cognitief), moet de integratie ervan plaatsvinden zonder dat dit ten koste gaat van de integriteit van de andere beoordelingen in het onderzoek. Als deze testen worden verricht bij dezelfde dieren als voor het testen van de standaard auditieve schrikreactie, „functional observational battery" en motorische activiteit, moeten verschillende testen worden ingepland om het risico dat dit ten koste gaat van de integriteit van deze testen tot een minimum te beperken. Aanvullende procedures kunnen vooral nuttig zijn als empirische waarnemingen, verwachte effecten of mechanistische effecten/het werkingsmechanisme duiden op een bepaalde neurotoxiciteit.

▼M5

Beoordeling van potentiële ontwikkelingsimmunotoxiciteit (cohort 3)

51. Op PND 56 (± drie dagen) moeten van elke behandelgroep 10 mannelijke en 10 vrouwelijke dieren in cohort 3 (1 mannetje of 1 vrouwtje per nest; alle nesten zijn met ten minste 1 jong vertegenwoordigd; willekeurig geselecteerd) worden gebruikt in een test van de T-cel-afhankelijke antilichaamrespons, d.w.z. de primaire respons van IgM-antilichaam op een T-celafhankelijk antigeen, zoals Sheep Red Blood Cells (SRBC) of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), conform de huidige procedures voor immunotoxiciteittesten (14) (15). De respons kan worden beoordeeld door telling van specifieke plaquevormende cellen (PFC) in de milt of door bepaling van de titer van SRBC- of KLH-specifiek IgM-antilichaam in het serum door middel van ELISA op de piek van de respons. De piek van de respons treedt doorgaans vier (PFC-respons) of vijf (ELISA) dagen op na intraveneuze immunisatie. Als de primaire antilichaamrespons wordt getest door telling van plaquevormende cellen is beoordeling van subgroepen van dieren op afzonderlijke dagen toegestaan, mits: het tijdstip van immunisatie en doding van de subgroepen zo valt, dat PFC's worden geteld op de piek van de respons; de subgroepen een gelijk aantal mannelijke en vrouwelijke nakomelingen uit alle dosisgroepen bevatten, met inbegrip van controles, en de subgroepen worden beoordeeld op ongeveer dezelfde postnatale leeftijd.Blootstelling aan de teststof duurt voort tot de dag vóór verzameling van milten voor de PFC-respons of serum voor de ELISA-test.

Follow-upbeoordeling van potentiële reproductietoxiciteit (cohort 1B)

52. Indien nodig kunnen dieren in cohort 1B worden doorbehandeld na PND 90 om er een F_2-generatie mee te fokken. Mannetjes en vrouwtjes van dezelfde dosisgroep moeten samen worden ondergebracht (waarbij samenplaatsing van siblings wordt voorkomen) gedurende maximaal twee weken, en wel vanaf of na PND 90, maar niet tot na PND 120. De procedures moeten op vergelijkbare wijze verlopen als voor de P-dieren. Op grond van bewijskracht kan het echter volstaan de nesten te beëindigen op PND 4 in plaats van ze te volgen tot de spening of daarna.

OBSERVATIES AAN EINDE ONDERZOEK

Biochemisch onderzoek/hematologie

53. Bij de P-dieren moeten systemische effecten worden gecontroleerd. Aan het einde worden van 10 willekeurig geselecteerde nuchtere P-mannetjes en -vrouwtjes per dosisgroep bloedmonsters genomen van een gedefinieerde plaats, die onder de juiste omstandigheden worden bewaard en worden onderworpen aan gedeeltelijke of volledige hematologische en klinisch-biochemische bepalingen, T4- en TSH-test of andere onderzoeken die aangewezen zijn op basis van het bekende effectprofiel van de teststof (zie OESO-leidraad nr. 151 (40)). De volgende hematologische parameters moeten worden onderzocht: hematocriet, hemoglobinegehalte, aantal rode bloedcellen, totaal aantal en gedifferentieerde aantallen witte bloedcellen, aantal bloedplaatjes en bloedstollingstijd/vermogen. Onderzoeken van plasma of serum moeten bestaan uit: glucose, totaal cholesterol, ureum, creatinine, totaal eiwit, albumine en ten minste twee enzymen die indicatief zijn voor hepatocellulaire effecten (zoals alanineaminotranferase, aspartaataminotransferase, alkalisch fosfatase, gammaglutamyltranspeptidase en sorbitoldehydrogenase). Bepaling van andere enzymen en galzuren kan onder bepaalde omstandigheden nuttige informatie geven. Daarnaast kan bloed van andere dieren worden afgenomen en bewaard voor mogelijke analyse op een later moment om onduidelijke effecten te helpen verhelderen of om gegevens over inwendige blootstelling te verkrijgen. Als er geen tweede paring van P-dieren gepland staat, worden de bloedmonsters genomen vlak vóór of als onderdeel van de procedure bij het

▼M5

ingeplande doden van dieren. In het geval dat de dieren behouden blijven, moeten enkele dagen vóór men de dieren voor de tweede keer laat paren bloedmonsters worden verzameld. Tenzij uit bestaande gegevens van onderzoeken met herhaalde toediening blijkt dat de parameter niet wordt beïnvloed door de teststof, moet vóór het einde urineonderzoek worden gedaan met beoordeling van de volgende parameters: uiterlijk, volume, osmolaliteit of soortelijk gewicht, pH, eiwit, glucose, bloed en bloedcellen, celdébris. Urine kan ook worden verzameld om de uitscheiding van de teststof en/of metaboliet(en) te controleren.

54. Systemische effecten moeten ook gecontroleerd worden bij de F_1-dieren. Aan het einde worden van 10 willekeurig geselecteerde nuchtere mannetjes en vrouwtjes in cohort 1A per dosisgroep bloedmonsters genomen van een gedefinieerde plaats, die onder de juiste omstandigheden worden bewaard en worden onderworpen aan standaard klinisch-biochemische bepalingen, waaronder de beoordeling van serumspiegels van schildklierhormonen (T4 en TSH), hematologie (totaal aantal en gedifferentieerde aantallen witte bloedcellen plus aantal rode bloedcellen) en urineonderzoek.

55. Op de overtollige jongen op PND 4 wordt macroscopische obductie verricht en bepaling van schildklierhormoon- (T4) concentraties in serum dient overwogen te worden. Indien nodig kan neonataal (PND 4) bloed per nest worden samengevoegd voor biochemische/schildklierhormoonanalyses. Er wordt ook bloed afgenomen voor T4-en TSH-analyse van gespeende dieren tot de macroscopische obductie op PND 22 (F_1-jongen die niet geselecteerd zijn voor cohorten).

Spermaparameters

56. Bij alle mannetjes van de P-generatie moeten de spermaparameters worden bepaald, tenzij uit bestaande gegevens blijkt dat de spermaparameters niet worden beïnvloed in een 90 dagen durend onderzoek. Het onderzoek van de spermaparameters moet worden verricht bij alle mannetjes in cohort 1A.

57. Aan het einde worden voor alle P- en F_1-mannetjes (cohort 1A) de teelbal- en bijbalgewichten geregistreerd. Ten minste één teelbal en één bijbal worden gereserveerd voor histopathologisch onderzoek. De resterende bijbal wordt gebruikt voor de telling van spermareserves in de cauda epididymis (16) (17). Daarnaast wordt sperma verzameld uit de cauda epididymis (of zaadleider) via methoden waarbij schade voor beoordeling van de motiliteit en morfologie (18) van het sperma tot een minimum beperkt wordt.

58. De spermamotiliteit kan onmiddellijk na het doden beoordeeld worden of geregistreerd worden voor latere analyse. Het percentage progressief beweeglijk sperma kan subjectief worden bepaald, of objectief door middel van geautomatiseerde bewegingsanalyse (19) (20) (21) (22) (23) (24). Voor de beoordeling van de morfologie van het sperma moet een monster van sperma uit de bijbal (of zaadleider) onderzocht worden als gefixeerde of natte preparaten (25) en moeten ten minste 200 spermatozoa per monster worden ingedeeld als normaal (zowel de kop als het middendeel/staart ziet er normaal uit) of abnormaal. Voorbeelden van morfologische spermaafwijkingen zijn fusie, geïsoleerde koppen en misvormde koppen en/of staarten (26). Misvormde of grote spermakoppen kunnen wijzen op afwijkingen in de spermiatie.

59. Na invriezen van spermamonsters, fixatie van preparaten en registratie van beelden voor spermamotiliteitanalyse op het moment van obductie (27), kan latere analyse worden beperkt tot controle- en hogedosismannetjes. Indien echter behandelingsgerelateerde effecten worden waargenomen, moeten de lagedosisgroepen eveneens worden beoordeeld.

▼M5

Macroscopische obductie

60. Bij beëindiging van het onderzoek of na voortijdige sterfte wordt op alle P- en F_1-dieren obductie verricht en worden ze macroscopisch onderzocht op structuurafwijkingen of pathologische veranderingen. Bijzondere aandacht moet worden geschonken aan de organen van het voortplantingssysteem. Jongen die om humane redenen in stervende toestand zijn gedood en dode jongen moeten geregistreerd en, wanneer er geen sprake is van maceratie, onderzocht op mogelijke afwijkingen en/of doodsoorzaak en geconserveerd worden.

61. Voor volwassen P- en F_1-vrouwtjes wordt een vaginaal uitstrijkje onderzocht op de dag van obductie om de fase van de oestruscyclus te bepalen en dit in verband te kunnen brengen met de histopathologie in de voortplantingsorganen. De baarmoeders van alle P-vrouwtjes (en F_1-vrouwtjes, indien van toepassing) worden onderzocht op de aanwezigheid van innestelingsplaatsen en het aantal ervan, en wel zodanig dat dit geen belemmering vormt voor histopathologische beoordeling.

Gewicht van organen en conservering van weefsels — volwassen P- en F_1-dieren

62. Aan het einde van het onderzoek worden van alle P-dieren en alle volwassen F_1-dieren uit relevante cohorten (zoals hieronder vermeld) lichaamsgewichten en natte gewichten van de onderstaande organen bepaald. Dit dient zo snel mogelijk na excisie te gebeuren om uitdroging te voorkomen. Deze organen worden vervolgens onder passende omstandigheden geconserveerd. Tenzij anders vermeld kunnen dubbele organen afzonderlijk of samen worden gewogen, al naargelang van de gebruikelijke praktijk van het uitvoerende laboratorium.

— baarmoeder (met eileiders en baarmoederhals), eierstokken,

— teelballen, bijballen (totaal en cauda epididymis voor de monsters voor spermatellingen),

— prostaat (dorsolaterale en ventrale delen gecombineerd). Het prostaatcomplex moet voorzichtig worden ontdaan van aanhechtend weefsel om te voorkomen dat de met vloeistof gevulde zaadblaasjes lek raken. In het geval van een behandelingsgerelateerd effect op het totale prostaatgewicht, moeten de dorsolaterale en ventrale segmenten na fixatie voorzichtig worden uitgesneden en apart worden gewogen,

— zaadblaasjes met coagulans uitscheidende klieren en het vocht erin (als één geheel),

— hersenen, lever, nieren, hart, milt, thymus, hypofyse, schildklier (na fixatie), bijnieren en bekende doelorganen of -weefsels.

63. Naast de bovenstaande organen moeten monsters van perifere zenuwen, spieren, ruggenmerg, ogen plus oogzenuw, maag-darmkanaal, blaas, long, luchtpijp (met schildklier en bijschildklier eraan bevestigd), beenmerg, zaadleiders (mannetjes), borstklier (mannetjes en vrouwtjes) en de vagina geconserveerd worden onder passende omstandigheden.

64. Van dieren in cohort 1A worden alle organen gewogen en geconserveerd voor histopathologie.

65. Voor onderzoek van pre- en postnataal geïnduceerde immunotoxische effecten wordt met 10 mannelijke en 10 vrouwelijke dieren in cohort 1A van elke behandelgroep (1 mannetje of 1 vrouwtje per nest; alle nesten zijn met ten minste 1 jong vertegenwoordigd; willekeurig geselecteerd) aan het einde het volgende verricht:

— wegen van de lymfeklieren die verband houden met de blootstellingsweg en zich op afstand daarvan bevinden (naast de reeds uitgevoerde gewichtsbepaling van de bijnieren, de thymus en de milt bij alle dieren in cohort 1A),

▼M5

— analyse van subpopulaties van miltlymfocyten (CD4+ en CD8+ T-lymfocyten, B-lymfocyten en naturalkillercellen), waarbij één helft van de milt wordt gebruikt en de andere helft van de milt wordt geconserveerd voor histopathologische beoordeling.

Uit analyse van subpopulaties van miltlymfocyten bij niet-geïmmuniseerde (cohort 1A) dieren is te bepalen of de blootstelling gerelateerd is aan een verschuiving in de immunologische steady state distributie van „helper”-lymfocyten (CD4+) of cytotoxische (CD8+), van de thymus afkomstige lymfocyten of naturalkiller- (NK) cellen (snelle responsen op neoplastische cellen en pathogenen).

66. Van dieren in cohort 1B worden de volgende organen gewogen en de corresponderende weefsels ervan verwerkt tot blokken:

— vagina (niet gewogen),

— baarmoeder met baarmoederhals,

— eierstokken,

— teelballen (ten minste één),

— epididymides,

— zaadblaasjes met coagulans uitscheidende klieren,

— prostaat,

— hypofyse,

— vastgestelde doelorganen.

Histopathologie in cohort 1B wordt verricht indien de resultaten van cohort 1A twijfelachtig zijn of in geval van stoffen die worden verdacht van toxiciteit voor de voortplanting of het hormoonsysteem.

67. Cohorten 2A en 2B: testen op ontwikkelingsneurotoxiciteit (PND 21 of PND 22 en volwassen nakomelingen). Dieren in cohort 2A worden afgemaakt na gedragstesten, met registratie van hersengewicht en volledige neurohistopathologie ten behoeve van neurotoxiciteitsbeoordeling. Dieren in cohort 2B worden afgemaakt op PND 21 of PND 22, met registratie van hersengewicht en microscopisch onderzoek van de hersenen ten behoeve van neurotoxiciteitsbeoordeling. Perfusiefixatie is vereist voor dieren in cohort 2A en eventueel voor dieren in cohort 2B, zie testmethode B.53 (35).

Gewicht van organen en conservering van weefsels — gespeende F_1-dieren

68. De jongen die niet geselecteerd zijn voor cohorten, met inbegrip van ondermaatse dieren, worden afgemaakt na spening, op PND 22, tenzij uit de resultaten blijkt dat verder onderzoek bij levende dieren noodzakelijk is. Op de afgemaakte jongen wordt macroscopische obductie verricht, waaronder een beoordeling van de voortplantingsorganen, zoals beschreven in punten 62 en 63. Van maximaal 10 jongen per geslacht per groep uit zoveel mogelijk nesten moeten de hersenen, milt en thymus worden gewogen en onder de juiste omstandigheden worden bewaard. Daarnaast kan van deze mannelijke en vrouwelijke jongen borstweefsel geconserveerd worden voor nadere microscopische analyse ([1]) (zie OESO-leidraad nr. 151 (40)). Macroscopische afwijkingen en doelweefsels moeten worden bewaard voor mogelijk histologisch onderzoek.

([1]) Uit onderzoek is gebleken dat de borstklier, in het bijzonder in de vroege ontwikkeling van de borstklier, een gevoelig eindpunt is voor oestrogene werking. Het wordt aanbevolen eindpunten betreffende de borstklieren van jongen van beide geslachten in deze testmethode op te nemen, indien gevalideerd.

▼M5

Histopathologie — P-dieren

69. Voor alle hogedosis- en controle-P-dieren wordt volledige histopathologie van de in punten 62 en 63 vermelde organen verricht. Organen die behandelingsgerelateerde veranderingen vertonen, moeten ook worden onderzocht bij alle dieren in de lagedosisgroepen om een NOAEL te helpen bepalen. Daarnaast moeten voortplantingsorganen van alle dieren bij wie vermoeden bestaat van verminderde vruchtbaarheid, bv. dieren die niet paarden of drachtig werden of geen nakomelingen verwekten of gezonde nakomelingen voortbrachten of waarvan de oestruscyclus of het aantal, de motiliteit of de morfologie van de spermatozoa negatief was beïnvloed, en alle macroscopische letsels worden onderworpen aan histopathologische evaluatie.

Histopathologie — F_1-dieren

Dieren in cohort 1

70. Voor alle hogedosis- en volwassen controledieren in cohort 1A wordt een volledig histopathologisch onderzoek van de in punten 62 en 63 vermelde organen verricht. Alle nesten moeten met ten minste 1 jong per geslacht vertegenwoordigd zijn. Organen en weefsels die behandelingsgerelateerde veranderingen vertonen en alle macroscopische letsels moeten ook worden onderzocht bij alle dieren in de lagedosisgroepen om een NOAEL te helpen bepalen. Voor de beoordeling van pre- en postnataal geïnduceerde effecten op de lymfeorganen moet ook de histopathologie van de verzamelde lymfeklieren en het verzamelde beenmerg worden beoordeeld van 10 mannelijke en 10 vrouwelijke dieren in cohort 1A, naast de reeds verrichte histopathologische beoordeling van de thymus, milt en bijnieren bij alle dieren in cohort 1A.

71. Voortplantings- en hormonale weefsels van alle dieren in cohort 1B, verwerkt tot blokken zoals beschreven in punt 66, moeten histopathologisch worden onderzocht in geval van stoffen die worden verdacht van toxiciteit voor de voortplanting of het hormoonsysteem. Cohort 1B moet ook histologisch onderzocht worden bij twijfelachtige resultaten van cohort 1A.

72. Eierstokken van volwassen vrouwtjes moeten primordiale en groeiende follikels alsook corpora lutea bevatten. Een histopathologisch onderzoek moet daarom gericht zijn op het vaststellen van een kwantitatieve beoordeling van primordiale en kleine groeiende follikels alsook corpora lutea bij F_1-vrouwtjes; het aantal dieren, de keuze van de eierstokcoupe en de grootte van het coupemonster moeten statistisch passend zijn voor de gebruikte beoordelingsprocedure. De telling van follikels kan eerst worden uitgevoerd bij de controle- en hogedosisdieren en in het geval van een schadelijk effect bij de laatstgenoemde, moeten lagedosisdieren worden onderzocht. Het onderzoek moet bestaan uit telling van het aantal primordiale follikels en kan worden gecombineerd met de telling van kleine groeiende follikels ter vergelijking van behandelde en controle-eierstokken (zie OESO-leidraad nr. 151 (40)). Beoordeling van de corpora lutea moet parallel aan het testen van de oestruscyclus worden uitgevoerd, zodat de cyclusfase in de beoordeling kan worden meegenomen. Er wordt onderzocht of de eileiders, baarmoeder en vagina op de juiste, orgaantypische wijze zijn ontwikkeld.

73. Met de F_1-mannetjes wordt gedetailleerd histopathologisch onderzoek van de teelballen verricht om behandelingsgerelateerde effecten op de teelbaldifferentiatie en -ontwikkeling en op de spermatogenese vast te stellen (38). Indien mogelijk moeten coupes van de rete testis onderzocht worden. Er wordt onderzocht of de caput, corpus en cauda van de bijbal en de zaadleiders op de juiste, orgaantypische wijze zijn ontwikkeld. Ook worden de parameters ervan onderzocht die voor de P-mannetjes vereist zijn.

▼M5

Dieren in cohort 2

74. Voor alle hogedosis- en controledieren in cohort 2A wordt per geslacht neurohistopathologisch onderzoek verricht na afronding van de gedragstesten (na PND 75, maar niet later dan PND 90). Per geslacht worden van alle hogedosis- en controledieren in cohort 2B de hersenen histopathologisch onderzocht op PND 21 of PND 22. Organen of weefsels die behandelingsgerelateerde veranderingen vertonen, moeten ook worden onderzocht voor de dieren in de lagedosisgroepen om een NOAEL te helpen bepalen. Voor dieren in cohort 2A en 2B wordt een aantal coupes van de hersenen onderzocht voor onderzoek van bulbus olfactorius, hersenschors, hippocampus, basale ganglia, thalamus, hypothalamus, middenhersenen (tectum, tegmentum en hersensteel), hersenstam en kleine hersenen. Alleen voor cohort 2A worden de ogen (netvlies en oogzenuw) en monsters van de perifere zenuwen, spieren en het ruggenmerg onderzocht. Alle neurohistologische procedures moeten worden uitgevoerd conform testmethode B.53 (35).

75. Er moeten morfometrische (kwantitatieve) evaluaties worden verricht van representatieve gebieden van de hersenen (homologe coupes die zorgvuldig zijn geselecteerd op grond van betrouwbare microscopische mijlpalen) en dit kan bestaan uit lengte- en/of oppervlaktebepalingen van specifieke hersengebieden. Bij elke mijlpaal (niveau) moeten ten minste drie opeenvolgende coupes worden genomen, zodat de meest homologe en representatieve coupe voor het te beoordelen specifieke hersengebied geselecteerd kan worden. De neuropatholoog moet nauwkeurig nagaan of bepaalde voor de bepaling vervaardigde coupes homoloog zijn met andere coupes in de monsterset en daarmee geschikt zijn voor opname omdat vooral lengtebepalingen over een relatief korte afstand kunnen veranderen (28). Niet-homologe coupes mogen niet worden gebruikt. Beoogd wordt alle dieren die voor dit doel gereserveerd zijn te bemonsteren (10/geslacht/dosisniveau), maar kleinere aantallen kunnen toch toereikend zijn. Het wordt voor de doeleinden van deze testmethode echter doorgaans niet voldoende geacht monsters te nemen van minder dan zes dieren/geslacht/dosisniveau. Stereologie kan worden gebruikt om behandelingsgerelateerde effecten op parameters, zoals volume of celaantallen voor specifieke neuroanatomische gebieden, te identificeren. Bij alle aspecten van de preparatie van weefselmonsters, d.w.z. vanaf de weefselfixatie tot en met de dissectie van weefselmonsters, weefselbewerking en kleuren van de glaasjes, moet evenwichtig te werk worden gegaan, zodat elke partij representatieve monsters van elke dosisgroep bevat. Wanneer morfometrische of stereologische analyses moeten worden toegepast, moet hersenweefsel bij alle dosisniveaus op hetzelfde moment in geschikte media worden ingebed om artefacten als gevolg van krimp die kan optreden bij langdurig bewaren in fixatiemiddel te voorkomen.

RAPPORTAGE

Gegevens

76. Gegevens worden afzonderlijk gerapporteerd en in tabelvorm samengevat. Indien van toepassing moet voor elke testgroep en elke generatie het volgende gerapporteerd worden: aantal dieren bij aanvang van de test, aantal dieren dat dood is aangetroffen tijdens de test of is gedood om humane redenen, tijdstip van sterfte of humane doding, aantal vruchtbare dieren, aantal drachtige vrouwtjes, aantal vrouwtjes dat een nest heeft geworpen en aantal dieren met verschijnselen van toxiciteit. Er moet ook een beschrijving worden gegeven van de toxiciteit, waaronder tijdstip van aanvang, duur en ernst.

77. Numerieke resultaten moeten met behulp van een geschikte en erkende statistische methode worden geëvalueerd. De statistische methoden moeten worden gekozen als onderdeel van de onderzoeksopzet en op passende wijze niet-normale gegevens (bv. gegevens over aantallen), gecensureerde

▼M5

gegevens (bv. beperkte observatietijd), niet-onafhankelijkheid (bv. nesteffecten en herhaalde parameters) en ongelijke varianties behandelen. Gegeneraliseerde lineaire gemengde modellen en de dosis-responsmodellen omvatten een brede klasse van analytische instrumenten die geschikt kunnen zijn voor de gegevens die met deze testmethode worden gegenereerd. Het verslag moet voldoende informatie over de analysemethode en het gebruikte computerprogramma bevatten, zodat een onafhankelijke evaluator/statisticus de analyse (opnieuw) kan evalueren.

Evaluatie van de resultaten

78. De bevindingen moeten geëvalueerd worden aan de hand van de waargenomen effecten, met inbegrip van obductie en microscopische bevindingen. De evaluatie omvat het verband, of het ontbreken daarvan, tussen de dosis en de aanwezigheid, incidentie en ernst van afwijkingen, waaronder macroscopische letsels. Ook moeten doelorganen, vruchtbaarheid, klinische afwijkingen, gegevens over voortplanting en nestproductie, veranderingen in lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxische effecten en effecten op de ontwikkeling worden beoordeeld. Bijzondere aandacht moet worden geschonken aan geslachtsspecifieke veranderingen. Bij beoordeling van de testresultaten moet rekening worden gehouden met de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof en, indien beschikbaar, TK-gegevens, zoals overdracht via de placenta en uitscheiding in de melk.

Testverslag

79. In het testverslag moet de volgende informatie die in het onderhavige onderzoek is verkregen van P-, F_1- en F_2-dieren aan de orde komen (voor zover relevant):

Teststof:

— alle relevante beschikbare informatie over de stof, toxicokinetische en toxicodynamische eigenschappen van de teststof,

— identificatiegegevens,

— zuiverheid.

Medium (indien van toepassing):

— motivering voor de keuze van het medium, indien geen water wordt gebruikt.

Proefdieren:

— gebruikte soort/stam,

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren,

— herkomst, huisvesting, voer, nestmateriaal enz.,

— gewicht van elk dier aan het begin van de test,

— gegevens over vaginale uitstrijkjes voor P-vrouwtjes vóór aanvang van de behandeling (indien daar op dat moment gegevens over zijn verzameld),

— gegevens over koppeling van de P-generatie, met vermelding van de mannelijke en vrouwelijke partner van een paring en succes van de paring,

— gegevens over nest van herkomst voor volwassen dieren van de F_1-generatie.

Testomstandigheden:

— motivering van de keuze van de dosisniveaus,

— bijzonderheden over de formulering van de teststof, respectievelijk de samenstelling van het voer, verkregen concentraties,

▼M5

— stabiliteit en homogeniteit van het preparaat in het medium of de drager (bv. voer, drinkwater), in het bloed en/of de melk onder de gebruiksomstandigheden en opslag tussen de gebruiksmomenten,

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof,

— omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) naar de verkregen dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing,

— gedetailleerde gegevens over het voedsel en de waterkwaliteit (waaronder samenstelling voer, indien beschikbaar),

— gedetailleerde beschrijving van de randomisatieprocedures voor de selectie van te ruimen jongen en de toewijzing van jongen aan testgroepen,

— omgevingsomstandigheden,

— lijst van onderzoeksmedewerkers, inclusief beroepsopleiding.

Resultaten (beknopte en afzonderlijke gegevens naar geslacht en dosis):

— voedselconsumptie, waterconsumptie indien beschikbaar, voedselefficiëntie (lichaamsgewichttoename per gram geconsumeerd voedsel, behalve gedurende de cohabitatie- en zoogperiode) en consumptie van teststof (voor toediening via het voer/drinkwater) voor P- en F_1-dieren,

— absorptiegegevens (indien beschikbaar),

— lichaamsgewichtgegevens voor P-dieren,

— lichaamsgewichtgegevens voor de geselecteerde F_1-dieren na spening,

— tijdstip van sterfte tijdens het onderzoek en of de dieren overleefden tot het einde van het onderzoek,

— aard, ernst en duur van (al dan niet reversibele) klinische observaties,

— gegevens over hematologie, urineonderzoek en klinische chemie, waaronder TSH en T4,

— fenotypische analyse van miltcellen (T-, B-, NK-cellen),

— cellulariteit van het beenmerg,

— gegevens over toxische responsen,

— aantal P- en F_1-vrouwtjes met een normale of abnormale oestruscyclus en cyclusduur van deze vrouwtjes,

— tijd tot paring (interval vóór coïtus, het aantal dagen tussen koppeling en paring),

— toxische of andere effecten op de voortplanting, waaronder aantallen en percentages van dieren die hebben gepaard, geworpen en gezoogd en drachtig zijn geraakt, van mannetjes die bij een vrouwtje dracht hebben bewerkstelligd, van vrouwtjes met verschijnselen van dystokie/langdurige of moeilijke worp,

— duur van de dracht en, indien beschikbaar, van de worp,

— aantal innestelingen, nestgrootte en percentage mannelijke jongen,

— aantal en percentage gestorven dieren na innesteling, levendgeborenen en doodgeborenen,

▼M5

— gewichtsgegevens van de nesten en jongen (mannetjes, vrouwtjes en gecombineerd), het aantal ondermaatse dieren, indien bepaald,

— aantal jongen met macroscopisch zichtbare afwijkingen,

— toxische of andere effecten op nakomelingen, postnatale groei, levensvatbaarheid enz.,

— gegevens over lichamelijke mijlpalen bij jongen en andere gegevens over de postnatale ontwikkeling,

— gegevens over de geslachtsrijping van F_1-dieren,

— gegevens over functionele observaties bij jongen en volwassenen, in voorkomende gevallen,

— lichaamsgewicht bij doding en gegevens over het absolute en relatieve orgaangewicht voor de P-dieren en volwassen F_1-dieren,

— obductiebevindingen,

— gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen,

— totaal aantal spermatozoa in de cauda epididymis, percentage progressief beweeglijke spermatozoa, percentage morfologisch normale spermatozoa en percentage spermatozoa met elke vastgestelde afwijking voor P- en F_1-mannetjes,

— aantallen en rijpingsstadia van follikels in de eierstokken van P- en F_1-vrouwtjes, indien van toepassing,

— telling van corpora lutea in de eierstokken van F_1-vrouwtjes,

— statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing.

Parameters van cohort 2:

— gedetailleerde beschrijving van de gebruikte procedures voor de standaardisatie van observaties en procedures en operationele definities voor het scoren van observaties,

— lijst van alle gebruikte testprocedures en een motivering van het gebruik ervan,

— gedetailleerde gegevens over de gebruikte gedrags/functie-, neuropathologische en morfometrische procedures, waaronder informatie en details over geautomatiseerde apparatuur,

— procedures om apparatuur te ijken en om de gelijkwaardigheid van apparatuur te waarborgen en om evenwichtige behandelgroepen te krijgen bij het testen,

— korte motivering waarin beslissingen genomen op basis van professioneel oordeel uiteengezet worden,

— gedetailleerde beschrijving van alle gedrags/functie-, neuropathologische en morfometrische bevindingen naar geslacht en dosisgroep, met inbegrip van zowel toenames als afnames ten opzichte van controles,

— hersengewicht,

— diagnoses gesteld op basis van neurologische verschijnselen en letsels, waaronder natuurlijk voorkomende ziekten of aandoeningen,

— beelden van voorbeeldige bevindingen,

— lageresolutiebeelden ter beoordeling van de homologie van coupes die zijn gebruikt voor morfometrie,

▼M5

— statistische behandeling van resultaten, met inbegrip van statistische modellen die zijn gebruikt voor analyse van de gegevens, en de resultaten, ongeacht de significantie ervan,

— verband van eventuele andere toxische effecten met een conclusie over het neurotoxische potentieel van de teststof, naar geslacht en dosisgroep,

— invloed van eventuele toxicokinetische informatie op de conclusies,

— gegevens die de betrouwbaarheid en gevoeligheid van de testmethode ondersteunen (d.w.z. positieve en historische controlegegevens),

— eventuele verbanden tussen neuropathologische en functie-effecten,

— NOAEL- of benchmarkdosis voor moederdieren en nakomelingen, naar geslacht en dosisgroep,

— discussie over de algehele interpretatie van de gegevens op grond van de resultaten, waaronder een conclusie over de vraag of de teststof al dan niet ontwikkelingsneurotoxiciteit veroorzaakte en de NOAEL.

Parameters van cohort 3:

— IgM-antilichaamtiters in serum (sensibilisatie voor SRBC of KLH) of IgM PFC-eenheden in de milt (sensibilisatie voor SRBC),

— de prestatie van de TDAR-methode moet in het kader van optimalisatie worden bevestigd door de test voor het eerst door een laboratorium te laten opzetten en deze periodiek (bv. jaarlijks) door alle laboratoria te laten opzetten,

— discussie over de algehele interpretatie van de gegevens op grond van de resultaten, waaronder een conclusie over het feit of de teststof ontwikkelingsimmunotoxiciteit veroorzaakte en de NOAEL.

Bespreking van de resultaten:

Conclusies, onder meer over NOAEL-waarden voor effecten op parentale generatie en nakomelingen

Alle informatie die niet tijdens het onderzoek is verkregen, maar wel nuttig is voor de interpretatie van de resultaten (bv. overeenkomsten van effecten met bekende neurotoxische stoffen), moet ook worden verstrekt.

Interpretatie van de resultaten

80. Een uitgebreid onderzoek naar reproductietoxiciteit over één generatie geeft informatie over de effecten van herhaalde blootstelling aan een stof tijdens alle fasen van de voortplantingscyclus, zo nodig. Het onderzoek geeft met name informatie over het voortplantingssysteem en over de ontwikkeling, groei, overleving en functie-eindpunten van nakomelingen tot PND 90.

81. Bij de interpretatie van de resultaten van het onderzoek moet alle beschikbare informatie over de stof, waaronder fysisch-chemische, toxicokinetische en toxicodynamische eigenschappen, beschikbare relevante informatie over structuuranaloga en resultaten van eerder uitgevoerde toxiciteitsonderzoeken met de teststof (bv. acute toxiciteit, toxiciteit na herhaalde blootstelling, mechanistische onderzoeken en onderzoeken waarin wordt beoordeeld of er tussen soorten aanzienlijke kwalitatieve en kwantitatieve verschillen bestaan in metabole eigenschappen in vivo of in vitro), in aanmerking worden genomen. Resultaten van macroscopische obductie en orgaangewichten moeten indien mogelijk worden beoordeeld in samenhang met observaties die zijn verricht in andere onderzoeken met herhaalde toediening. Afnames in groei van nakomelingen zouden in verband kunnen staan met een invloed van de teststof op de melksamenstelling (29).

▼M5

Cohort 2 (ontwikkelingsneurotoxiciteit)

82. Neurogedrags- en neuropathologische resultaten moeten in samenhang met alle bevindingen worden geïnterpreteerd, onder gebruikmaking van een op bewijskracht gebaseerde aanpak met oordeel van deskundigen. Patronen van gedrags- of morfologische bevindingen, indien aanwezig, en aanwijzingen voor dosisrespons moeten worden besproken. De beoordeling van ontwikkelingsneurotoxiciteit, waaronder epidemiologische onderzoeken of casereports met mensen en onderzoeken met proefdieren (bv. toxicokinetische gegevens, structuur-activiteitinformatie, gegevens uit andere toxiciteitsonderzoeken), moet bij deze karakterisering worden meegenomen. Bij de beoordeling van de gegevens moet zowel de biologische als de statistische significantie worden besproken. De beoordeling moet het eventuele verband tussen waargenomen neuropathologische en gedragsveranderingen omvatten. Zie voor richtsnoeren over de interpretatie van resultaten op het gebied van ontwikkelingsneurotoxiciteit testmethode B.53 (35) en Tyl et al., 2008 (31).

Cohort 3 (ontwikkelingsimmunotoxiciteit)

83. Onderdrukking of verbetering van de immuunfunctie die is vastgesteld met behulp van TDAR (T-cel-afhankelijke antilichaamrespons) moet worden beoordeeld in samenhang met alle verrichtte observaties. De significantie van de uitkomst van TDAR kan worden ondersteund door andere effecten op immunologisch gerelateerde indicatoren (bv. cellulariteit van het beenmerg, gewicht en histopathologie van lymfeweefsels, distributie van lymfocyten-subgroepen). Door TDAR vastgestelde effecten kunnen minder betekenisvol zijn in het geval van andere toxiciteiten die bij lagere blootstellingsconcentraties zijn waargenomen.

84. OESO-leidraad nr. 43 dient te worden geraadpleegd voor hulp bij de interpretatie van resultaten op het gebied van toxiciteit en neurotoxiciteit.

LITERATUUR

1. Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), „A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment", Critical Reviews in Toxicology, 36, 69-98.

2. Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), „Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets", Lab. Anim. Sci., 49, 530- 536.

3. Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

4. Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), „Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group", International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

5. Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), „Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment", Toxicological Sciences, 49, 1-4.

6. Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), „Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey", Journal of the American College of Toxicologists, 14, 293-327.

7. Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), „Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility", Regulatory Toxicology and Pharmacology, 37, 356-369.

▼M5

8. Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). „Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies", Journal of Toxicological Sciences, 25, 1-21.

9. Creasy, D.M. (2003), „Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology", Birth Defects Research, Part B, 68, 408-415.

10. Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), „The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies", Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

11. Sadleir, R.M.F.S. (1979), „Cycles and Seasons", in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

12. Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

13. Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), „Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat", Biological Reproduction, 17, 298-303.

14. Ladics, G.S. (2007), „Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing", Methods, 41, 9-19.

15. Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), „Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation", Toxicology, 197, 23-35.

16. Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), „A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat", Fundamental and Applied Toxicology, 12, 92-108.

17. Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), „Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats", Journal of Reproduction and Fertility, 54, 103-107.

18. Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), „The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat". Reproductive Toxicology, 5, 39-44.

19. Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), „Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report", Reproductive Toxicology, 10, 237- 244.

20. Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), „Methods for Assessing Rat Sperm Motility", Reproductive Toxicology, 6, 267-273.

21. Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), „Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration", Journal of Andrology, 13, 409-421.

22. Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), „Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations", Reproductive Toxicology, 5, 449-458.

▼**M5**

23. Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), „Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer", Methods in Toxicology, Part A, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

24. Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), „The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations", Journal of Andrology, 10, 401-415.

25. Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), „Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants", Reproductive Toxicology, 6, 491-505.

26. OESO (2008), Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OESO, Parijs.

27. Working, P.K., M. Hurtt (1987), „Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility", Journal of Andrology, 8, 330-337.

28. Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), „A „Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today", Toxicological Pathology, 34, 296-313.

29. Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), „Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components", Food Chemicals Toxicology, 44, 8-16.

30. Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), „Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats", Environmental health perspectives, *115(*12), 1717-1726.

31. Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), „Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints", Neurotoxicology and Teratology, 30: 349-381.

32. OESO (1996), Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OESO, Parijs.

33. Hoofdstuk B.43 van deze bijlage, Neurotoxiciteitsonderzoek bij knaagdieren

34. OESO (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, OESO, Parijs.

35. Hoofdstuk B.53 van deze bijlage, Onderzoek naar ontwikkelingsneurotoxiciteit

36. Hoofdstuk B.54 van deze bijlage, Uterotrofe bioassay bij knaagdieren: Een kortlopende screeningstest op oestrogene eigenschappen

37. Hoofdstuk B.55 van deze bijlage, Hershberger-bioassay bij ratten: een kortlopende screeningstest op (anti)androgene eigenschappen

▼**M5**

38. OESO (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OESO, Parijs.

39. OESO (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OESO, Parijs.

40. OESO (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OESO, Parijs.

▼**M5**

Aanhangsel 1

Parameters en observaties opgenomen in de functional observational battery (cohort 2a)

Verblijfskooi & open veld	Manipulatief	Fysiologisch
Houding	Verplaatsingsgemak	Temperatuur
Onwillekeurig klonisch & tonisch	Hanteringsgemak	Lichaamsgewicht
Sluiting ooglid	Spierspanning	Pupilrespons
Rechtopstaan van het haar	Respons op benadering	Pupilgrootte
Speekselafscheiding	Respons op aanraking	
Traanvorming	Auditieve respons	
Geluiden maken	Respons op kneep in staart	
Op achterpoten staan	Oprichtrespons	
Afwijkingen in gang	Spreiding poot bij landing	
Opwinding	Grijpkracht voorpoot	
Stereotiep gedrag	Grijpkracht achterpoot	
Bizar gedrag		
Vlekken		
Afwijkingen in ademhaling		

▼**M5**

Aanhangsel 2

DEFINITIES

Stof: een stof of mengsel.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M5

B.57. **H295R-STEROÏDOGENESETEST**

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 456 (2011) van de OESO. In 1998 is de OESO met hoge prioriteit een actie gestart om bestaande testrichtlijnen te herzien en nieuwe testrichtlijnen te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars (1). Het Conceptueel kader van de OESO van 2000 voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen omvat vijf niveaus, waarbij elk niveau correspondeert met een ander niveau van biologische complexiteit (1). De in deze testmethode beschreven H295R-steroïdogenesebepaling in vitro(H295R) maakt gebruik van een humane adrenocarcinoomcellijn (NCI-H295R-cellen) en is een „in-vitro-bepaling die mechanistische gegevens oplevert" op niveau 2, te gebruiken voor screening en prioritering. De ontwikkeling en standaardisatie van de test als screening voor chemische effecten op de steroïdogenese, met name de productie van 17b-oestradiol (E2) en testosteron (T), is in een meerstappenproces verricht. De H295R-test is geoptimaliseerd en gevalideerd (2) (3) (4) (5).

2. Het doel van de H295R-steroïdogenesetest is stoffen te detecteren die van invloed zijn op de productie van E2 en T. De H295R-test is bedoeld om xenobiotica te identificeren die aangrijpen op de endogene componenten die de intracellulaire biochemische pathway vormen, te beginnen met de opeenvolging van reacties van cholesterol tot de productie van E2 en/of T. De H295R-test is niet bedoeld om stoffen te identificeren die de steroïdogenese beïnvloeden via effecten op de hypothalamus-hypofyse-gonaden (HPG)-as. Het doel van de test is een JA/NEEN-antwoord te geven ten aanzien van het vermogen van een stof om de productie van T en E2 te induceren of remmen; maar in sommige gevallen kunnen kwantitatieve resultaten worden verkregen (zie punten 53 en 54). De resultaten van de test worden uitgedrukt in relatieve veranderingen in hormoonproductie ten opzichte van de oplosmiddelcontroles (solvent controls — SC's). Het doel van de test is niet om specifieke mechanistische informatie op te leveren over de interactie van de teststof met het endocriene systeem. Onderzoek is verricht met de cellijn om effecten te identificeren op specifieke enzymen en tussenproducten zoals progesteron (2).

3. De in deze testmethode gebruikte definities en afkortingen staan in het aanhangsel. Een gedetailleerd protocol met instructies voor de bereiding van oplossingen, het kweken van cellen en diverse aspecten van de test is beschikbaar als Aanhangsel I-III van het OESO-document 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

4. Bij de biosynthese van geslachtssteroïdhormonen zijn vijf verschillende enzymen betrokken die zes verschillende reacties katalyseren. Enzymatische omzetting van cholesterol in pregnenolon door het cytochroom-P450 (CYP)-enzym dat de zijketen van cholesterol splitst (CYP11A) is de eerste stap in een serie van biochemische reacties die leiden tot de synthese van steroïde eindproducten. Afhankelijk van de volgorde van de volgende twee reacties splitst de steroïdogene pathway zich in twee routes, de Δ^5-hydroxysteroïd-pathway en Δ^4-ketosteroïd-pathway, die bij de productie van androsteendion weer samenkomen (figuur 1).

5. Androsteendion wordt in testosteron (T) omgezet door 17b-hydroxysteroïddehydrogenase (17b-HSD). Testosteron is zowel een tussenproduct als een eindhormoon. Bij mannen kan T in dihydrotestosteron (DHT) worden omgezet door 5a-reductase, dat wordt aangetroffen in de celmembranen, kernomhulling, en het endoplasmatisch reticulum van doelweefsels met een androgene werking zoals de prostaat en de zaadblaasjes. DHT is een aanzienlijk krachtiger androgeen dan T en wordt ook als een eindproducthormoon beschouwd. De H295R-test meet geen DHT (zie punt 10).

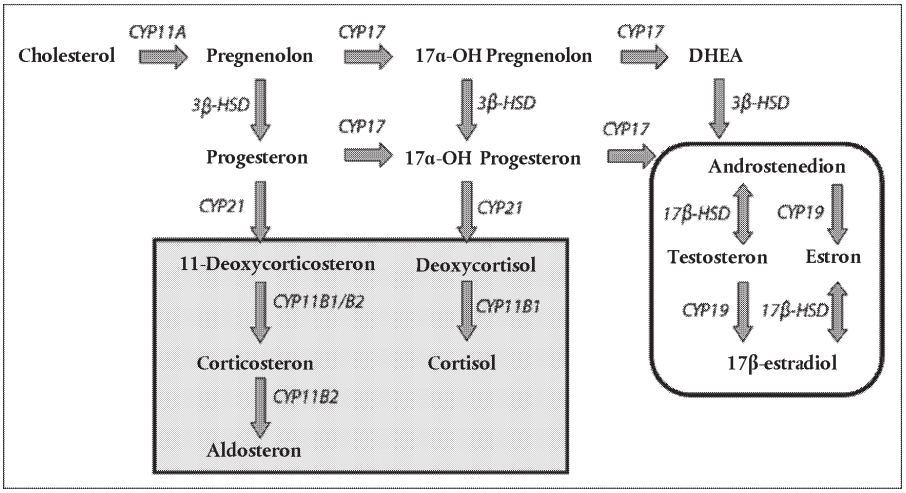
▼M5

6. Het enzym in de steroïdogene pathway dat androgene stoffen omzet in oestrogene stoffen is aromatase (CYP19). CYP19 zet T in 17b-oestradiol (E2) en androsteendion in oestron om. E2 en T worden beschouwd als eindproducthormonen van de steroïdogene pathway.

7. De specificiteit van de lyaseactiviteit van CYP17 verschilt voor de tussenproductsubstraten tussen soorten. Bij de mens heeft het enzym een voorkeur voor substraten van de Δ^5-hydroxysteroïd-pathway (pregnenolon), terwijl bij de rat substraten in de Δ^4-ketosteroïd-pathway (progesteron) de voorkeur hebben (19). Dergelijke verschillen in de CYP17-lyaseactiviteit kunnen bepaalde soortafhankelijke verschillen verklaren in de reactie op stoffen die de steroïdogenese in vivo veranderen (6). De H295-cellen blijken de vorming van bijnierenzymen en patronen van de steroïdproductie (20) bij de mens het dichtst te benaderen, maar het is bekend dat ze enzymen vormen voor zowel de Δ^5-hydroxysteroïd- als de Δ^4-ketosteroïd-pathways voor de androgeensynthese (7) (11) (13) (15).

Figuur 1

Steroïdogene pathway in H295R-cellen



NB:

Enzymen staan cursief, hormonen vet en pijlen geven de syntheserichting aan. Grijze achtergrond betekent corticosteroïde pathways/producten. Geslachtssteroïdhormonen/producten staan omcirkeld. CYP = cytochroom-P450; HSD = hydroxysteroïddehydrogenase; DHEA = dehydro-epiandrosteron.

8. De humane H295R-adrenocarcinoomcellijn is een bruikbaar *in-vitro*-model voor onderzoek naar de effecten op de steroïdhormoonsynthese (2) (7) (8) (9) (10). De H295R-cellijn vormt genen die coderen voor alle sleutelenzymen voor de hierboven beschreven steroïdogenese (11) (15) (figuur 1). Dit is een unieke eigenschap omdat in-vivo-expressie van deze genen weefsel- en ontwikkelingsstadiumspecifiek is met meestal niet één weefsel of één ontwikkelingsstadium met expressie van alle bij de steroïdogenese betrokken genen (2). H295R-cellen hebben fysiologische eigenschappen van zonaal ongedifferentieerde humane foetale adrenale cellen (11). De cellen vertegenwoordigen een uniek in-vitro-systeem omdat ze het vermogen hebben om alle steroïdhormonen te produceren die in de volwassen bijnierschors en gonaden worden aangetroffen, waardoor kan worden getest op

▼M5

effecten op zowel corticosteroïdsynthese als de productie van geslachtssteroïdhormonen zoals androgenen en oestrogenen, hoewel de test alleen gevalideerd is om T en E2 te detecteren. Door het testsysteem vastgelegde veranderingen in de vorm van verandering van de productie van T en E2 kunnen het resultaat zijn van tal van verschillende interacties tussen teststoffen en steroïdogene functies die door de H295R-cellen worden verricht. Dat zijn onder meer modulatie van de expressie, synthese of functie van enzymen die betrokken zijn bij de productie, transformatie of eliminatie van steroïdhormonen (12) (13) (14). Remming van de hormoonproductie kan worden veroorzaakt door directe competitieve binding aan een enzym in de pathway, impact op cofactoren zoals NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) en cAMP (cyclic Adenosine Monophosphate), en/of verhoging van het steroïdmetabolisme of onderdrukking van de genexpressie van bepaalde enzymen in de steroïdogenese-pathway. Hoewel remming een functie kan zijn van zowel directe als indirecte bij de hormoonproductie betrokken processen, is inductie meestal van indirecte aard, zoals door beïnvloeding van cofactoren zoals NADPH en cAMP (zoals in het geval van forskoline), vermindering van het steroïdmetabolisme (13), en of upregulatie van de steroïdogene genexpressie.

9. De H295R-test heeft verschillende voordelen:

— de test maakt detectie mogelijk van zowel verhoging als verlaging van de productie van zowel T als E2,

— hij maakt een directe beoordeling mogelijk van de potentiële impact van de stof op de levensvatbaarheid/cytotoxiciteit van cellen. Dit is een belangrijke eigenschap omdat daarmee onderscheid kan worden gemaakt tussen effecten die worden veroorzaakt door cytotoxiciteit en die welke worden veroorzaakt door directe interactie van stoffen met steroïdogene pathways, wat niet mogelijk is in weefselexplantatiesystemen die bestaan uit meerdere celtypes met wisselende sensitiviteit en functionaliteit,

— er hoeven geen dieren te worden gebruikt,

— de H295R-cellijn is op de markt verkrijgbaar.

10. De belangrijkste beperkingen van de test zijn de volgende:

— de metabole capaciteit is onbekend maar waarschijnlijk vrij beperkt; daarom worden stoffen die metabool geactiveerd moeten worden waarschijnlijk bij deze test gemist,

— omdat de H295R uit bijnierweefsel verkregen is, bezit zij de enzymen die in staat zijn om de gluco- en mineraalcorticoïden en ook de geslachtshormonen te produceren; daarom kunnen effecten op de productie van gluco- en mineraalcorticoïden de in de test waargenomen concentraties van T en E2 beïnvloeden,

— DHT wordt niet gemeten; daarom wordt niet verwacht dat stoffen gedetecteerd kunnen worden die 5a-reductase remmen; in dat geval kan de Hershberger-test (16) worden gebruikt,

— de H295R-test detecteert geen stoffen die de steroïdogenese verstoren door beïnvloeding van de hypothalamus-hypofyse-gonaden (HPG)-as omdat dit alleen bij intacte dieren kan worden onderzocht.

PRINCIPE VAN DE TEST

11. Het doel van de test is om stoffen te detecteren die de productie van T en E2 beïnvloeden. T is ook een tussenproduct in de pathway om E2 te produceren. De test kan stoffen detecteren die normaliter de enzymen van de steroïdogenese-pathway remmen of induceren.

▼M5

12. De test wordt meestal verricht onder standaard celkweekomstandigheden in 24-wells kweekplaten. Ook andere plaatgroottes kunnen voor de test worden gebruikt; maar het zaaien en de experimentele omstandigheden moeten worden aangepast om aan de prestatiecriteria te kunnen blijven voldoen.

13. Na een acclimatisatieperiode van 24 uur in multiwellplaten worden de cellen 48 uur blootgesteld aan zeven concentraties van de teststof, minstens in drievoud. Oplosmiddel en een bekende remmer en inductor van de hormoonproductie worden gebruikt bij een vaste concentratie als negatieve en positieve controles. Aan het eind van de blootstellingsperiode wordt het medium uit elke well verwijderd. Direct na verwijdering van het medium wordt de levensvatbaarheid van cellen in elke well geanalyseerd. Concentraties van hormonen in het medium kunnen worden gemeten met diverse methoden waaronder op de markt verkrijgbare hormoonmetingkits en/of instrumentele technieken zoals vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC-MS). Gegevens worden uitgedrukt als x-voudige verandering ten opzichte van oplosmiddelcontrole en de laagste concentratie die nog effect geeft (Lowest-Observed-Effect-Concentration — LOEC). Als de test negatief is, wordt de hoogste geteste concentratie gemeld als de No-Observed-Effect-Concentration (NOEC). Conclusies over het vermogen van een stof om de steroïdogenese te beïnvloeden moeten worden gebaseerd op minstens twee onafhankelijke reeksen van metingen. De eerste reeks kan als bereiksbepaling dienen met daaropvolgende aanpassing van de concentraties voor reeksen 2 en 3, waar van toepassing, als problemen met oplosbaarheid of cytotoxiciteit worden ondervonden of de activiteit van de stof aan het einde van het bereik van de geteste concentraties lijkt te zijn.

KWEEKPROCEDURE

Cellijn

14. De NCI-H295R-cellen zijn op de markt verkrijgbaar bij American Type Culture Collections (ATCC) na ondertekening van een Material Transfer Agreement (MTA) ([1]).

Inleiding

15. Vanwege verandering in de E2-producerende capaciteit van de cellen bij toenemende leeftijd/passages (2), moeten cellen worden gekweekt volgens een specifiek protocol voordat ze worden gebruikt; het aantal passages sinds de cellen ontdooid zijn en ook het aantal passages waarbij de cellen werden ingevroren en in vloeibaar stikstof werden opgeslagen moeten worden vastgelegd. Het eerste getal geeft het feitelijke aantal celpassages aan, het tweede getal beschrijft het aantal passages waarbij de cellen werden ingevroren en opgeslagen. Zo zouden cellen die werden ingevroren na passage 5 en ontdooid en dan driemaal gesplitst (4 passages waarbij de vers ontdooide cellen als passage 1 worden geteld) nadat ze opnieuw waren gekweekt, als passage 4.5 worden gelabeld. Een voorbeeld van de nummering staat in aanhangsel I van het validatierapport (4).

16. Voorraadmedium wordt gebruikt als basis voor de verrijkte en vriesmedia. Verrijkt medium is een noodzakelijk bestanddeel bij celkweek. Vriesmedium wordt speciaal ontwikkeld om impactvrij invriezen van cellen voor langdurige opslag mogelijk te maken. Vóór gebruik moet Nu-serum (of een vergelijkbaar serum met dezelfde eigenschappen waarvan is aangetoond dat het gegevens oplevert die voldoen aan de vereisten van de test en kwaliteitscontrole (QC)), dat een bestanddeel is van verrijkte media, worden geanalyseerd op achtergrond T- en E2-concentraties. De bereiding van deze oplossingen wordt beschreven in aanhangsel II van het validatierapport (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, (http://www.lgcstandards-atcc.org/).

▼M5

17. Na de start van een H295R-celkweek op basis van een originele ATCC-partij moeten cellen in vijf passages worden gekweekt (d.w.z. de cellen worden 4 keer gesplitst). Passage vijf-cellen worden dan in vloeibaar stikstof ingevroren voor opslag. Voor het invriezen van de cellen moet een metingreeks worden verricht met een monster van de voorgaande passage vier-cellen op een QC-plaat (zie punten 36 en 37) om vast te stellen of de basale productie van hormonen en de reactie op positieve controlestoffen voldoen aan de kwaliteitscontrolecriteria voor de test zoals gedefinieerd in tabel 5.

18. H295R-cellen moeten gekweekt, in vloeibaar stikstof ingevroren en opgeslagen worden om ervoor te zorgen dat er altijd cellen van de geschikte passage/leeftijd beschikbaar zijn voor kweek en gebruik. Het maximale aantal passages na het kweken van een nieuwe ([1]) of ingevroren ([2]) partij cellen dat aanvaardbaar is voor gebruik in de H295R-test mag niet hoger zijn dan 10. Zo zouden aanvaardbare passages voor kweken van cellen uit een partij die bij passage 5 ingevroren zijn 4.5 tot 10.5 zijn. Voor cellen die uit deze ingevroren partijen worden gekweekt, moet de in punt 19 omschreven procedure worden gevolgd. Deze cellen moeten nog eens minstens vier (4) passages (passage 4.5) worden gekweekt voor ze in de test worden gebruikt.

Cellen uit de ingevroren voorraad kweken

19. De procedure voor het kweken van cellen uit ingevroren voorraad moet worden gebruikt als een nieuwe partij cellen uit de opslag in vloeibaar stikstof wordt gehaald om te worden gebruikt bij het kweken en testen. Details over deze procedure staan in aanhangsel III van het validatierapport (4). Cellen worden uit opslag in vloeibaar stikstof gehaald, snel ontdooid, in verrijkt medium in een centrifugebuis geplaatst, bij kamertemperatuur gecentrifugeerd, opnieuw gesuspendeerd in verrijkt medium, en overgebracht in een kweekfles. Het medium moet de daaropvolgende dag worden vervangen. De H295R-cellen worden in een incubator gekweekt bij 37 °C met 5 % CO_2 in luchtatmosfeer en het medium wordt 2-3 keer per week vernieuwd. Als de cellen ongeveer 85-90 % confluent zijn, moeten deze worden gesplitst. Splitsen van de cellen is nodig om ervoor te zorgen dat de cellen gezond blijven en groeien en om cellen te houden om biologische tests op te verrichten. De cellen worden drie keer met een fosfaatgebufferde zoutoplossing (phosphate-buffered saline — PBS, zonder Ca^{2+} Mg^{2+}.) gespoeld en van de kweekfles losgemaakt door toevoeging van een geschikt losmakingsenzym, bijvoorbeeld trypsine, in PBS (zonder Ca^{2+} Mg^{2+}). Direct nadat de cellen van de kweekfles zijn losgekomen, moet de enzymactie worden gestopt door toevoeging van verrijkt medium in een verhouding van 3 × het voor de enzymbehandeling gebruikte volume. Cellen worden in een centrifugebuis geplaatst, bij kamertemperatuur gecentrifugeerd, het supernatant wordt verwijderd en de pellet met cellen wordt opnieuw gesuspendeerd in verrijkt medium. Een geschikte hoeveelheid celoplossing wordt in de nieuwe kweekfles geplaatst. De hoeveelheid celoplossing moet worden aangepast zodat de cellen binnen 5-zeven dagen confluent zijn. De aanbevolen subkweekratio is 1:3 tot 1:4. De plaat moet zorgvuldig worden gelabeld. De cellen zijn nu klaar voor gebruik in de test en overgebleven cellen moeten in vloeibaar stikstof worden ingevroren zoals beschreven in punt 20.

([1]) „Nieuwe partij” verwijst naar een verse partij cellen die van ATCC ontvangen is.
([2]) „Bevroren partij” verwijst naar cellen die eerder gekweekt zijn en dan in een ander laboratorium dan ATCC zijn ingevroren.

▼M5

Invriezen van H295R-cellen (cellen klaarmaken voor opslag in vloeibaar stikstof)

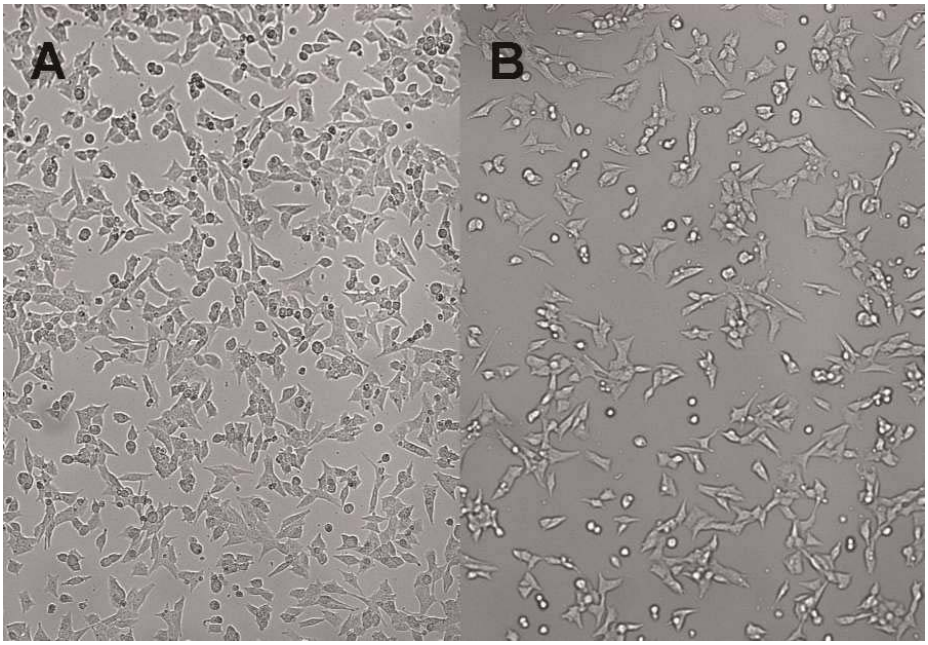
20. Om H295R-cellen klaar te maken voor invriezen moet de procedure die hierboven is omschreven voor het splitsen van cellen worden gevolgd tot de stap voor het opnieuw suspenderen van de pellet met cellen aan de onderkant van de centrifugebuis. Hier wordt de pellet met cellen opnieuw gesuspendeerd in een vriesmedium. De oplossing wordt overgebracht in een cryogene flacon, correct gelabeld, en 24 uur ingevroren bij – 80°C waarna de cryogene flacon in vloeibaar stikstof wordt overgebracht voor opslag. Details voor deze procedures staan in aanhangsel III van het validatierapport (4).

Cellen op de plaat aanbrengen en preïncuberen voor testen

21. Het aantal 24-wells platen, klaargemaakt zoals omschreven in punt 19, dat nodig zal zijn hangt af van het aantal te testen stoffen en de confluentie van de cellen in de kweekschalen. Als vuistregel geldt dat één kweekfles (75 cm^2) van 80-90 % confluente cellen voldoende cellen zal leveren voor één tot 1,5 (24-wells) platen bij een doeldichtheid van 200 000 tot 300 000 cellen per ml medium wat leidt tot ongeveer 50-60 % confluentie in de wells na 24 uur (figuur 2). Dit is meestal de optimale celdichtheid voor hormoonproductie in de test. Bij hogere dichtheden kan het productiepatroon voor T en ook E2 veranderen. Voordat de test voor het eerst wordt verricht, wordt aanbevolen om verschillende dichtheden tussen 200 000 en 300 000 cellen per ml te testen, en de dichtheid die na 24 uur leidt tot 50-60 % confluentie in de well te kiezen voor verdere experimenten.

Figuur 2

Fotomicrografie van H295R-cellen bij een zaaidichtheid van 50 % in een 24-wells kweekplaat na 24 uur, genomen aan de rand (A) en het midden (B) van een well



22. Het medium wordt uit de kweekfles gepipetteerd, en de cellen worden 3 keer met steriel PBS (zonder $Ca^{2+}Mg^{2+}$) gespoeld. Een enzymoplossing (in PBS) wordt toegevoegd om de cellen van de kweekfles los te maken. Na voldoende tijd voor losmaking van de cellen wordt de enzymreactie gestopt door toevoeging van verrijkt medium in een verhouding van 3 × het volume

▼M5

dat gebruikt is voor de enzymbehandeling. Cellen worden in een centrifugebuis geplaatst, bij kamertemperatuur gecentrifugeerd, het supernatant wordt verwijderd, en de pellet met cellen wordt opnieuw gesuspendeerd in verrijkt medium. De celdichtheid wordt berekend met bv. een hemocytometer of een celteller. De celoplossing moet worden verdund tot de voor het aanbrengen op de plaat gewenste dichtheid en grondig gemengd om een homogene celdichtheid te verzekeren. De cellen moeten op de plaat worden aangebracht met 1 ml van de celoplossing/well en de platen en wells moeten worden gelabeld. De gezaaide platen worden geïncubeerd bij 37 °C bij 5 % CO_2 in de luchtatmosfeer gedurende 24 uur om de cellen zich aan de wells te laten vasthechten.

VEREISTEN VOOR KWALITEITSCONTROLE

23. Het is essentieel dat exacte hoeveelheden oplossing en monster in de wells worden gedaan omdat deze hoeveelheden de concentraties bepalen die bij de berekeningen van de resultaten van de test worden gebruikt.

24. Voor de start van de celkweek en eventuele volgende tests moet elk laboratorium de sensitiviteit van haar hormoonmetingssysteem (punten 29-31) aantonen.

25. Als op antilichamen gebaseerde hormoonmetingstesten gebruikt gaan worden, moeten voor de test wordt gestart de te testen stoffen worden geanalyseerd op hun vermogen om een verstoring te geven van het meetsysteem dat wordt gebruikt om T en E2 te kwantificeren, volgens punt 32.

26. DMSO is het aanbevolen oplosmiddel voor de test. Als een ander oplosmiddel wordt gebruikt, moet het volgende worden vastgesteld:

— de oplosbaarheid van de teststof, forskoline en prochloraz in het oplosmiddel, en

— de cytotoxiciteit als functie van de concentratie van het oplosmiddel.

Aanbevolen wordt dat de maximaal toegestane concentratie oplosmiddel niet hoger mag zijn dan 10 × verdunning van de laagste cytotoxische concentratie van het oplosmiddel.

27. Voordat de test voor de eerste keer wordt verricht, moet het laboratorium een kwalificeringsexperiment verrichten om aan te tonen dat het laboratorium in staat is om geschikte omstandigheden te bereiken en vast te houden voor celkweek en experimenten voor het testen van stoffen zoals beschreven in punten 33-35.

28. Bij het starten van een test met een nieuwe partij moet een reeks metingen plaatsvinden met een controleplaat voordat een nieuwe partij cellen wordt gebruikt voor beoordeling van de prestaties van de cellen zoals omschreven in punten 36 en 37.

Prestaties van het hormoonmetingssysteem

Sensitiviteit, nauwkeurigheid, precisie van de methode en kruisreactiviteit met monstermatrix

29. Elk laboratorium kan een hormoonmetingssysteem naar keuze gebruiken voor de analyse van de productie van T en E2 door H295R-cellen, zolang deze aan de prestatiecriteria voldoet, inclusief de kwantificeringslimiet (Limit of Quantification — LOQ). Nominaal zijn dit 100 pg/ml voor T en 10 pg/ml voor E2, die gebaseerd zijn op de in de validatieonderzoeken waargenomen basale hormoonconcentraties. Maar hogere of lagere concentraties kunnen geschikt zijn, afhankelijk van de in het verrichtende laboratorium bereikte basale hormoonconcentraties. Voor de start van de QC-plaat en

▼M5

testmetingen moet het laboratorium aantonen dat de te gebruiken hormoontest hormoonconcentraties in verrijkt medium met voldoende nauwkeurigheid en precisie kan meten om te voldoen aan de in tabellen 1 en 5 gespecificeerde QC-criteria door verrijkt medium te analyseren waaraan een interne hormooncontrolestof is toegevoegd. Aan verrijkt medium moeten minstens drie concentraties van elk hormoon worden toegevoegd (bv. 100, 500 en 2 500 pg/ml T; 10, 50 en 250 pg/ml E2, of de laagst mogelijke concentraties op basis van de detectielimieten van het gekozen hormoonmetingssysteem kan worden gebruikt voor de laagste concentraties toegevoegd T en E2) en geanalyseerd. De gemeten hormoonconcentraties van niet-geëxtraheerde monsters moeten binnen 30 % van de nominale concentraties liggen, en variatie tussen herhaalde metingen van hetzelfde monster mag niet hoger zijn dan 25 % (zie ook tabel 8 voor aanvullende QC-criteria). Als aan deze QC-criteria wordt voldaan, wordt ervan uitgegaan dat de gekozen hormoonmetingstest voldoende nauwkeurig en precies is en geen kruisreactie vertoont met componenten in het medium (monstermatrix) in een mate die een aanmerkelijke invloed op het resultaat van de test te verwachten zou doen verwachten. In dat geval is geen extractie van monsters vóór meting van de hormonen vereist.

30. Als aan de QC-criteria in tabellen 1 en 8 niet wordt voldaan, kan dit komen door een aanmerkelijk matrixeffect, en moet een experiment met medium waaraan een extractie is toegevoegd worden verricht. Een voorbeeld van een extractieprocedure wordt beschreven in aanhangsel II van het validatierapport (4). Metingen van de hormoonconcentraties in de geëxtraheerde monsters moeten in drievoud worden verricht ([1]). Als kan worden aangetoond dat na extractie de componenten van het medium de hormoondetectie zoals gedefinieerd door de QC-criteria niet verstoren, worden alle volgende experimenten verricht met geëxtraheerde monsters. Als na extractie niet aan de QC-criteria kan worden voldaan, is het gebruikte hormoonmetingssysteem ongeschikt voor het doel van de H295R-steroïdogenesetest, en moet een andere hormoondetectiemethode worden gebruikt.

Standaardcurve

31. De hormoonconcentraties van de oplosmiddelcontroles (SC's) moeten binnen het lineaire deel van de standaardcurve vallen. Bij voorkeur liggen de SC-waarden dicht bij het midden van het lineaire deel om ervoor te zorgen dat inductie en remming van de hormoonsynthese gemeten kunnen worden. Verdunningen van te meten medium (of extracten) moeten dienovereenkomstig worden geselecteerd. Het lineaire verband moet worden vastgesteld aan de hand van een passende statistische methode.

Stofinterferentietest

32. Als op antilichamen gebaseerde testen zoals Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA's) en Radio-Immuno Assays (RIA's) gebruikt gaan worden om hormonen te meten, moet elke stof worden getest op mogelijke interferentie met het te gebruiken hormoonmetingssysteem voordat het feitelijke testen van stoffen begint (aanhangsel III van het validatierapport (4)), want sommige stoffen kunnen deze tests verstoren (17). Als interferentie optreedt die ≥ 20 % is van de basale hormoonproductie voor T en/of E2 zoals door hormoonanalyse vastgesteld, moet de Chemical Hormone Assay Interference Test (zoals beschreven in aanhangsel III van het validatierapport (4) afdeling 5.0) worden verricht op alle verdunningen van voorraadoplossing van de teststof om de drempelwaarde te vinden waarbij aanmerkelijke (≥ 20 %) interferentie optreedt. Als de interferentie minder is dan 30 %, mogen de resultaten voor de interferentie worden gecorrigeerd. Als de interferentie hoger is dan 30 %, zijn de gegevens ongeldig en moeten de

([1]) *NB:* Als extractie vereist is, worden voor elk extract drie duplometingen verricht. Elk monster wordt maar 1 keer geëxtraheerd.

▼M5

gegevens bij deze concentraties worden genegeerd. Als aanmerkelijke interferentie van een teststof met een hormoonmetingssysteem optreedt bij meer dan één niet-cytotoxische concentratie, moet een ander hormoonmetingssysteem worden gebruikt. Om interferentie van vervuilende stoffen te vermijden, wordt aanbevolen hormonen te extraheren uit het medium met een geschikt oplosmiddel; methoden daarvoor zijn te vinden in het validatierapport (4).

Tabel 1

Prestatiecriteria voor hormoonmetingssystemen

Parameter	Criterium
Sensitiviteit meetmethode	Kwantificeringslimiet (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Efficiëntie hormoonextractie (alleen als extractie nodig is)	De gemiddelde teruggevonden hoeveelheden (op basis van drievoudige metingen) van de toegevoegde hoeveelheden hormoon mogen niet meer dan 30 % afwijken van de toegevoegde hoeveelheden.
Interferentie met de stof (alleen systemen op basis van antilichamen)	Er mag geen aanmerkelijke (≥ 30 % van de basale hormoonproductie van het desbetreffende hormoon) kruisreactiviteit optreden met één van de door de cellen geproduceerde hormonen ([b]) ([c]).

([a]) *NB:* Meetmethodelimieten zijn gebaseerd op de waarden voor basale hormoonproductie in tabel 5, en berusten op prestatie. Als een hogere basale hormoonproductie kan worden bereikt, kan de limiet hoger liggen.

([b]) Sommige T- en E2-antilichamen kunnen een hoger percentage kruisreactie vertonen met androsteendion resp. oestron. In dergelijke gevallen is het niet mogelijk om de effecten op 17b-HSD nauwkeurig te bepalen. Maar de gegevens kunnen nog wel bruikbare informatie opleveren over de effecten op de oestrogeen- of androgeenproductie in het algemeen. In zulke gevallen moeten de gegevens worden uitgedrukt als androgeen/oestrogeenrespons in plaats van E2 en T.

([c]) Dit zijn: cholesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxycorticosteron, corticosteron, aldosteron, 17a-pregnenolon, 17a-progesteron, deoxycortisol, cortisol, DHEA, androsteendion, oestron.

Vaardigheidstest laboratorium

33. Voordat laboratoria onbekende stoffen testen, moeten zij aantonen dat zij in staat zijn om de geschikte omstandigheden voor celkweek en tests te bereiken en in stand te houden die voor een goed verloop van de test vereist zijn, door een laboratoriumvaardigheidstest te doen. Omdat de prestatie van een test direct afhankelijk is van het laboratoriumpersoneel dat de test verricht, moeten deze procedures deels worden herhaald als er andere medewerkers in het laboratorium komen.

34. Deze vaardigheidstest wordt verricht onder dezelfde omstandigheden die in punten 38-40 staan door cellen bloot te stellen aan 7 stijgende concentraties van sterke, matige en zwakke inductoren en remmers en aan een negatieve stof (zie tabel 2). Met name zijn de te testen stoffen de krachtige inductor forskoline (CAS-nr. 66575-29-9); de krachtige remmer prochloraz (CAS-nr. 67747-09-5); de matige inductor atrazine (CAS-nr. 1912-24-9); de matige

▼M5

remmer aminoglutethimide (CAS-nr. 125-84-8); de zwakke inductor (E2-productie) en zwakke remmer (T-productie) bisfenol A (CAS-nr. 80-05-7), en de negatieve stof humaan choriongonadotropine (HCG) (CAS-nr. 9002-61-3) zoals getoond in tabel 2. Metingen worden op afzonderlijke platen verricht voor alle stoffen aan de hand van de opzet in tabel 6. Bij elke dagelijkse reeks metingen moet een QC-plaat (tabel 4, punten 36-37) worden meegenomen voor de vaardigheidsstoffen.

Tabel 2

Vaardigheidsstoffen en blootstellingsconcentraties

Vaardigheidsstof	Testconcentraties [µM]
Prochloraz	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskoline	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Atrazine	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 30, 1, 3, 10
Aminoglutethimide	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 30, 1, 3, 10
Bisfenol A	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 30, 1, 3, 10
HCG	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 30, 1, 3, 10

([a]) Oplosmiddel (DMSO)-controle (0), 1 µl DMSO/well

Blootstelling van H295R aan de vaardigheidsstoffen moet tijdens de laboratoriumvaardigheidstest in platen met 24 wells worden verricht. De dosering is in µM voor alle doses van de teststof. De doses moeten worden toegediend in DMSO bij 0,1 % v/v per well. Alle testconcentraties moeten in drie wells worden getest (tabel 6). Voor metingen van elke stof worden afzonderlijke platen gebruikt. Bij elke dagelijkse reeks metingen wordt één QC-plaat meegenomen.

35. Cellevensvatbaarheid- en hormoonanalyses moeten worden verricht zoals omschreven in punten 42-46. De drempelwaarde (concentratie bij laagst waargenomen effect, LOEC) en classificatiebeslissing moeten worden gemeld en vergeleken met de waarde in tabel 3. De gegevens worden als acceptabel beschouwd als ze voldoen aan de LOEC en beslissingsclassificatie in tabel 3.

Tabel 3

Drempelwaarden (LOEC's) en beslissingsclassificaties voor vaardigheidsstoffen

	CAS-nr.	LOEC [µM]		Beslissingsclassificatie	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a])(Remming)	+ ([a])(Remming)
Forskoline	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Inductie)	+ (Inductie)
Atrazine	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Inductie)	+ (Inductie)
Aminoglutethimide	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ ([a])(Remming)	+ ([a])(Remming)

▼M5

	CAS-nr.	LOEC [μM]		Beslissingsclassificatie	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ ([a])(Remming)	+ (Inductie)
HCG	9002-61-3	n.v.t.	n.v.t.	Negatief	Negatief

([a]) +, positief
n.v.t. niet van toepassing omdat geen veranderingen konden optreden na blootstelling aan niet-cytotoxische concentraties van negatieve controle.

Kwaliteitscontroleplaat

36. De kwaliteitscontrole (QC)-plaat wordt gebruikt om de prestatie van de H295R-cellen te verifiëren onder standaard kweekomstandigheden en om een historische database op te zetten voor hormoonconcentraties in oplosmiddelcontroles, positieve en negatieve controles, en ook andere QC-metingen in de tijd.

— De prestaties van de H295R-cellen moeten worden beoordeeld met een QC-plaat voor elke nieuwe ATCC-partij of na gebruik voor de eerste keer van een eerder ingevroren voorraad cellen, tenzij de laboratoriumvaardigheidstest (punten 32-34) met die partij cellen gedaan is.

— Een QC-plaat geeft een volledige beoordeling van de testomstandigheden (zoals cellevensvatbaarheid, oplosmiddelcontrole, negatieve en positieve controles, en ook variabiliteit binnen en tussen testen) bij het testen van stoffen en moet onderdeel zijn van elke reeks testmetingen.

37. De QC-test wordt verricht in een 24-wells plaat en volgt dezelfde procedures voor incubatie, dosering, cellevensvatbaarheid/cytotoxiciteit, hormoonextractie en hormoonanalyse die in de punten 38 tot en met 46 voor het testen van stoffen beschreven zijn. De QC-plaat bevat blanco's, oplosmiddelcontroles, en twee concentraties van een bekende inductor (forskoline, 1, 10 μM) en remmer (prochloraz, 0,1, 1 μM) van de E2- en T-synthese. Daarnaast wordt MeOH gebruikt in bepaalde wells als positieve controle voor de levensvatbaarheid/cytotoxiciteitstest. Een gedetailleerde omschrijving van de plaatlayout is te vinden in tabel 4. De criteria waaraan de QC-plaat moet voldoen staan in tabel 5. De minimale basale hormoonproductie voor T en E2 moet zowel in de oplosmiddelcontrole- als blanco wells worden bereikt.

Tabel 4

Layout van de QC-plaat voor het testen van de prestaties van niet-blootgestelde H295R-cellen en cellen die zijn blootgesteld aan bekende remmers (PRO = prochloraz) en stimulators (FOR = forskoline) van de E2- en T-productie. Na beëindiging van het blootstellingsexperiment en verwijdering van het medium wordt een oplossing van 70 % methanol toegevoegd aan alle MeOH-wells om te dienen als positieve controle voor cytotoxiciteit (zie cytotoxiciteitstest in aanhangsel III van het validatierapport (4)).

	1	2	3	4	5	6
A	Blanco ([a])	Blanco ([a])	Blanco ([a])	Blanco ([a]) MeOH ([b])	Blanco ([a]) MeOH ([b])	Blanco ([a]) MeOH ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([γ]) 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]) Cellen in blanco wells krijgen alleen medium (dus geen oplosmiddel).
([b]) Methanol (MeOH) wordt toegevoegd **nadat** de blootstelling is beëindigd en het medium uit deze wells is verwijderd.
([c]) DMSO oplosmiddelcontrole (1 µl/well).

Tabel 5

Prestatiecriteria voor de QC-plaat

	T	E2
Basale productie van hormoon in de oplosmiddelcontrole (SC)	≥ 5 keer de LOQ	≥ 2,5 keer de LOQ
Inductie (10 µM forskoline)	≥ 1,5 keer de SC	≥ 7,5 keer de SC
Remming (1µM prochloraz)	≥ 0,5 keer de SC	≥ 0,5 keer de SC

PROCEDURE VOOR BLOOTSTELLING AAN EEN STOF

38. De gepreïncubeerde cellen worden uit de incubator verwijderd (punt 21) en onder een microscoop gecontroleerd om er zeker van te zijn dat ze in goede staat verkeren (aanhechting, morfologie) vóór toediening.

39. De cellen worden in een bioveiligheidskast geplaatst en het verrijkte medium wordt verwijderd en vervangen door nieuw verrijkt medium (1 ml/well). DMSO is het oplosmiddel dat voor deze testmethode bij voorkeur wordt gebruikt. Als er redenen zijn om andere oplosmiddelen te gebruiken moet de wetenschappelijke motivering daarvoor worden beschreven. Cellen worden aan de teststof blootgesteld door 1 µl van de geschikte stamoplossing in DMSO (zie aanhangsel II van het validatierapport (4)) per 1 ml verrijkt medium (vakvolume) toe te voegen. Dit leidt tot een uiteindelijke concentratie van 0,1 % DMSO in de wells. Om een goede menging te verzekeren wordt over het algemeen geprefereerd dat de desbetreffende stamoplossing van de teststof in DMSO wordt vermengd met verrijkt medium om voor elke dosis de gewenste uiteindelijke concentratie te verkrijgen, en dat het mengsel direct na verwijdering van oud medium aan elke well wordt toegevoegd. Als deze optie wordt gebruikt, moet de concentratie DMSO (0,1 %) in alle wells gelijk blijven. De wells die de hoogste twee concentraties bevatten worden met een stereomicroscoop visueel beoordeeld op de vorming van precipitaat of troebelheid als indicatie van onvolledige oplosbaarheid van de teststof. Als dergelijke omstandigheden (troebelheid, vorming van precipitaat) worden waargenomen, worden de wells met de volgende lagere concentraties ook gecontroleerd (enzovoorts); de concentraties die niet volledig zijn opgelost moeten van verdere beoordeling en analyse worden uitgesloten. De plaat wordt teruggezet in de incubator bij 37 °C onder 5 % CO_2 in de luchtatmosfeer gedurende 48 uur. De layout van de teststofplaat staat in tabel 6. Stamoplossingen 1-7 tonen de plaatsing van toenemende doses van de teststof.

▼M5

Tabel 6

Dosisschema voor de blootstelling van H295R-cellen aan teststof in een 24-wells plaat

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Stamoplossing 4	Stamoplossing 4	Stamoplossing 4
B	Stamoplossing 1	Stamoplossing 1	Stamoplossing 1	Stamoplossing 5	Stamoplossing 5	Stamoplossing 5
C	Stamoplossing 2	Stamoplossing 2	Stamoplossing 2	Stamoplossing 6	Stamoplossing 6	Stamoplossing 6
D	Stamoplossing 3	Stamoplossing 3	Stamoplossing 3	Stamoplossing 7	Stamoplossing 7	Stamoplossing 7

40. Na 48 uur worden de blootgestelde platen uit de incubator verwijderd en elke well wordt onder de microscoop gecontroleerd op celomstandigheden (aanhechting, morfologie, mate van confluentie) en tekenen van cytotoxiciteit. Het medium voor elke well wordt in twee gelijke hoeveelheden gesplitst (ongeveer 490 µl elk) en in twee afzonderlijke en goed gelabelde flacons overgebracht (dat wil zeggen een aliquot om voor elke well een reservemonster te hebben). Om te voorkomen dat cellen uitdrogen wordt medium uit één rij of kolom tegelijk verwijderd en vervangen met medium voor de cellevensvatbaarheid/cytotoxiciteitstest. Als de levensvatbaarheid/cytotoxiciteit van de cellen niet direct gemeten wordt, wordt 200 µl PBS met Ca^{2+} en Mg^{2+} aan elke well toegevoegd. De media worden ingevroren bij – 80 °C tot verdere verwerking om de hormoonconcentraties te analyseren (zie punten 44-46). Hoewel bij – 80 °C en in medium bewaard T en E2 over het algemeen minstens drie maanden stabiel zijn, moet de hormoonstabiliteit tijdens de opslag in elk laboratorium worden vastgelegd.

41. Direct na verwijdering van het medium wordt voor elke blootstellingsplaat de levensvatbaarheid/cytotoxiciteit van de cellen bepaald.

Bepaling van de levensvatbaarheid van de cellen

42. Er kan een cellevensvatbaarheid/cytotoxiciteitstest naar keuze worden gebruikt om de mogelijke impact van de teststof op de levensvatbaarheid van de cellen te bepalen. De test moet een reële meting van het percentage levensvatbare cellen in een well kunnen geven, of aangetoond moet kunnen worden dat het direct vergelijkbaar is met (een lineaire functie van) de Live/Dead® Assay (zie aanhangsel III van het validatierapport (4)). Een andere test waarvan is aangetoond dat deze net zo goed werkt is de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide]-test (18). De beoordeling van de cellevensvatbaarheid met de bovenstaande methoden is een relatieve meting die niet noodzakelijkerwijs een lineair verband vertoont met het absolute aantal cellen in een well. Daarom moet de analist een subjectieve parallelle visuele beoordeling van elke well verrichten, en er moeten digitale foto's van de SC's en de twee hoogste niet-cytotoxische concentraties worden genomen en bewaard zodat later de ware celdichtheid kan worden beoordeeld mocht dat nodig zijn. Als na visuele inspectie of op grond van de levensvatbaarheid/cytotoxiciteitstest er een toename van het aantal cellen lijkt te zijn, moet de kennelijke toename worden geverifieerd. Als een hoger aantal cellen wordt geverifieerd, moet dit in het testrapport worden vermeld. De levensvatbaarheid van de cellen wordt uitgedrukt ten opzichte van de gemiddelde respons in de SC's, wat beschouwd wordt als 100 % levensvatbare cellen, en wordt op een voor de gebruikte cellevensvatbaarheid/cytotoxiciteitstest passende wijze berekend. Voor de MTT-test kan de volgende formule worden gebruikt:

▼M5

% levensvatbare cellen = (respons in well – gemiddelde respons in met MeOH behandelde [= 100 % dode] wells) ÷ (gemiddelde respons in SC-wells – gemiddelde respons in met MeOH behandelde [= 100 % dode] wells)

43. Wells met een levensvatbaarheid lager dan 80 % ten opzichte van de gemiddelde levensvatbaarheid in de SC's (= 100 % levensvatbaar), mogen niet in de uiteindelijke data-analyse worden meegenomen. Remming van de steroïdogenese die optreedt in aanwezigheid van bijna 20 % cytotoxiciteit moet zorgvuldig worden beoordeeld om er zeker van te zijn dat cytotoxiciteit niet de oorzaak is van de remming.

Hormoonanalyse

44. Elk laboratorium kan voor de analyse van T en E2 een hormoonmetingssysteem naar keuze gebruiken. Er kunnen reservealiquots van medium uit elke behandelingsgroep worden gebruikt voor het bereiden van oplossingen om de concentratie binnen het lineaire deel van de standaardcurve te brengen. Zoals opgemerkt in punt 29 moet elk laboratorium aantonen dat zijn hormoonmetingssysteem (bv.ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) aan de QC-criteria voldoet door verrijkt medium waaraan een interne hormooncontrole is toegevoegd te analyseren voordat QC-metingen worden verricht of stoffen worden getest. Om ervoor te zorgen dat de componenten van het testsysteem de meting van hormonen niet verstoren, kan het nodig zijn de hormonen voor meting ervan uit de media te extraheren (zie punt 30 voor de omstandigheden waaronder een extractie al of niet vereist is). Aanbevolen wordt om extractie te verrichten volgens de procedures in aanhangsel III van het validatierapport (4).

45. Als een op de markt verkrijgbare testkit wordt gebruikt om de hormoonproductie te meten, moet de hormoonanalyse worden verricht zoals omschreven in de handleidingen van de fabrikant van de testkit. De meeste fabrikanten hebben een eigen procedure waarmee de hormoonanalyses worden verricht. Oplossingen van monsters moeten zodanig worden aangepast dat de verwachte hormoonconcentraties voor de oplosmiddelcontroles in het midden van het lineaire bereik van de standaardcurve voor de individuele test vallen (aanhangsel III van het validatierapport (4)). Waarden buiten het lineaire deel van de standaardcurve moeten worden verworpen.

46. Uiteindelijke hormoonconcentraties worden als volgt berekend:

Voorbeeld:

Geëxtraheerd:	450 µl medium
Gereconstitueerd in:	250 µl testbuffer
Oplossing in test:	1:10 (om het monster binnen het lineaire bereik van de standaardcurve te brengen)
Hormoonconcentratie in test:	150 pg/ml (al aangepast aan concentratie per ml getest monster)
Recovery:	89 %
Uiteindelijke hormoonconcentratie =	(Hormoonconcentratie (per ml) ÷ recovery) (verdunningsfactor)
Uiteindelijke hormoonconcentratie =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Selectie van testconcentraties

47. Er moeten minimaal twee onafhankelijke metingreeksen van de test plaatsvinden. Tenzij eerdere informatie zoals informatie over oplosbaarheidslimieten of cytotoxiciteit een basis vormt voor selectie van testconcentraties, wordt aanbevolen dat de testconcentraties voor de eerste reeks met intervallen van $\log_{10}$ worden verricht, waarbij 10^{-3} M de maximale concentratie is. Als de stof oplosbaar is, en bij geen van de geteste concentraties cytotoxisch, en de eerste reeks was negatief voor alle concentraties, dan moet dit worden bevestigd in een extra reeks onder dezelfde omstandigheden als de eerste reeks (tabel 7). Als de resultaten van de eerste reeks ambigu zijn (dat wil zeggen de x-voudige verandering is statistisch significant t.o.v. de SC bij slechts één concentratie) of positief (dat wil zeggen de x-voudige verandering bij twee of meer opeenvolgende concentraties is statistisch significant), moet de test worden herhaald zoals aangegeven in tabel 7 door de geselecteerde testconcentraties te verfijnen. De testconcentraties in metingen twee en drie (waar van toepassing) moeten worden aangepast op de basis van de resultaten van uiterste concentraties van de eerste reeks metingen waarbij een effect optrad met concentratie-intervallen van 1/2-log (bv.als de oorspronkelijke reeks van 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM bij 1 en 10 μM tot inductie leidde, moeten de bij de tweede reeks geteste concentraties 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM zijn), tenzij lagere concentraties gebruikt moeten worden om een LOEC te bereiken. In dat laatste geval moeten bij de tweede meting minstens vijf concentraties onder de laagste bij de eerste reeks geteste concentratie worden gebruikt aan de hand van een 1/2-logschaal. Als de tweede reeks de eerste reeks niet bevestigt (d.w.z. statistische significantie treedt niet op bij de eerder positief geteste concentratie ± 1 concentratiestap), moet een derde experiment verricht worden in de oorspronkelijke testomstandigheden. Ambigue resultaten bij de eerste reeks worden als negatief beschouwd als het waargenomen effect bij geen van de twee volgende reeksen kan worden bevestigd. Ambigue resultaten worden als positieve respons (effect) beschouwd als de respons bij minstens één volgende meting kan worden bevestigd binnen een ± 1 concentratiestap (zie afdeling 55 voor de procedure voor interpretatie van gegevens).

Tabel 7

Beslissingsmatrix voor mogelijke uitkomstscenario's

Reeks 1	Reeks 2		Reeks 3		Beslissing	
Scenario	Beslissing	Scenario	Beslissing	Scenario	Positief	Negatief
Negatief	Bevestig ([a])	Negatief	Stop			X
Negatief	Bevestig ([a])	Positief	Verfijn ([b])	Negatief		X
Ambigu ([c])	Verfijn ([b])	Negatief	Bevestig ([a])	Negatief		X
Ambigu ([c])	Verfijn ([b])	Negatief	Bevestig ([a])	Positief	X	
Ambigu ([c])	Verfijn ([b])	Positief			X	
Positief	Verfijn ([b])	Negatief	Bevestig ([a])	Positief	X	

▼M5

Reeks 1	Reeks 2		Reeks 3		Beslissing	
Scenario	Beslissing	Scenario	Beslissing	Scenario	Positief	Negatief
Negatief	Bevestig ([a])	Positief	Verfijn ([b])	Positief	X	
Positief	Verfijn ([b])	Positief	Stop		X	

([a]) Bevestig eerdere reeks met dezelfde experimentele opzet.
([b]) Herhaal test met concentratie-intervallen van 1/2-log (aan weerszijden van de concentratie die in het voorgaande experiment significant anders testte).
([c]) X-voudige verandering bij een concentratie is statistisch significant verschillend van de SC.

Kwaliteitscontrole van de testplaat

48. Naast de criteria voor de QC-plaat moet ook worden voldaan aan andere kwaliteitscriteria met betrekking tot een acceptabele variatie tussen duplowells, duplo-experimenten, lineariteit en sensitiviteit van hormoonmetingssystemen, variabiliteit tussen duplohormoonmetingen van hetzelfde monster, en percentage recovery van hormoontoevoegingen na extractie van medium (waar van toepassing, zie punt 30 over extractievereisten); deze staan in tabel 8. Gegevens moeten binnen het acceptabele bereik vallen dat gedefinieerd is voor elke parameter dat voor nadere beoordeling wordt overwogen. Als aan deze criteria niet wordt voldaan, moet in de spreadsheet worden aangegeven dat voor het desbetreffende monster niet aan de QC-criteria is voldaan, en dat het monster opnieuw moet worden geanalyseerd of uit de dataset moet worden verwijderd.

Tabel 8

Acceptabel(e) bereik en/of variatie (%) van testplaatparameters voor H295R-test.

(LOQ: Kwantificeringslimiet van hormoonmetingssysteem. CV: Variatiecoëfficiënt; SC: Oplosmiddelcontrole; DPM: Desintegraties per minuut.)

	Vergelijking tussen	T	E2
Basale hormoonproductie in SC's	X maal hoger dan LOQ	≥ 5 maal	≥ 2,5 maal
Blootstellingsexperimenten — Binnen plaat-CV voor SC's (duplowells)	Absolute concentraties	≤ 30 %	≤ 30 %
Blootstellingsexperimenten — Tussen plaat-CV voor SC's (duplo-experimenten)	X-voudige verandering	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormoonmetingsysteem — sensitiviteit	Detecteerbare x-voudige afname t.o.v. SC	≥ 5 maal	≥ 2,5 maal
Hormoonmetingssysteem — Duplometing CV voor SC's ([a])	Absolute concentraties	≤ 25 %	≤ 25 %
Mediumextractie — Recovery van interne 3H-standaard (waar van toepassing)	DPM	≥ 65 % Nominaal	

([a]) Verwijst naar duplometingen van hetzelfde monster

▼M5

GEGEVENSANALYSE EN RAPPORTAGE

Gegevensanalyse

49. Om de relatieve toename/afname van de door de stof gewijzigde hormoonproductie te beoordelen, moeten de resultaten worden genormaliseerd naar de gemiddelde SC-waarde van elke testplaat, en de resultaten uitgedrukt in veranderingen ten opzichte van de SC in elke testplaat. Alle gegevens moeten worden uitgedrukt in gemiddeld ± 1 standaarddeviatie (SD).

50. Alleen hormoongegevens uit wells waarin de cytotoxiciteit minder dan 20 % was moeten in de gegevensanalyse worden opgenomen. De relatieve veranderingen moeten als volgt worden berekend:

Relatieve verandering = (Hormoonconcentratie in elke well) ÷ (Gemiddelde hormoonconcentratie in alle wells met oplosmiddelcontrole).

51. Als door visuele inspectie van de well of op grond van de in punt 42 beschreven levensvatbaarheid/cytotoxiciteitstest er een toename in aantal cellen lijkt te zijn, moet de kennelijke toename worden geverifieerd. Als een hoger aantal cellen wordt geverifieerd, moet dit in het testrapport worden vermeld.

52. Voordat statistische analyses worden verricht, moeten de aannames van normaliteit en homogeniteit van variantie worden beoordeeld. Normaliteit moet worden beoordeeld met standaard waarschijnlijkheidsplots of een andere geschikte statistische methode (bv. toets van Shapiro-Wilk). Als de gegevens (x-voudige veranderingen) niet normaal verdeeld zijn, moet transformatie van de gegevens worden geprobeerd om een normale verdeling zo goed mogelijk te benaderen. Als de gegevens normaal verdeeld zijn of een normale verdeling benaderen, moeten verschillen tussen de stofconcentratiegroepen en SC's worden geanalyseerd met een parametrische test (bv. toets van Dunnett) waarbij concentratie de onafhankelijke, en respons (x-voudige verandering) de afhankelijke variabele is. Als gegevens niet normaal verdeeld zijn, moet een passende niet-parametrische test worden gebruikt (bv. Kruskal Wallis, Steel's Many-one rank test). Verschillen worden als significant beschouwd bij $p \leq 0{,}05$. Statistische beoordelingen worden verricht op basis van gemiddelde waarden voor elke well die onafhankelijke duplogegevenspunten vertegenwoordigen. Verwacht wordt dat vanwege de grote dosisintervallen bij de eerste reeks (log_{10}-schaal), het in veel gevallen niet mogelijk zal zijn om een duidelijke concentratie-responsrelatie te beschrijven waar de twee hoogste doses zich op het lineaire deel van de sigmoïde curve zullen bevinden. Daarom wordt voor de eerste reeks of enige andere dataset waar deze omstandigheid optreedt (bv. waar geen maximale effectiviteit kan worden geschat) een vaste-variabelestatistiek type I toegepast.

53. Als meer dan twee datapunten op het lineaire deel van de curve liggen en waar maximale effectiviteit kan worden berekend (wat wordt verwacht van enkele van de 2nd reeksen die worden verricht met semi-log-intervallen van de blootstellingsconcentratie) moet een probit-, logit- of ander passend regressiemodel worden gebruikt om effectieve concentraties te berekenen (bv.EC50 en EC20).

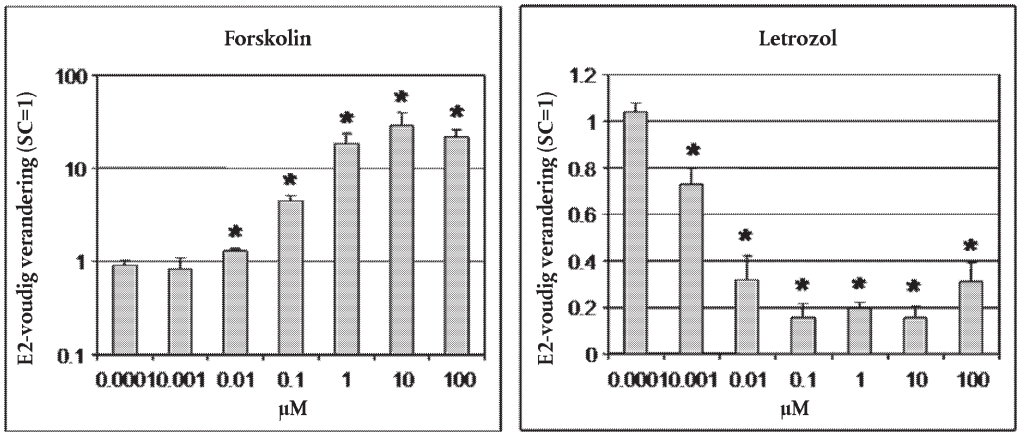
54. De resultaten moeten zowel in grafiek (staafdiagram die gemiddelde +/– 1 SD weergeeft) als in tabel (LOEC/NOEC, effectrichting, en sterkte van de maximale respons die deel uitmaakt van het dosis-responsdeel van de gegevens) worden weergegeven (zie figuur 3 voor een voorbeeld). De gegevensbeoordeling wordt alleen als geldig beschouwd als deze is gebaseerd op minstens twee onafhankelijk verrichte reeksen. Een experiment of reeks wordt als onafhankelijk beschouwd als dit/deze verricht is op een andere datum met een nieuwe set oplossingen en controles. Het bij reeksen 2 en 3 (zo nodig) gebruikte concentratiebereik kan worden aangepast op basis van de resultaten van reeks 1 om het dosisresponsbereik dat de LOEC bevat beter te definiëren (zie punt 47).

▼M5

Figuur 3

Voorbeeld van de presentatie en beoordeling van gegevens die met de test verkregen zijn in grafiek en tabel.

Een asterisk wijst op een statistisch significant verschil ten opzichte van oplosmiddelcontrole (*p< 0,05*).
LOEC: Laagst waargenomen effectieve concentratie; Max verandering: Maximale sterkte van de respons die bij elke concentratie is waargenomen ten opzichte van de gemiddelde SC-respons (= 1)



Stof	LOEC	Max. verandering
Forskoline	0,01	0,15-voudig
Letrozol	0,001	29-voudig

Procedure voor gegevensinterpretatie

55. Een teststof wordt positief geacht als de x-voudige inductie statistisch verschilt ($p \leq 0,05$) van de oplosmiddelcontrole bij twee opeenvolgende concentraties in minstens twee onafhankelijke reeksen (tabel 7). Een teststof wordt negatief geacht na twee onafhankelijke negatieve reeksen, of bij drie reeksen, te weten twee negatieve reeksen en een ambigue of positieve reeks. Als de bij drie onafhankelijke experimenten verkregen gegevens niet voldoen aan de beslissingscriteria in tabel 7, zijn de resultaten van het experiment niet interpreteerbaar. Resultaten bij concentraties die de oplosbaarheidslimieten te boven gaan of bij cytotoxische concentraties mogen niet bij de interpretatie van de resultaten worden meegenomen.

Testverslag

56. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Testfaciliteit:

— naam faciliteit en locatie,

— onderzoeksleider en andere medewerkers en hun verantwoordelijkheden in het onderzoek,

— datums dat het onderzoek begon en stopte.

▼**M5**

Teststof, reagens en controles:

— identiteit (naam/CAS-nr. waar van toepassing), herkomst, partijnummer, zuiverheid, leverancier, en kenmerken van de teststof, reagens en controles,

— fysische aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de teststof,

— bewaarcondities en de methode en frequentie van bereiding van teststoffen, reagens en controles,

— stabiliteit van de teststof.

Cellen:

— herkomst en type van de cellen,

— aantal celpassages (celpassage-identificator) van bij test gebruikte cellen,

— omschrijving van procedures voor instandhouding van celkweken.

Vereisten voorafgaande aan de test (waar van toepassing):

— omschrijving en resultaten van test op interferentie teststof-/hormoontest,

— omschrijving en resultaten van meting van efficiëntie van hormoonextractie,

— standaarden en calibratiecurves voor alle te verrichten analytische testen,

— detectielimieten voor de geselecteerde analytische testen.

Testomstandigheden:

— samenstelling van media,

— concentratie van de teststof,

— celdichtheid (geschatte of gemeten celconcentratie na 24 uur en 48 uur),

— oplosbaarheid van de teststof (limiet van oplosbaarheid, indien bepaald),

— incubatietijd en omstandigheden.

Testresultaten:

— onbewerkte gegevens voor elke well voor controles en teststoffen-elke duplometing in de vorm van de oorspronkelijke gegevens die zijn geleverd door het instrument dat is gebruikt om de hormoonproductie te meten (bv. OD, fluorescentie-eenheden, DPM enz.),

— validatie van normaliteit of verklaring van gegevenstransformatie,

— gemiddelde respons +/– 1 SD voor elke gemeten well,

— gegevens over cytotoxiciteit (testconcentraties die cytotoxiciteit veroorzaakte),

— bevestiging dat aan de QC-vereisten is voldaan,

▼M5

— relatieve verandering t.o.v. oplosmiddelcontrole gecorrigeerd voor cytotoxiciteit,

— een staafdiagram die de relatieve (x-voudige verandering) toont bij elke concentratie, SD en statistische significantie zoals omschreven in punten 49-54.

Gegevensinterpretatie:

— pas de procedure voor gegevensinterpretatie toe op de resultaten en bespreek bevindingen.

Bespreking:

— zijn er indicaties uit het onderzoek over de mogelijkheid dat de T/E2-gegevens beïnvloed kunnen zijn door indirecte effecten op de gluco- en mineraalcorticoïden?

Conclusies

LITERATUUR

1. OESO (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in aanhangsel 2 van hoofdstuk B.54 van deze bijlage

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. OESO (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, Parijs. Te vinden op [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

5. OESO (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, Parijs. Te vinden op: [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, Te vinden op: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

7. Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, Toxicol. Sci., 81, 78-89.

8. Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, Toxicol. Appl. Pharmacol., 182, 44-54.

9. Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrineactive chemicals: Model development for metyrapone, Environ. Health Perspect., 118: 265-272.

▼M5

10. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, Environ. Sci. Poll. Res., 17:1137-1148.

11. Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, Cancer Res., 50, 5488-5496.

12. He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, Chemosphere, 80:578-584.

13. Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, Environ. Sci. Technol., 39:2777-2785.

14. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, Environ. Sci. Pol. Res., 17:1137-1148.

15. Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, J. Clin. Endocrinol. Metab., 77, 731-737.

16. Hoofdstuk B.55 van deze bijlage: Hershberger-bioassay bij ratten: een kortlopende screeningstest op (anti)androgene eigenschappen.

17. Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, J. Lab. Clin. Med., 2, 222-231.

18. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods., 65, 55-63.

19. Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

20. Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

▼M5

Aanhangsel

DEFINITIES

Confluentie is de dekking of proliferatie die voor cellen is toegestaan op of door het kweekmedium.

Stof betekent een substantie of mengsel.

CV verwijst naar de variatiecoëfficiënt en wordt gedefinieerd als de verhouding van de standaarddeviatie van een verdeling tot haar rekenkundige gemiddelde.

CYP betekent cytochroom-P450-mono-oxygenases, een familie van genen en de enzymen die erdoor worden geproduceerd die betrokken zijn bij het katalyseren van een breed scala van biochemische reacties waaronder de synthese en het metabolisme van steroïdhormonen.

DPM zijn desintegraties per minuut. Dit is het aantal atomen in een gegeven hoeveelheid radioactief materiaal waarvan wordt vastgesteld dat deze in een minuut zijn gedesintegreerd.

E2 is 17b-oestradiol, het belangrijkste oestrogeen in zoogdiersystemen.

H295R-cellen zijn humane adrenocarcinoomcellen die de fysiologische eigenschappen hebben van zonaal ongedifferentieerde humane foetale adrenale cellen en die alle enzymen van de steroïdogenese-pathway vormen. Ze zijn beschikbaar bij de ATCC.

Vriesmedium wordt gebruikt om cellen in te vriezen en bewaren. Het bestaat uit voorraadmedium plus BD NuSerum en dimethylsulfoxide.

Lineair bereik is het bereik binnen de standaardcurve voor een hormoonmetingssysteem waar de resultaten evenredig zijn met de concentratie van de in het monster aanwezige geanalyseerde stof.

LOQ betekent "Limit of Quantification" of kwantificeringslimiet, en is de laagste hoeveelheid van een stof die kan worden onderscheiden van de afwezigheid van die stof (een blanco waarde) binnen een gestelde betrouwbaarheidslimiet. Voor het doel van deze methode wordt de LOQ normaliter gedefinieerd door de fabrikant van de testsystemen als deze niet anderszins gespecificeerd is.

LOEC betekent Lowest Observed Effect Concentration, ofwel de laagste concentratie waarbij de respons van de test statistisch verschillend is van die van de oplosmiddelcontrole.

NOEC is de No Observed Effect Concentration, ofwel de hoogste geteste concentratie als de test geen positieve respons geeft.

Passage is het aantal keren dat de cellen worden gesplitst na de start van een kweek op basis van ingevroren voorraad. De eerste passage die gestart is op basis van de ingevroren voorraad krijgt nummer één (1) toegewezen. Cellen die 1 keer gesplitst zijn worden gelabeld als passage 2 enz.

PBS is phosphate-buffered saline ofwel fosfaatgebufferde zoutoplossing van Dubecco.

Quality Control, afgekort QC of wel kwaliteitscontrole, verwijst naar de maatregelen die nodig zijn om zeker te stellen dat gegevens valide zijn.

QC-plaat is een 24-wells plaat met twee concentraties van de positieve en negatieve controles om de prestaties te controleren van een nieuwe partij cellen of om de positieve controles te leveren voor de test als stoffen worden getest.

Metingreeks (run) is een onafhankelijk experiment gekenmerkt door een nieuwe set oplossingen en controles.

Voorraadmedium is de basis voor de bereiding van andere reagens. Het bevat een 1:1 mengsel van Dulbecco's Modified Eagle's Medium en Ham's F-12 Nutrient mix (DMEM/F12) in een 15 mM HEPES-buffer zonder fenol rood of natriumbicarbonaat. Natriumbicarbonaat wordt als buffer toegepast, zie aanhangsel II van het validatierapport (4).

Verrijkt medium bestaat uit voorraadmedium plus BD Nu-Serum en ITS+ premium mix, zie aanhangsel II van het validatierapport (4).

Steroïdogenese is de synthetische pathway die van cholesterol tot de vorming van diverse steroïdhormonen leidt. Verschillende tussenproducten in de steroïdsynthese-pathways zoals progesteron en testosteron zijn op zich belangrijke hormonen maar dienen ook als precursors voor hormonen verderop in de synthetische pathway.

▼**M5**

T betekent testosteron, een van de twee belangrijkste androgenen in zoogdiersystemen.

Teststof betekent alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

Testplaat is de plaat waarop H295R-cellen aan teststof worden blootgesteld. Testplaten bevatten de oplosmiddelcontrole en de teststof in zeven concentraties in drievoud.

Trypsine 1X is een verdunde oplossing van het enzym trypsine, een pancreasserineprotease, die wordt gebruikt om cellen los te maken van een celkweekplaat, zie aanhangsel III van het validatierapport (4).

▼M5

B.58. GENMUTATIETESTEN MET SOMATISCHE CELLEN EN GESLACHTSCELLEN VAN TRANSGENE KNAAGDIEREN

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 488 (2013) van de OESO. Voor een grote verscheidenheid aan in-vitromutatietesten waarmee chromosomale en/of genmutaties kunnen worden gedetecteerd, zijn EU-testmethoden beschikbaar. Er bestaan testmethoden voor in-vivo-eindpunten (d.w.z. chromosoomaberraties en DNA-herstelsynthese). Hiermee worden echter geen genmutaties bepaald. Mutatietesten bij transgene knaagdieren (transgenic rodent, TGR) voorzien in de behoefte aan praktische en algemeen beschikbare in-vivotesten voor genmutaties.

2. De TGR-mutatietesten zijn uitgebreid beoordeeld (24) (33). Er wordt gebruikgemaakt van transgene ratten en muizen die meerdere kopieën van chromosomaal geïntegreerde plasmide- of faag-shuttlevectoren bevatten. De transgenen bevatten reporter-genen voor de detectie van verscheidene typen mutaties die in vivo door chemische teststoffen zijn geïnduceerd.

3. De mutaties die ontstaan in een knaagdier worden bepaald door isolatie van het transgen en analyse van het fenotype van het reporter-gen in een bacteriële gastheer waarin het reporter-gen ontbreekt. Door middel van TGR-genmutatietesten worden mutaties bepaald die zijn geïnduceerd in genetisch neutrale genen die zijn geïsoleerd uit vrijwel elk weefsel van het knaagdier. Met deze testen worden daarom veel van de bestaande beperkingen omzeild die samenhangen met het onderzoek van in-vivogenmutatie in endogene genen (bv. beperkte weefsels die geschikt zijn voor analyse, negatieve/positieve selectie voor mutaties).

4. De bewijskracht wijst erop dat transgenen op vergelijkbare wijze reageren op mutagenen als op endogene genen, in het bijzonder met betrekking tot de detectie van basenpaarsubstituties, frameshift-mutaties en kleine deleties en inserties (24).

5. De International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT) hebben de opname van TGR-genmutatietesten voor in-vivodetectie van genmutaties gesteund en hebben een protocol aanbevolen voor de tenuitvoerlegging ervan (15) (29). Deze testmethode is gebaseerd op de aanbevelingen. Verdere analyse ter ondersteuning van het gebruik van dit protocol is te vinden in (16).

6. Naar verwachting is het in de toekomst wellicht mogelijk om een TGR-genmutatietest te combineren met een toxiciteitsonderzoek bij herhaalde toediening (hoofdstuk B.7 van deze bijlage). Er zijn echter gegevens noodzakelijk om te waarborgen dat de gevoeligheid van de TGR-genmutatietesten niet wordt beïnvloed door de kortere tijdsduur van één dag tussen het einde van de toedieningsperiode en het monsternamepunt, zoals bij het toxiciteitsonderzoek bij herhaalde toediening het geval is, vergeleken met de drie dagen als in de TGR-genmutatietesten. Bovendien zijn er gegevens noodzakelijk die erop wijzen dat de prestatie van de test bij herhaalde toediening niet negatief wordt beïnvloed door een transgene knaagdierstam te gebruiken en geen traditionele knaagdierstam. Zodra deze gegevens beschikbaar zijn, zal deze testmethode bijgewerkt worden.

7. De definities van kernbegrippen worden uiteengezet in het aanhangsel.

▼M5

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

8. Voor de volgende TGR-genmutatietesten zijn voldoende gegevens beschikbaar om het gebruik ervan bij deze testmethode te ondersteunen: *lacZ* bacteriofaag muis (Muta™Mouse); *lacZ* plasmide muis; *gpt* delta (*gpt* en Spi$^-$) muis en rat; *lacI* muis en rat (Big Blue®), uitgevoerd onder standaardomstandigheden. Daarnaast kan de *cII*-positieveselectietest worden gebruikt voor beoordeling van mutaties in de Big Blue®- en Muta™Mouse-modellen. Mutagenese in de TGR-modellen wordt doorgaans beoordeeld als mutantfrequentie; indien nodig kan echter moleculaire analyse van de mutaties aanvullende informatie geven (zie paragraaf 24).

9. Deze in-vivogenmutatietesten bij knaagdieren zijn met name in die zin relevant voor de beoordeling van het gevaar van mutagene effecten, dat de responsen van de testen afhangen van het in-vivometabolisme, de farmacokinetiek, de DNA-herstelsynthese en de translaesie-DNA-synthese, hoewel deze aspecten per soort, weefsel en type DNA-schade kunnen verschillen. Een in-vivotest voor genmutaties is nuttig voor nader onderzoek van een mutageen effect dat is gedetecteerd door een in-vitrosysteem en voor de follow-up van resultaten van testen waarbij gebruik wordt gemaakt van andere in-vivo-eindpunten (24). Naast het oorzakelijke verband ervan met de inductie van kanker, is genmutatie een relevant eindpunt voor de voorspelling van aan mutatie ten grondslag liggende niet-kankerziekten in somatische weefsels (12) (13) alsook ziekten die worden overgedragen via de kiembaan.

10. Indien er aanwijzingen bestaan dat de chemische teststof of een relevant metaboliet geen van de te onderzoeken weefsels zal bereiken, is uitvoering van een TGR-genmutatietest niet geschikt.

PRINCIPE VAN DE TEST

11. In de in paragraaf 8 beschreven testen is het doelgen bacterieel of bacteriofaag van oorsprong en vindt isolatie uit het genomische knaagdier-DNA plaats door opname van het transgen in een λ-bacteriofaag- of plasmideshuttlevector. De procedure behelst de extractie van genomisch DNA uit het te onderzoeken knaagdierweefsel, in-vitrobewerking van het genomische DNA (d.w.z. verpakking van λ-vectoren of ligatie en elektroporatie van plasmiden om de shuttlevector te isoleren), en vervolgens detectie van mutaties in bacteriële gastheren onder geschikte omstandigheden. Bij de testen worden neutrale transgenen toegepast die gemakkelijk uit de meeste weefsels te isoleren zijn.

12. Het basis-TGR-genmutatie-experiment omvat behandeling van het knaagdier met een chemische stof gedurende een bepaalde tijdsduur. Chemische stoffen kunnen worden toegediend via elke geschikte route, waaronder implantatie (bv. testen van medische hulpmiddelen). De totale periode waarin het dier de stoffen krijgt, wordt aangeduid als de toedieningsperiode. De toediening wordt gewoonlijk, vóór het doden van het dier, gevolgd door een tijdsperiode waarin de chemische stof niet wordt toegediend en waarin niet-gerepareerde DNA-laesies worden gefixeerd tot stabiele mutaties. In de literatuur worden voor deze periode verscheidene termen gebruikt, namelijk manifestatietijd, fixatietijd of expressietijd; het einde van deze periode is het monsternamepunt (15) (29). Nadat het dier is gedood, wordt genomisch DNA uit het/de te onderzoeken weefsel(s) geïsoleerd en gezuiverd.

▼M5

13. De gegevens voor één weefsel per dier van meerdere verpakkings/ligatiebewerkingsstappen worden gewoonlijk bijeengevoegd en de mutantfrequentie wordt doorgaans beoordeeld met behulp van in totaal tussen 10^5 en 10^7 plaquevormende of kolonievormende eenheden. Bij gebruik van positieveselectiemethoden wordt het totaal aantal plaquevormende eenheden bepaald met een aparte set van niet-selectieve platen.

14. Positieveselectiemethoden zijn ontwikkeld om de detectie van mutaties in zowel het *gpt*-gen [*gpt* delta muis en rat, *gpt*$^-$-fenotype (20) (22) (28)] en het *lacZ*-gen [Muta™Mouse of *lacZ* plasmide muis (3) (10) (11) (30)] mogelijk te maken; terwijl *lacI*-genmutaties in Big Blue®-dieren worden gedetecteerd door middel van een niet-selectieve methode waarmee mutanten worden geïdentificeerd door vorming van gekleurde (blauwe) plaques. Positieveselectiemethodologie dient tevens voor de detectie van puntmutaties die ontstaan in het *cII*-gen van de λ-bacteriofaag-shuttlevector [Big Blue® muis of rat en Muta™Mouse (17)] en deletiemutaties in de λ-*red*- en *gam*-genen [Spi$^-$-selectie in *gpt* delta muis en rat (21) (22) (28)]. De mutantfrequentie wordt berekend door het aantal plaques/plasmiden die mutaties in het transgen bevatten te delen door het totaal aantal plaques/plasmiden die uit hetzelfde DNA-monster zijn geïsoleerd. In TGR-genmutatieonderzoeken is de mutantfrequentie de gerapporteerde parameter. Bovendien kan een mutantfrequentie worden bepaald als de fractie van cellen die onafhankelijke mutaties dragen; bij deze berekening is het noodzakelijk te corrigeren voor klonale expansie door sequencing van de geïsoleerde mutanten (24).

15. De mutaties die worden bepaald in de *lacI*-, *lacZ*-, *cII*- en *gpt*-puntmutatietesten bestaan hoofdzakelijk uit basenpaarsubstitutiemutaties, frameshift-mutaties en kleine inserties/deleties. Het relatieve aandeel van deze mutatietypen binnen spontane mutaties is vergelijkbaar met dat wat wordt gezien in het endogene *Hprt*-gen. Grote deleties worden alleen gedetecteerd met de Spi$^-$-selectie en de *lacZ*-plasmidetesten (24). De te onderzoeken mutaties zijn in-vivomutaties die in de muis of rat ontstaan. In-vivo- en ex-vivomutaties, die kunnen ontstaan tijdens de faag/plasmide-isolatie, replicatie of herstel, zijn relatief zeldzaam en kunnen in sommige systemen specifiek worden geïdentificeerd of uitgesloten door het systeem van bacteriële gastheer en positieve selectie.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Keuze van de diersoort

16. Er zijn momenteel diverse genmutatiedetectiemodellen met transgene muizen beschikbaar. Deze systemen zijn vaker toegepast dan modellen met transgene ratten. Als de rat duidelijk een geschikter model is dan de muis (bv. bij het onderzoeken van het mechanisme van carcinogenese voor een tumor die alleen bij ratten voorkomt, om de correlatie vast te stellen met een toxiciteitsonderzoek bij ratten of als bekend is dat het metabolisme van de rat representatiever is voor het metabolisme van de mens), dient het gebruik van modellen met transgene ratten te worden overwogen.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden

17. De temperatuur in de proefdierruimte moet idealiter 22 °C (± 3 °C) zijn. Hoewel de relatieve vochtigheid ten minste 30 % en bij voorkeur niet hoger dan 70 % (behalve bij het reinigen van de ruimte) dient te zijn, moet worden gestreefd naar handhaving van een relatieve vochtigheid van 50-60 %. Er dient kunstlicht te worden gebruikt, met een dagelijkse opeenvolging van 12 uur licht, gevolgd door 12 uur donker. Als voeding mag het

▼M5

gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof via het voer wordt toegediend. De dieren moeten worden gehuisvest in kleine groepen (niet meer dan vijf) van hetzelfde geslacht indien geen agressief gedrag wordt verwacht. De dieren kunnen individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is.

Voorbereiding van de dieren

18. Gezonde jonge geslachtsrijpe volwassen dieren (8-twaalf weken oud bij aanvang van de behandeling) worden willekeurig toegewezen aan de controlegroep en de behandelgroep. De dieren krijgen een unieke code. De dieren krijgen ten minste vijf dagen de tijd om aan de omstandigheden in het laboratorium te wennen. De kooien worden zodanig geplaatst dat mogelijke effecten door de plaatsing van de kooi tot een minimum worden beperkt. Per geslacht moet bij het begin van het onderzoek het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit niet meer dan ± 20 % van het gemiddelde gewicht bedragen.

Voorbereiding van de doses

19. Vaste chemische teststoffen moeten worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte oplosmiddelen of media of worden vermengd met voedsel of drinkwater voordat dit aan de dieren wordt gegeven. Vloeibare chemische teststoffen kunnen direct worden gegeven of eerst worden verdund. Voor blootstelling via inhalatie kunnen teststoffen worden toegediend als gas, damp of een vaste/vloeibare aerosol, naargelang van de fysisch-chemische eigenschappen ervan. Er dienen verse preparaten van de teststof te worden toegepast, tenzij met stabiliteitsgegevens is aangetoond dat bewaren van het preparaat aanvaardbaar is.

Testomstandigheden

Oplosmiddel/medium

20. Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisvolumes geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de chemische teststof moeten uitgesloten zijn. Als andere oplosmiddelen/media worden gebruikt dan de algemeen bekende, moet het gebruik ervan worden ondersteund met referentiegegevens die wijzen op de verenigbaarheid ervan. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel/medium te overwegen.

Positieve controles

21. Gewoonlijk dienen met de dieren tegelijkertijd positieve controles te worden uitgevoerd. Voor laboratoria met aangetoonde bekwaamheid (zie paragraaf 23) die deze testen routinematig gebruiken, kan DNA van dieren waarmee eerder gelijktijdig positieve controles zijn uitgevoerd in elk onderzoek worden opgenomen om het succes van de methode te bevestigen. Dergelijk DNA van eerdere experimenten moet worden verkregen van dezelfde soort en te onderzoeken weefsels en moet op de juiste wijze worden bewaard (zie paragraaf 36). Wanneer gelijktijdig uitgevoerde positieve controles worden gebruikt, is het niet noodzakelijk dat de toedieningsroute dezelfde is als die van de teststof; het dient echter bekend te zijn dat de positieve controles mutaties induceren in een of meer weefsels die zullen worden onderzocht voor de chemische teststof. De doses van de voor positieve controle gebruikte chemische stoffen dienen zodanig te worden gekozen, dat zwakke of matige effecten worden geproduceerd waarmee de prestatie en gevoeligheid van de test kritisch worden beoordeeld. Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen en enkele van de doelweefsels ervan staan vermeld in tabel 1.

▼M5

Tabel 1

Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen en enkele van de doelweefsels ervan

Voor positieve controle gebruikte chemische stof en CAS-nr.	Einecs-naam en Einecs-nr.	Kenmerken	Mutatie-doelweefsel	
			Rat	Muis
N-ethyl-N-nitroso-ureum [CAS-nr. 759-73-9]	N-ethyl-N-nitroso-ureum [212-072-2]	Direct werkend mutageen	Lever, longen	Beenmerg, colon, colonepitheel, darmen, lever, longen, milt, nier, ovarium-granulosacellen, mannelijke geslachtscellen
Ethylcarbamaat (urethaan) [CAS-nr. 51-79-6]	Urethaan [200-123-1]	Mutageen, vereist metabolisatie maar produceert slechts zwakke effecten		Beenmerg, voormaag, dunne darm, lever, longen, milt
2,4-Diaminotolueen [CAS-nr. 95-80-7]	4-Methyl-m-fenyleendiamine [202-453-1]	Mutageen, vereist metabolisatie, ook positief in de Spi$^-$-test	Lever	Lever
Benzo[a]pyreen [CAS-nr. 50-32-8]	Benzo[def]chryseen [200-028-5]	Mutageen, vereist metabolisatie	Lever, omentum	Beenmerg, borst, colon, voormaag, kliermaag, hart, lever, longen, mannelijke geslachtscellen

Negatieve controles

22. Voor elk monsternamepunt dienen negatieve controles te worden meegenomen die zijn behandeld met alleen oplosmiddel of medium en verder op dezelfde wijze zijn behandeld als de behandelgroepen. Bij het ontbreken van historische of gepubliceerde controlegegevens waaruit blijkt dat het gekozen oplosmiddel/medium geen schadelijke of mutagene effecten induceert, dienen ook onbehandelde controles te worden meegenomen voor elk monsternamepunt om vast te stellen dat de mediumcontrole aanvaardbaar is.

Verificatie van de geschiktheid van laboratoria

23. De bekwaamheid in deze testen dient te worden vastgesteld door te bewijzen in staat te zijn verwachte resultaten uit gepubliceerde gegevens (24) te reproduceren voor: 1) mutantfrequenties met voor positieve controle gebruikte chemische stoffen (waaronder zwakke responsen) zoals die staan vermeld in tabel 1, niet-mutagenen en mediumcontroles, en 2) transgenisolatie uit genomisch DNA (bv. verpakkingsefficiëntie).

Sequencing van mutanten

24. Voor regelgevingstoepassingen is DNA-sequencing van mutanten niet vereist, in het bijzonder niet bij een duidelijk positief of negatief resultaat. Sequencinggegevens kunnen echter nuttig zijn als er sprake is van grote interindividuele variatie. In deze gevallen kan sequencing worden gebruikt om de mogelijkheid van jackpots of klonale voorvallen uit te sluiten door vaststelling van het aandeel van unieke mutanten in een bepaald weefsel. Sequencing van ongeveer 10 mutanten per weefsel per dier moet voldoende

▼M5

zijn om enkel te bepalen of klonale mutanten bijdragen aan de mutantfrequentie; sequencing van wel 25 mutanten kan noodzakelijk zijn om de mutantfrequentie wiskundig te corrigeren voor klonaliteit. Sequencing van mutanten kan ook worden overwogen wanneer kleine toenames in de mutantfrequentie (d.w.z. net hoger dan de onbehandeldecontrolewaarden) zijn vastgesteld. Verschillen in het mutantspectrum tussen de mutantkoloniën van behandelde en onbehandelde dieren kunnen wijzen op een mutageen effect (29). Tevens kunnen mutatiespectra nuttig zijn voor het ontwikkelen van mechanistische hypotheses. Wanneer sequencing deel uit dient te maken van het onderzoeksprotocol is voorzichtigheid geboden ten aanzien van de opzet van dergelijke onderzoeken, in het bijzonder met betrekking tot het aantal gesequencede mutanten per monster om voldoende onderscheidend vermogen, in overeenstemming met het gebruikte statistische model, te verkrijgen (zie paragraaf 43).

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

25. Het aantal dieren per groep dat voldoende is om het onderscheidend vermogen te verkrijgen dat noodzakelijk is om ten minste een verdubbeling van de mutantfrequentie te kunnen detecteren, dient vooraf te worden bepaald. De groepsgrootte van de dieren zal minimaal vijf zijn. Als het onderscheidend vermogen echter onvoldoende is, dient het aantal dieren in voorkomend geval te worden verhoogd. Doorgaans dienen mannelijke dieren te worden gebruikt. In bepaalde gevallen is testen met alleen vrouwelijke dieren gerechtvaardigd, bv. wanneer vrouwspecifieke geneesmiddelen voor menselijk gebruik worden getest of wanneer vrouwspecifiek metabolisme wordt onderzocht. Indien er significante verschillen bestaan tussen de geslachten wat betreft toxiciteit of metabolisme, zijn zowel mannelijke als vrouwelijke dieren noodzakelijk.

Toedieningsperiode

26. Op grond van waarnemingen dat mutaties accumuleren met elke behandeling, is een behandelschema van herhaalde doses noodzakelijk met dagelijkse behandelingen gedurende een periode van 28 dagen. Dit wordt gewoonlijk als aanvaardbaar beschouwd, zowel voor voldoende accumulatie van mutaties door zwakke mutagenen als voor een blootstellingstijd die toereikend is voor de detectie van mutaties in langzaam delende organen. Voor sommige beoordelingen kunnen alternatieve behandelschema's geschikt zijn en deze alternatieve toedieningsschema's dienen in het protocol wetenschappelijk onderbouwd te worden. Behandelingen dienen niet korter te zijn dan de tijd die nodig is voor de volledige inductie van alle relevante metaboliserende enzymen, en kortere behandelingen kunnen het noodzakelijk maken meerdere monsternamepunten, die geschikt zijn voor organen met verschillende proliferatiesnelheden, te gebruiken. In ieder geval dient alle beschikbare informatie (bv. over algemene toxiciteit of metabolisme en farmacokinetiek) te worden gebruikt bij de onderbouwing van een protocol, in het bijzonder wanneer wordt afgeweken van de bovenstaande standaardaanbevelingen. Vanwege mogelijke verhoging van de gevoeligheid dienen behandeltijden langer dan acht weken duidelijk te worden toegelicht en te worden onderbouwd, aangezien lange behandeltijden een duidelijke toename in de mutantfrequentie door klonale expansie kunnen bewerkstelligen (29).

Dosisniveaus

27. Dosisniveaus moeten worden gebaseerd op de resultaten van een doseringsbereikstudie waarin de algehele toxiciteit wordt gemeten en die verricht is via dezelfde blootstellingsroute, of op de resultaten van eerder verrichte subacute toxiciteitsonderzoeken. Niet-transgene dieren van dezelfde knaagdierstam kunnen worden gebruikt om het doseringsbereik vast te stellen. In

▼M5

de hoofdtest moet, om dosisresponsinformatie te krijgen, een volledig onderzoek een negatieve controlegroep omvatten (zie paragraaf 22) en minimaal drie dosisniveaus die voldoende ver uit elkaar liggen, behalve als de limietdosis gebruikt is (paragraaf 28). De hoogste dosis moet de Maximale Verdragen Dosis (Maximum Tolerated Dose — MTD) zijn. De MTD wordt gedefinieerd als de dosis die tekenen van toxiciteit geeft waarbij hogere doses, op basis van hetzelfde doseringsschema, naar verwachting tot de dood zou leiden. Chemische stoffen met specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) en chemische stoffen die verzadiging van toxicokinetische eigenschappen vertonen kunnen uitzonderingen zijn op de doseringscriteria en moeten per geval worden beoordeeld. De gebruikte dosisniveaus moeten een bereik dekken van maximale tot weinig of geen toxiciteit.

Limiettest

28. Als uit doseringsbereikstudies of bestaande gegevens bij gerelateerde knaagdierstammen blijkt dat een behandelingsregime van minstens de limietdosis (zie onder) geen waarneembare toxische effecten geeft, en als genotoxiciteit op grond van gegevens bij structuurgerelateerde chemische stoffen naar verwachting geen genotoxiciteit geeft, dan is een volledig onderzoek met drie dosisniveaus mogelijk niet nodig. Voor een toedieningsperiode van 28 dagen (d.w.z. 28 dagelijkse behandelingen) is de limietdosis 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag. Voor een toedieningsperiode van 14 dagen of minder is de limietdosis 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag (doseringsschema's die afwijken van 28 dagelijkse behandelingen moeten in het protocol wetenschappelijk worden onderbouwd; zie paragraaf 26).

Toediening van de doses

29. De teststof wordt meestal toegediend via een maagsonde of een geschikte intubatiecanule. Over het algemeen moet bij de opzet van een test rekening worden gehouden met de verwachte blootstellingsroute bij mensen. Daarom kunnen andere blootstellingsroutes (zoals drinkwater, subcutaan, intraveneus, topicaal, inhalatie, intratracheaal, voeding of implantatie) aanvaardbaar zijn als deze onderbouwd kunnen worden. Intraperitoneale injectie wordt niet aanbevolen omdat deze bij mensen geen fysiologisch relevante blootstellingsroute is. Het maximale vloeistofvolume dat via sonde of injectie per keer kan worden toegediend hangt af van de grootte van het dier. Het volume mag niet hoger zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Hogere volumes dan dit moeten worden onderbouwd. Behalve bij irriterende of bijtende stoffen, die normaal gesproken bij hogere concentraties hevigere effecten hebben, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat er op alle dosisniveaus hetzelfde volume wordt toegediend.

Bemonsteringstijdstip

Somatische cellen

30. Het bemonsteringstijdstip is een kritische variabele omdat deze wordt bepaald door de periode die nodig is om mutaties te fixeren. Deze periode is weefselspecifiek en lijkt verband te houden met de vernieuwingstijd van de celpopulatie, waarbij beenmerg en darm snelle responders zijn en de lever veel langzamer is. Een geschikt compromis voor meting van mutatiefrequenties bij zowel snel als langzaam prolifererende weefsels is 28 dagen opeenvolgende dagelijkse behandelingen (zoals beschreven in paragraaf 26) en monstername drie dagen na de laatste behandeling; maar de maximale mutatiefrequentie zal zich onder deze omstandigheden bij langzaam prolifererende weefsels mogelijk niet manifesteren. Als langzaam prolifererende weefsels van bijzonder belang zijn, dan kan een later bemonsteringstijdstip 28 dagen na de toedieningsperiode van 28 dagen geschikter zijn (16) (29). In dergelijke gevallen komt het latere bemonsteringstijdstip in de plaats van de bemonstering na drie dagen; dit zou wetenschappelijk onderbouwd moeten worden.

▼M5

Geslachtscellen

31. TGR-tests zijn goed geschikt voor onderzoek naar genmutatie-inductie bij mannelijke geslachtscellen (7) (8) (27), waarin de tijd en kinetiek van de spermatogenese goed gedefinieerd zijn (27). Omdat het aantal eicellen dat voor analyse beschikbaar is laag is, zelfs na superovulatie, en er geen DNA-synthese in de oöcyt plaatsvindt, kunnen mutaties in vrouwelijke geslachtscellen niet bepaald worden met transgene tests (31).

32. De bemonsteringstijdstippen voor mannelijke geslachtscellen moet zo worden gekozen dat alle blootgestelde celtypen gedurende de gehele geslachtscelontwikkeling worden bemonsterd en dat het doelstadium in de monstername voldoende wordt blootgesteld. De tijd voor de progressie van ontwikkelende geslachtscellen van spermatogoniale stamcellen tot rijp sperma dat de vas deferens/cauda epididymisbereikt is ~49 dagen voor de muis (36) en ~70 dagen voor de rat (34) (35). Na blootstelling van 28 dagen gevolgd door een monsterperiode van drie dagen, vertegenwoordigt geaccumuleerd sperma dat uit de vas deferens/cauda epididymis (7)(8) is verkregen een celpopulatie die gedurende ongeveer de tweede helft van de spermatogenese is blootgesteld, die de meiotische en postmeiotische periode omvat, maar niet de spermatogoniale of stamcelperiode. Om voldoende cellen in de vas deferens/cauda epididymis te bemonsteren die tijdens de blootstellingsperiode spermatogoniale stamcellen waren, is een later bemonsteringstijdstip minimaal zeven weken (muizen) of tien weken (ratten) na afloop van de behandeling nodig.

33. Cellen die geëxtrudeerd zijn uit de seminifereuze tubuli na behandeling van 28 + drie dagen vormen een gemengde populatie die verrijkt is voor alle stadia van ontwikkelende geslachtscellen (7) (8). Het bemonsteren van deze cellen voor het detecteren van genmutaties geeft niet een even exacte beoordeling van de stadia waarin de geslachtscelmutaties geïnduceerd worden als door het bemonsteren van spermatozoën uit de vas deferens/cauda epididymis (omdat er een verscheidenheid aan geslachtsceltypen uit de tubuli wordt bemonsterd en deze celpopulatie gecontamineerd wordt door enkele somatische cellen). Maar het bemonsteren van cellen uit de seminifereuze tubuli naast spermatozoën uit de vas deferens/cauda epididymis na een bemonsteringsregime van slechts 28 + drie dagen geeft enige dekking van cellen die zijn blootgesteld tijdens de meeste fasen van de geslachtscelontwikkeling, en kan bruikbaar zijn voor het detecteren van bepaalde geslachtscelmutagenen.

Observaties

34. Algemene klinische waarnemingen moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met inachtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening. De gezondheidstoestand van de dieren moet worden geregistreerd. Alle dieren moeten ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Alle dieren moeten ten minste eenmaal per week worden gewogen, en bij het doden. Ook het voedselverbruik moet ten minste wekelijks worden gemeten. Als de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet het waterverbruik bij elke verversing van water en ten minste wekelijks worden gemeten. Dieren die niet-letale indicatoren van excessieve toxiciteit vertonen moeten voor afloop van de testperiode worden gedood (23).

▼M5

Weefselverzameling

35. De rationale voor weefselverzameling moet duidelijk worden gedefinieerd. Omdat mutatie-inductie in bijna alle weefsels onderzocht kan worden, moet de selectie van de te verzamelen weefsels worden gebaseerd op de reden voor uitvoering van het onderzoek en eventuele bestaande gegevens over mutageniteit, carcinogeniteit of toxiciteit voor de onderzochte chemische stof. Belangrijke factoren ter overweging moeten zijn de toedieningsroute (op basis van de waarschijnlijke blootstelling bij mensen), de voorspelde weefseldistributie, en het mogelijke werkingsmechanisme. Als er geen achtergrondinformatie beschikbaar is, moeten verschillende somatische weefsels die van belang kunnen zijn, worden verzameld. Dit moeten snel prolifererende, langzaam prolifererende en contactplaatsweefsels zijn. Daarnaast moeten spermatozoën uit de vas deferens/cauda epididymis en zich ontwikkelende geslachtscellen uit de seminifereuze tubuli (zoals beschreven in paragrafen 32 en 33) worden verzameld en opgeslagen voor het geval er in de toekomst op mutageniteit van de geslachtscellen moet worden geanalyseerd. Het orgaangewicht moet worden gemeten, en voor grotere organen moet uit alle dieren hetzelfde gebied worden verzameld.

Opslag van weefsels en DNA

36. Weefsels (of weefselhomogenaten) moeten worden bewaard bij of onder – 70 °C en binnen 5 jaar voor DNA-isolatie worden gebruikt. Geïsoleerd DNA, gekoeld bewaard bij 4 °C in een geschikte buffer, wordt idealiter binnen één jaar voor mutatieanalyse gebruikt.

Selectie van weefsels voor mutatieanalyse

37. De keuze van weefsels moet worden gebaseerd op overwegingen zoals: 1) de toedieningsroute of de locatie van eerste contact (bv. glandulaire maag als toediening oraal is, long als toediening per inhalatie is, of huid als topicaal wordt aangebracht), en 2) farmacokinetische parameters die in algemene toxiciteitsonderzoeken zijn waargenomen en die iets zeggen over weefseldispositie, -retentie of -accumulatie, of doelorganen voor toxiciteit. Als onderzoeken worden verricht als vervolg op carcinogeniteitsonderzoeken moeten doelweefsels voor carcinogeniteit worden overwogen. Weefsels voor analyse moeten zo worden gekozen dat chemische stoffen die direct werkende in vitro-mutagenen zijn, snel worden gemetaboliseerd, zeer reactief zijn of slecht worden geabsorbeerd, of die waarvoor het doelweefsel door de toedieningsroute wordt bepaald, maximaal worden gedetecteerd (6).

38. Als er geen achtergrondinformatie is, en rekening houdend met de contactplaats als gevolg van de toedieningsroute, moeten de lever en minstens één sneldelend weefsel (bv. glandulaire maag, beenmerg) op mutageniteit worden beoordeeld. In de meeste gevallen kunnen de bovenstaande vereisten worden bereikt door analyse van twee zorgvuldig geselecteerde weefsels, maar in sommige gevallen zijn er drie of nog meer nodig. Als er redenen zijn om met name bezorgd te zijn over effecten op geslachtscellen, inclusief positieve reacties in somatische cellen, moeten de geslachtscelweefsels op mutaties worden beoordeeld.

Metingsmethoden

39. Voor de aanbevolen transgene modellen zijn standaard laboratorium- of gepubliceerde methoden beschikbaar voor de detectie van mutaties: *lacZ* lambda bacteriofaag en plasmide (30); *lacI* muis (2) (18); *gpt* delta muis (22); *gpt* delta rat (28); *cII* (17). Modificaties moeten onderbouwd en goed gedocumenteerd worden. Gegevens uit meerdere verpakkingen kunnen worden samengevoegd en gebruikt om een voldoende aantal plaques of kolonies te bereiken. Maar het feit dat er een hoog aantal verpakkingsreacties nodig is om het gewenste aantal plaques te bereiken, kan wijzen op slechte DNA-kwaliteit. In zulke gevallen moeten de gegevens voorzichtig worden

▼M5

geïnterpreteerd omdat ze mogelijk onbetrouwbaar zijn. Het optimale totale aantal plaques of kolonies per DNA-monster wordt bepaald door de statistische waarschijnlijkheid van het detecteren van voldoende aantallen mutaties bij een gegeven spontane mutatiefrequentie. Over het algemeen zijn minimaal 125 000 tot 300 000 plaques nodig als de spontane mutatiefrequentie in de orde van 3×10^{-5} (15) ligt. Voor de Big Blue® *lacI*-testmethode is het belangrijk om aan te tonen dat het hele bereik aan mutante kleurfenotypen gedetecteerd kan worden door de passende kleurcontroles bij elke plaat te includeren. Weefsels en de resulterende monsters (items) moeten volgens een blokopzet worden verwerkt en geanalyseerd, waarbij items uit de vehiculum/oplosmiddelcontrolegroep, de positieve controlegroep (indien gebruikt) of positieve controle-DNA (indien passend), en elke behandelingsgroep samen verwerkt worden.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

40. Gegevens van individuele dieren moeten in tabelvorm worden gepresenteerd. Het dier is de proefeenheid. Het verslag moet het totale aantal plaquevormende eenheden (pfu) of kolonievormende eenheden (cfu) vermelden, met het aantal mutanten, en de mutatiefrequentie voor elk weefsel uit elk dier. Als er meerdere verpakkings/rescue-reacties zijn, moet het aantal reacties per DNA-monster worden vermeld. Hoewel gegevens voor elke individuele reactie bewaard moeten worden, hoeft alleen de totale pfu of cfu gemeld te worden. Gegevens over toxiciteit en klinische tekenen moeten volgens paragraaf 34 worden gemeld. Alle sequentieresultaten moeten voor elke geanalyseerde mutant worden gepresenteerd, en de resulterende mutatiefrequentieberekeningen voor elk dier en weefsel moeten worden getoond.

Statistische beoordeling en interpretatie van resultaten

41. Er zijn verschillende criteria voor het vaststellen van een positief resultaat, zoals een dosisgerelateerde toename van de mutatiefrequentie, of een duidelijke verhoging van de mutatiefrequentie in een dosisgroep vergeleken met de oplosmiddel/vehiculumcontrolegroep. Minstens drie behandelde dosisgroepen moeten worden geanalyseerd om voldoende gegevens voor een dosisresponsanalyse te verkrijgen. Hoewel de biologische relevantie van de resultaten de primaire overweging moet zijn, kunnen passende statistische methoden worden toegepast als hulpmiddel bij beoordeling van de testresultaten (4) (14) (15) (25) (26). De gebruikte statistische tests moeten het dier als de proefeenheid beschouwen.

42. Een teststof waarvoor de resultaten niet aan de bovenstaande criteria in enig weefsel voldoen wordt in deze bepaling als niet-mutageen beschouwd. Voor de biologische relevantie van een negatief resultaat moet de weefselblootstelling worden bevestigd.

43. Voor DNA-sequentieanalyses zijn diverse statistische benaderingen beschikbaar om te helpen bij de interpretatie van de resultaten (1) (5) (9) (19).

44. Bij beoordeling van de biologische significantie van de respons kan het vaststellen of de waargenomen waarden binnen of buiten het historische controlebereik vallen een aanwijzing vormen (32).

▼**M5**

Testverslag

45. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— identificatiegegevens en CAS-nr., indien bekend,

— bron, partijnummer indien beschikbaar,

— fysische aard en zuiverheid,

— fysisch-chemische eigenschappen die voor de uitvoering van het onderzoek relevant zijn,

— stabiliteit van de teststof, indien bekend.

Oplosmiddel/vehiculum:

— onderbouwing van keuze vehiculum,

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/vehiculum, indien bekend,

— bereiding van toedieningsvormen voor voer, drinkwater of inhalatie,

— analytische bepalingen op toedieningsvormen (zoals stabiliteit, homogeniteit, nominale concentraties).

Proefdieren:

— gebruikte diersoort/stam en motivering van de keuze,

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren,

— de herkomst, de huisvesting, de voeding enz.,

— individueel gewicht van de dieren bij de start van de test, waaronder bereik van het lichaamsgewicht, gemiddelde en standaarddeviatie voor elke groep.

Testomstandigheden:

— positieve en negatieve (vehiculum/oplosmiddel) controlegegevens,

— gegevens uit het doseringsbereikonderzoek,

— motivering voor de keuze van de dosisniveaus,

— gedetailleerde gegevens over de bereiding van de teststof,

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof,

— motivering voor de toedieningsroute,

— methoden voor meting van diertoxiciteit, waaronder, indien beschikbaar, histopathologische of hematologische analyses en frequentie waarmee het dier is geobserveerd en het lichaamsgewicht is gemeten,

— methoden om te verifiëren of de teststof het doelweefsel heeft bereikt, of de algemene circulatie, als negatieve resultaten verkregen zijn,

▼**M5**

— feitelijke dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag) berekend op basis van de teststofconcentratie in voer/drinkwater (ppm) en consumptie, indien van toepassing,

— gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater,

— gedetailleerde omschrijving van behandeling en bemonsteringsschema's en motivering van de keuzes,

— wijze van doden,

— procedures voor het isoleren en preserveren van weefsels,

— methoden voor het isoleren van genoom-DNA van de knaagdieren, waarbij het transgen uit het genoom-DNA wordt verkregen en het transgen-DNA wordt overgebracht naar een bacteriële gastheer,

— bron en partijnummers van alle cellen, kits en reagentia (waar van toepassing),

— methoden voor de telling van mutanten,

— methoden voor moleculaire analyse van mutanten en gebruik bij correctie voor clonaliteit en/of berekening van de mutatiefrequenties, indien van toepassing.

Resultaten:

— conditie van het dier voor en tijdens de testperiode, inclusief tekenen van toxiciteit,

— lichaams- en orgaangewicht bij het doden van het dier,

— voor elk weefsel/dier, het aantal mutanten, aantal beoordeelde plaques of kolonies, mutatiefrequentie,

— voor elk(e) weefsel/diergroep, aantal verpakkingsreacties per DNA-monster, totaal aantal mutanten, gemiddelde mutatiefrequentie, standaarddeviatie,

— dosisresponsrelatie, waar mogelijk,

— voor elk weefsel/dier, het aantal onafhankelijke mutanten en gemiddelde mutatiefrequentie, indien moleculaire analyse van mutaties verricht is,

— gelijktijdige en historische negatieve controlegegevens met bereiken, gemiddelden en standaarddeviaties,

— gelijktijdige positieve controle (of niet-gelijktijdige DNA-positieve controle) gegevens,

— analytische bepalingen, indien beschikbaar (bv. DNA-concentraties gebruikt in verpakking, DNA-sequentiegegevens),

— gebruikte statistische analyses en methoden.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

▼M5

LITERATUUR

1. Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), „Statistical Testfor the Comparison of Samples from Mutational Spectra", J. Mol. Biol., 194: 391-396.

2. Bielas, J.H. (2002), „A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement", Mutation Res., 518: 107-112.

3. Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), „Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying in vivo Mutations" Nature, 377(6550): 657-659

4. Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), „Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice", Environ. Mol. Mutagen, 25(3): 246-255.

5. Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), „Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency", Environ. Mol. Mutagen, 28: 405-413.

6. Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), „Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing in vivo for the Detection of Site-of-contact Mutagens", Mutagenesis, 14(1): 141-151.

7. Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995), „Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of lacZ Transgenic Mice", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7485-7489.

8. Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), „Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells", Mutation Res., 388(2-3): 197-212.

9. Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), „Bayesian Analysis of Mutational Spectra", Genetics, 156: 1411-1418.

10. Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989), „Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(20): 7971-7975.

11. Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), „A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive E. coli Host", Biotechniques, 14(3): 326, 330.

12. Erikson, R.P. (2003), „Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer", Mutation Res., 543: 125-136.

13. Erikson, R.P. (2010), „Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update", Mutation Res., 705: 96-106.

14. Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), „Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays", Mutagenesis, 13(3): 249-255.

15. Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), „In vivo Transgenic Mutation Assays", Environ. Mol. Mutagen., 35: 253-259.

16. Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), „Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays", Environ. Mol. Mutagen., 41: 1-6.

▼**M5**

17. Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), „Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for in vivo Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target", Proc. Natl. Acad. Sci. *USA*, 93(17): 9073-9078.

18. Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), „The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing", Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212-218.

19. Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), „Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis", Carcinogenesis, 29(4): 772-778.

20. Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), „A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi$^-$ and 6-thioguanine Selections", Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465-470.

21. Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), „Spi $^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice", Environ. Mol. Mutagen., 34(1): 9-15.

22. Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), „Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays", Mutation Res., 455(1-2): 191-215.

23. OESO (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/MONO(2000)7, OESO, Paris.

24. OESO (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OESO, Paris.

25. Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), „Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay", Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231-245.

26. Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), „Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study", Mutation. Res., 388(2-3): 249-289.

27. Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), „Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays", Mutation. Res., 598: 164-193.

28. Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), „Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers", Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

29. Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), „In vivo Transgenic Mutation Assays", Mutation Res., 540: 141-151.

30. Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), „Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations in vivo" in: G. Pfeifer (ed.), Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391-410.

▼**M5**

31. Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), „A lacZ Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells", Mutation Res., 578(1-2): 117-123.

32. Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33. OESO (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, OESO, Parijs.

34. Clermont, Y. (1972), „Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal". Physiol. Rev. 52: 198-236.

35. Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), „The Epididymis", in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, pp. 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

Aanhangsel

DEFINITIES

Toedieningsperiode: de totale periode waarin een dier een stof krijgt toegediend.

Basepaarsubstitutie: een type mutatie waardoor één DNA-nucleotidebase wordt vervangen door een andere DNA-nucleotidebase.

Capside: het eiwitomhulsel om een virusdeeltje.

Stof: een stof of mengsel.

Klonale expansie: de productie van veel cellen uit één (mutante) cel.

Kolonievormende eenheid(cfu): een maat voor het aantal levensvatbare bacteriën.

Concatameer: een lang continu biomolecuul dat bestaat uit meerdere identieke kopieën die in serie gekoppeld zijn.

Cos-site: een segment enkelstrengig DNA met 12 nucleotiden dat zich aan beide uiteinden van het dubbelstrengig genoom van de bacteriofaag lambda bevindt.

Deletie: een mutatie waarin een of meer (sequentiële) nucleotiden van het genoom verloren gaan.

Elektroporatie: de toediening van elektrische pulsen om de permeabiliteit van celmembranen te verhogen.

Endogeen gen: een eigen gen van het genoom.

Extrabinomiale variatie: hogere variabiliteit bij herhaalde schattingen van een populatieproportie dan zou worden verwacht als de populatie een binomiale distributie had.

Frameshift-mutatie: een genetische mutatie veroorzaakt door insertie of deletie van een aantal nucleotiden dat niet gelijkmatig deelbaar is door drie binnen een DNA-sequentie die voor een eiwit/peptide codeert.

Insertie: toevoeging van een of meer nucleotidebaseparen in een DNA- sequentie.

Jackpot: een groot aantal mutanten die zijn ontstaan door klonale expansie van één mutatie.

Grote deleties: deleties in DNA van meer dan enkele kilobases (die effectief gedetecteerd worden met de Spi$^-$selectie- en de lacZ-plasmide-testmethoden).

Ligatie: de covalente verbinding van twee uiteinden van DNA-moleculen met DNA-ligase.

Mitogeen: een stof die een cel aanzet om met celdeling te beginnen en mitose in gang te zetten (in feite celdeling).

Neutraal gen: een gen dat niet wordt beïnvloed door positieve of negatieve selectiedruk.

Verpakking: de synthese van infectieuze faagdeeltjes uit een bereiding van faagcapside en staarteiwitten en een concatameer van faag-DNA-moleculen. Veel gebruikt om op een lambdavector gekloond DNA te verpakken (gescheiden door cos-sites) in infectieuze lambdadeeltjes.

Verpakkingsefficiëntie: de efficiëntie waarmee verpakte bacteriofagen uit gastheerbacterieën worden verkregen.

▼M5

Plaquevormende eenheid (pfu): een maat voor aantal levensvatbare bacteriofagen.

Puntmutatie: een algemene term voor een mutatie in slechts een kleine sequentie van DNA waaronder kleine inserties, deleties en basepaarsubstituties.

Positieve selectie: een methode waardoor alleen mutanten kunnen overleven.

Reporter-gen: een gen waarvan het gemuteerde genproduct makkelijk detecteerbaar is.

Bemonsteringstijdstip: het einde van detijdperiode, voordat het dier wordt gedood, waarin de stof niet wordt toegediend en waarbij onverwerkte DNA-laesies in stabiele mutaties worden gefixeerd.

Shuttlevector: een vector die zo is geconstrueerd dat deze zich in twee verschillende gastheersoorten kan voortplanten; in een shuttlevector ingebracht DNA kan dus in twee verschillende celtypen of twee verschillende organismen worden getest of gemanipuleerd.

Teststof: Alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

Transgeen: van, in verband met, of het zijn van een organisme waarvan het genoom veranderd is door de overdracht van een gen of genen uit een andere soort.

▼M7

B.59. IN-CHEMICOHUIDSENSIBILISATIE: DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY (DPRA-TEST)

INLEIDING

Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 442C (2015) van de OESO. Een huidsensibiliserende stof is een stof die een allergische reactie uitlokt na contact met de huid, zoals gedefinieerd in het wereldwijd geharmoniseerd systeem voor de indeling en etikettering van chemische stoffen van de Verenigde Naties (GHS) (1) en Verordening (EG) nr. 1272/2008 van de Europese Unie betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsel (CLP-verordening) ([1]). Deze testmethode reikt een in-chemicoprocedure (Direct Peptide Reactivity Assay — DPRA) aan die kan worden gebruikt ter ondersteuning van de onderscheiding tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen, in overeenstemming met het VN-GHS en de CLP-verordening.

Er bestaat algemene overeenstemming over de belangrijkste biologische gebeurtenissen die aan de basis liggen van huidsensibilisatie. De bestaande kennis van de chemische en biologische mechanismen die verband houden met huidsensibilisatie zijn samengevat in een Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), van de moleculaire inleidende gebeurtenis over de tussenliggende gebeurtenissen tot het schadelijke effect, te weten allergische contactdermatitis bij mensen of contactovergevoeligheid bij knaagdieren. De moleculaire gebeurtenis in de AOP die aanleiding geeft tot huidsensibilisatie, is de covalente binding van elektrofiele stoffen aan nucleofiele centra in eiwitten in de huid.

De bepaling van de huidsensibilisatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren. Bij de klassieke methoden op basis van cavia's, de maximalisatietest met cavia's (GMPT) van Magnusson-Kligman en de Buehler-test (TM B.6 (3)) worden zowel de inductie- als de uitlokkingsfase van huidsensibilisatie bestudeerd. Ook een murinetest, de lokale lymfkliertest (LLNA, TM B.42 (4)), en de twee niet-radioactieve aanpassingen ervan, LLNA: DA (TM B.50 (5)) en LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), waarbij telkens uitsluitend de inductierespons wordt beoordeeld, zijn gangbaar geworden aangezien zij beter zijn voor het dierenwelzijn dan tests met cavia's en het mogelijk maken om de inductiefase van huidsensibilisatie objectief te meten.

Recenter zijn ook mechanistisch gebaseerde in-chemico- en in-vitrotestmethoden wetenschappelijk geldig bevonden om de potentiële huidsensibilisatie van chemische stoffen te beoordelen. Om de dierproeven die momenteel worden gebruikt, volledig te kunnen vervangen, zullen echter combinaties van methoden zonder dierproeven (in silico, in chemico, in vitro) binnen geïntegreerde test- en beoordelingsbenaderingen (Integrated Approaches to Testing and Assessment of IATA) nodig zijn, aangezien elk van de momenteel beschikbare testmethoden zonder dierproeven vanuit mechanistisch oogpunt slechts een beperkt deel van de AOP afdekt (2) (7).

De DPRA wordt voorgesteld om de moleculaire gebeurtenis die aanleiding geeft tot huidsensibilisatie van de desbetreffende AOP, namelijk de eiwitreactiviteit, te bestuderen door de reactiviteit van teststoffen op synthetische modelpeptiden die lysine of cysteïne bevatten, te kwantificeren (8). Vervolgens worden de waarden voor het percentage peptide-depletie voor cysteïne en lysine gebruikt om een stof in te delen in een van vier mogelijke reactiviteitsklassen om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven (9).

([1]) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

▼M7

De DPRA werd geëvalueerd in een valideringsstudie onder leiding van het referentielaboratorium voor alternatieven voor dierproeven van de Europese Unie (EURL ECVAM) en in een latere onafhankelijke beoordeling door vakgenoten van het Raadgevend wetenschappelijk comité van het ECVAM (ESAC) en werd wetenschappelijk geldig bevonden (10) voor gebruik als onderdeel van een IATA ter ondersteuning van het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen met het oog op de gevarenindeling en etikettering. Voorbeelden van het gebruik van DPRA-gegevens in combinatie met andere informatie zijn beschreven in de literatuur (11) (12) (13) (14).

Definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN, TOEPASSELIJKHEID EN BEPERKINGEN

De correlatie tussen eiwitreactiviteit en potentiële huidsensibilisatie is uitvoerig beschreven (15) (16) (17). Desondanks volstaat informatie over de eiwitreactiviteit die werd verzameld met behulp van test- en niet-testmethoden als dusdanig niet altijd om te besluiten dat een chemische stof geen huidsensibilisatie veroorzaakt, aangezien eiwitbinding slechts één belangrijke gebeurtenis is, zij het dan wel de moleculaire gebeurtenis binnen de AOP die aanleiding geeft tot huidsensibilisatie. De gegevens die deze testmethode oplevert, dienen daarom te worden bekeken in het kader van een geïntegreerde aanpak, zoals een IATA, waarin zij worden gecombineerd met andere aanvullende informatie die bijvoorbeeld is afgeleid uit in-vitrotesten waarin andere belangrijke gebeurtenissen binnen de AOP van huidsensibilisatie worden bestudeerd of uit niet-testmethoden zoals een „read-across” van chemische analogen.

Deze testmethode kan in combinatie met andere aanvullende informatie worden gebruikt om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen (d.w.z. VN-GHS/CLP-categorie 1) en niet-sensibiliserende stoffen te staven in de context van IATA. Deze testmethode kan niet afzonderlijk worden gebruikt om huidsensibiliserende stoffen in te delen in de subcategorieën 1A en 1B zoals gedefinieerd door VN-GHS/CLP of om de potentie te voorspellen met het oog op besluiten inzake veiligheidsbeoordelingen. Naargelang van het regelgevingskader kan een positief resultaat van de DPRA echter wel als dusdanig worden gebruikt om een stof in te delen in VN-GHS/CLP-categorie 1.

Van de DPRA-testmethode is aangetoond dat zij overdraagbaar is naar laboratoria die ervaring hebben met HLPC-analyses (high-performance liquid chromatography of hogedrukvloeistofchromatografie). De verwachte reproduceerbaarheid van voorspellingen op basis van deze testmethode bedraagt 85 % binnen laboratoria en 80 % tussen verschillende laboratoria (10). De resultaten van de valideringsstudie (18) en de gepubliceerde studies (19) geven over het algemeen aan dat de nauwkeurigheid van de DPRA bij het onderscheiden van sensibiliserende stoffen (d.w.z. VN-GHS/CLP-cat. 1) van niet-sensibiliserende stoffen 80 % (N=157) bedraagt, met een gevoeligheid van 80 % (88/109) en een specificiteit van 77 % (37/48) in vergelijking met de resultaten van LLNA-tests. Bij de DPRA is de kans op een te lage voorspelling voor chemische stoffen met een lage tot gemiddelde potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1B) hoger dan voor chemische stoffen met een hoge potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1A) (18) (19). De waarden die hier worden vermeld voor de nauwkeurigheid van de DPRA als losstaande testmethode, vormen echter slechts een indicatie, aangezien de testmethode in combinatie met andere informatiebronnen moet worden bekeken in de context van een IATA en in overeenstemming met hetgeen hierboven bepaald is in punt 9. Bovendien moet bij de beoordeling van methoden zonder dierproeven voor huidsensibilisatie rekening worden gehouden met het feit dat de LLNA-test en andere dierproeven de situatie van de doelsoort, in dit geval mensen, mogelijk niet volledig weerspiegelen. Op basis van de globale beschikbare gegevens is gebleken dat de DPRA kan worden toegepast op teststoffen die verschillende organische functionele groepen, reactiemechanismen, potenties voor huidsensibilisatie (zoals bepaald bij in-vivo-onderzoek) en fysisch-chemische eigenschappen beslaan (8) (9) (10) (19). Gecombineerd geeft deze informatie aan dat de DPRA nuttig kan zijn om het gevaar van huidsensibilisatie te bepalen.

▼M7

De term „teststof” wordt in deze testmethode gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de DPRA op het testen van stoffen en/of mengsels. Deze testmethode kan niet worden toegepast om metaalverbindingen te testen, aangezien bekend is dat dergelijke verbindingen via andere mechanismen dan covalente binding reageren met eiwitten. Een teststof dient oplosbaar te zijn in een passend oplosmiddel bij een uiteindelijke concentratie van 100 mM (zie punt 18). Teststoffen die niet oplosbaar zijn bij die concentratie kunnen echter nog steeds worden getest bij een lagere oplosbare concentratie. In dat geval kan een positief resultaat nog steeds worden gebruikt om de identificatie van de teststof als huidsensibiliserende stof te ondersteunen, maar mag er aan een negatief resultaat geen definitieve conclusie inzake het gebrek aan reactiviteit worden gekoppeld. Er is momenteel slechts beperkte informatie beschikbaar over de toepasselijkheid van de DPRA op mengsels waarvan de samenstelling bekend is (18) (19). Vanuit technisch oogpunt wordt er evenwel van uitgegaan dat de DPRA kan worden toegepast op het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan, en van mengsels waarvan de samenstelling bekend is (zie punt 18). Voordat deze testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. Het huidige voorspellingsmodel kan niet worden gebruikt voor complexe mengsels waarvan de samenstelling niet bekend is, of voor stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, voor complexe reactieproducten of voor biologische materialen (d.w.z. UVCB-stoffen), vanwege de vastgestelde molaire verhouding van teststof en peptide. Daarvoor zal een nieuw voorspellingsmodel op basis van een gravimetrische aanpak moeten worden ontwikkeld. Wanneer kan worden aangetoond dat de testmethode niet kan worden toegepast op andere specifieke categorieën van chemische stoffen, mag de testmethode niet voor die specifieke categorieën van chemische stoffen worden gebruikt.

Deze testmethode is een in-chemicomethode die geen metabool systeem omvat. Chemische stoffen die enzymatische bioactivering nodig hebben om hun potentieel voor huidsensibilisatie uit te oefenen (zogeheten prohaptenen), kunnen met deze testmethode niet worden opgespoord. Chemische stoffen die in sensibiliserende stoffen veranderen na abiotische transformatie (zogeheten prehaptenen) zouden in sommige gevallen correct kunnen worden opgespoord met de testmethode (18). In het licht van het bovenstaande moeten negatieve resultaten verkregen met deze testmethode worden geïnterpreteerd in de context van de vermelde beperkingen en in samenhang met andere informatiebronnen in het kader van een IATA. Teststoffen die niet covalent binden aan het peptide maar de oxidatie ervan bevorderen (zogeheten cysteïnedimerisatie), kunnen mogelijk tot een te hoge inschatting van de peptidedepletie leiden, hetgeen tot valspositieve voorspellingen en/of een onterechte toewijzing aan een hogere reactiviteitsklasse zou kunnen leiden (zie punten 29 en 30).

Zoals beschreven, helpt de DPRA om huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen van elkaar te onderscheiden. Deze testmethode kan echter ook bijdragen aan de beoordeling van de sensibiliserende potentie (11) wanneer zij wordt gebruikt in het kader van een geïntegreerde aanpak zoals een IATA. Er moet evenwel nog meer onderzoek worden verricht, bij voorkeur op basis van gegevens verzameld bij mensen, om te bepalen hoe de resultaten van de DPRA kunnen worden benut bij de beoordeling van de potentie.

PRINCIPE VAN DE TEST

De DPRA is een *in-chemico*methode om de resterende concentratie cysteïne- of lysinebevattend peptide na 24 uur incubatie met de teststof bij 25±2,5 °C te kwantificeren. De synthetische peptiden bevatten fenylalanine om de opsporing te vergemakkelijken. De relatieve peptideconcentratie wordt gemeten met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) met gradiëntelutie en uv-detectie op 220 nm. De waarden voor het percentage cysteïne- en lysinepeptidedepletie worden berekend en gebruikt in een voorspellingsmodel (zie punt 29) waarmee de teststof kan worden ingedeeld in een van de vier reactiviteitsklassen die worden gebruikt om het onderscheid tussen sensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te ondersteunen.

▼M7

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van een onder deze testmethode vallende methode, dienen laboratoria eerst hun technische bekwaamheid aan te tonen met de tien stoffen die in aanhangsel 2 zijn opgesomd.

PROCEDURE

Deze testmethode is gebaseerd op DPRA DB-ALM-protocol nr. 154 (20), het protocol dat werd gebruikt voor de door het EURL ECVAM gecoördineerde valideringsstudie. Wanneer de methode in het laboratorium wordt ingevoerd en toegepast, wordt aanbevolen om dit protocol te volgen. Hieronder worden de belangrijkste onderdelen en procedures van de DPRA beschreven. Als er een alternatieve HPLC-opstelling wordt gebruikt, moet worden aangetoond dat die gelijkwaardig is aan de gevalideerde opstelling zoals beschreven in het DB-ALM-protocol (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 2 te testen).

Bereiding van de cysteïne of lysine bevattende peptiden

Vlak voor de incubatie met de teststof moeten stamoplossingen van cysteïne (Ac-RFAA**C**AA-COOH) en lysine (Ac-RFAA**K**AA-COOH) die synthetische peptiden met een zuiverheid van meer dan 85 % en bij voorkeur 90-95 % bevatten, vers worden bereid. De uiteindelijke concentratie van het cysteïnepeptide moet 0,667 mM in een fosfaatbuffer met pH 7,5 bedragen, terwijl de uiteindelijke concentratie van het lysinepeptide 0,667 mM in een ammoniumacetaatbuffer met pH 10,2 dient te zijn. De reeks experimenten van de HPLC dient zo te worden opgezet dat de HPLC-analyse minder dan 30 uur in beslag neemt. Voor de HPLC-opzet die in de valideringsstudie werd gebruikt en die in deze testmethode wordt beschreven, kunnen tot 26 analysemonsters (waaronder de teststof, de positieve controle en de nodige oplosmiddelcontroles naargelang van het aantal afzonderlijke oplosmiddelen dat bij de test wordt gebruikt, waarvan elk oplosmiddel in drievoud wordt getest) in een enkele HPLC-reeks worden meegenomen. Bij elk monster dat in dezelfde reeks wordt geanalyseerd, moeten dezelfde stamoplossingen van cysteïne- en lysinepeptide worden gebruikt. Er wordt aanbevolen om de goede oplosbaarheid van elke afzonderlijke partij peptide te controleren voor gebruik.

Bereiding van de teststof

De oplosbaarheid van de teststof in een passend oplosmiddel moet voorafgaand aan de test worden beoordeeld volgens de solubilisatieprocedure beschreven in het DB-ALM-protocol voor de DPRA (20). Wanneer een passend oplosmiddel wordt gebruikt, zal de teststof volledig oplossen. Aangezien de teststof bij de DPRA langdurig wordt geïncubeerd met het cysteïne- of het lysinepeptide, volstaat het om visueel te controleren of er een heldere oplossing wordt gevormd om na te gaan of de teststof (en alle componenten ervan, wanneer een stof met meerdere componenten of een mengsel wordt getest) volledig wordt opgelost. Voorbeelden van geschikte oplosmiddelen zijn acetonitril, water, een mengsel van water en acetonitril in een verhouding van 1:1, isopropanol, aceton of een mengsel van aceton en acetonitril in een verhouding van 1:1. Andere oplosmiddelen mogen worden gebruikt voor zover zij geen gevolgen hebben voor de stabiliteit van het peptide, die wordt bewaakt met behulp van referentiecontroles C (d.w.z. monsters die uitsluitend bestaan uit het peptide opgelost in een passend oplosmiddel; zie aanhangsel 3). Als een teststof niet oplosbaar is in een van deze oplosmiddelen, dient in laatste instantie te worden geprobeerd ze op te lossen in 300 µl DMSO en om de daaruit resulterende oplossing te verdunnen met 2 700 µl acetonitril. Als de teststof niet oplosbaar is dat mengsel, moet worden geprobeerd om dezelfde hoeveelheid teststof op te lossen in 1 500 µl DMSO en de resulterende oplossing te verdunnen met 1 500 µl acetonitril. De teststof dient vooraf te worden afgewogen in glazen flessen en onmiddellijk voor het testen te worden opgelost in een passend oplosmiddel om een oplossing van 100 mM te bereiden. Voor mengsels en stoffen met meerdere componenten waarvan de samenstelling bekend is, dient één enkele zuiverheid te worden bepaald door het aandeel van de verschillende componenten (behalve water) op te tellen en dient één enkel schijnbaar molecuulgewicht te worden bepaald door het afzonderlijke molecuulgewicht

▼M7

van elke component in het mengsel (behalve water) en het afzonderlijke aandeel daarvan in aanmerking te nemen. De aldus bepaalde zuiverheid en het schijnbare molecuulgewicht dienen vervolgens te worden gebruikt om te berekenen welk gewicht van de teststof moet worden gebruikt om 100 mM oplossing te bereiden. Voor polymeren waarvan geen bepalend molecuulgewicht kan worden vastgesteld, mag het molecuulgewicht van het monomeer (of het schijnbare molecuulgewicht van de verschillende monomeren waaruit het polymeer bestaat) worden gebruikt om 100 mM oplossing te bereiden. Bij het testen van mengsels, stoffen met meerdere componenten of polymeren waarvan de samenstelling bekend is, dient echter te worden overwogen om ook de pure chemische stof te testen. Voor vloeistoffen dient de pure chemische stof als dusdanig te worden getest, zonder voorafgaande verdunning, door ze te incuberen in een molaire verhouding van 1:10 en 1:50 met respectievelijk het cysteïne- en het lysinepeptide. Voor vaste stoffen moet de teststof worden opgelost tot de maximaal oplosbare concentratie in hetzelfde oplosmiddel dat wordt gebruikt om de schijnbare 100 mM-oplossing te bereiden. Die oplossing dient vervolgens als dusdanig te worden getest, zonder verdere verdunning, door ze te incuberen in een molaire verhouding van 1:10 en 1:50 met respectievelijk het cysteïne- en het lysinepeptide. Indien de resultaten voor de schijnbare 100 mM-oplossing en de pure chemische stof overeenkomen (reactief of niet-reactief), kan op basis daarvan een definitieve conclusie worden getrokken over het resultaat.

Bereiding van de positieve controle, de referentiecontroles en de co-elutiecontroles

Als positieve controle dient cinnamaldehyde (CAS 104-55-2; ≥95 % zuiver, van levensmiddelenkwaliteit) in een concentratie van 100 mM in acetonitril te worden gebruikt. Andere geschikte positieve controles, die bij voorkeur gematigde depletiewaarden opleveren, kunnen worden gebruikt als er historische gegevens beschikbaar om vergelijkbare aanvaardbaarheidscriteria voor de reeks experimenten af te leiden. Daarnaast moeten er referentiecontroles (d.w.z. monsters die enkel het peptide bevatten, opgelost in het juiste oplosmiddel) in de reeks experimenten van de HPLC worden opgenomen die worden gebruikt om de geschiktheid van het HPLC-systeem voor de analyse (referentiecontroles A) en de stabiliteit van de referentiecontroles in de loop van de tijd (referentiecontroles B) na te gaan en om te verzekeren dat het oplosmiddel dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen, geen invloed heeft op het percentage peptidedepletie (referentiecontroles C) (zie aanhangsel 3). Voor elke chemische stof moet de juiste referentiecontrole worden gebruikt om het percentage peptidedepletie te berekenen voor die stof (zie punt 26). Daarnaast moet voor elk van de onderzochte teststoffen ook een co-elutiecontrole in de reeks experimenten worden opgenomen, waarbij voor elke geanalyseerde teststof enkel de desbetreffende stof wordt gebruikt, om eventuele co-elutie van de teststof met het lysine- of cysteïnepeptide op te sporen.

Incubatie van de teststof met de cysteïne- en lysinepeptideoplossingen

De cysteïne- en lysinepeptideoplossingen moeten worden geïncubeerd in glazen autosampler-flessen met de teststof in een verhouding van respectievelijk 1:10 en 1:50. Als er meteen na toevoeging van de teststofoplossing aan de peptideoplossing een neerslag wordt waargenomen, vanwege de beperkte oplosbaarheid in water van de teststof, kan niet met zekerheid worden vastgesteld hoeveel teststof in de oplossing is overgebleven om met het peptide te reageren. In dat geval kan een positief resultaat bijgevolg nog steeds worden gebruikt, maar is een negatief resultaat onzeker en dient dat resultaat met de nodige behoedzaamheid te worden geïnterpreteerd (zie ook de bepalingen in punt 11 inzake het testen van chemische stoffen die niet oplosbaar zijn tot een concentratie van 100 mM). De reactieoplossing dient voordat de HPLC-analyse wordt uitgevoerd gedurende 24±2 uur in het donker te worden bewaard op 25±2,5 °C. Elke teststof dient in drievoud te worden geanalyseerd voor beide peptiden. De monsters moeten voorafgaand aan de HPLC-analyse visueel worden gecontroleerd. Als er een neerslag of fasescheiding wordt waargenomen, kunnen de monsters op lage snelheid worden gecentrifugeerd (100-400 g) om de neerslag naar de bodem van de fles te doen zinken, aangezien grote hoeveelheden neerslag de HPLC-slangen of -kolommen kunnen verstoppen. Als na de incubatieperiode een neerslag of fasescheiding wordt waargenomen, kan de peptidedepletie te laag worden ingeschat en kan er bij een negatief resultaat geen sluitende conclusie worden getrokken over het gebrek aan reactiviteit.

▼M7

Opstellen van de standaardkalibratiecurve voor de HLPC

Er moet voor zowel het cysteïne- als het lysinepeptide een standaardkalibratiecurve worden gegenereerd. Er dienen peptidestandaarden te worden bereid in een oplossing van 20 % of 25 % acetonitril:buffer met behulp van een fosfaatbuffer (pH 7,5) voor het cysteïnepeptide en een ammoniumacetaatbuffer (pH 10,2) voor het lysinepeptide. Aan de hand van standaarden voor de seriële verdunning van de peptidestamoplossing (0,667 mM) dienen 6 kalibratieoplossingen te worden bereid om het bereik van 0,534 tot 0,0167 mM te bestrijken. Voorts dient een blanco van de verdunningsbuffer in de standaardkalibratiecurve te worden opgenomen. Geschikte kalibratiecurven moeten een $r^2 > 0,99$ hebben.

Voorbereiding en HPLC-analyse

Voordat de analyse wordt verricht, moet de geschiktheid van het HPLC-systeem worden nagegaan. De peptidedepletie wordt bewaakt via HPLC in combinatie met een uv-detector (fotodiode-arraydetector of extinctiedetector met variabele golflengte met een signaal van 220 nm). Het HPLC-systeem wordt van de juiste kolom voorzien. In HPLC-opstelling die in het gevalideerde protocol is beschreven, gaat de voorkeur uit naar een Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 micron. Met deze reversed-phase-HPLC-kolom moet het hele systeem voor het experiment gedurende ten minste 2 uur op 30 °C met 50 % fase A (0,1 % (v/v) trifluorazijnzuur in water) en 50 % fase B (0,085 % (v/v) trifluorazijnzuur in acetonitril) worden geëquilibreerd. De HPLC-analyse moet worden uitgevoerd met een stroomdebiet van 0,35 ml/min en een lineaire gradiënt die het acetonnitrilpercentage in 10 minuten van 10 % naar 25 % brengt, gevolgd door een snelle verhoging van het percentage acetonitril tot 90 % om andere materialen te verwijderen. Er moeten gelijke volumes van elke standaard, elk monster en elke controle worden geïnjecteerd. De kolom dient tussen injecties gedurende 7 minuten opnieuw te worden geëquilibreerd onder de uitgangsomstandigheden. Als er een andere reversed-phase-HPLC-kolom wordt gebruikt, moeten bovenstaande opstellingsparameters mogelijk worden aangepast om een passende elutie en integratie van het cysteïne- en het lysinepeptide te garanderen. Mogelijk moet ook het injectievolume worden aangepast, dat kan variëren naargelang van het gebruikte systeem (gewoonlijk binnen het bereik van 3-10 µl). Belangrijk is ook dat als er een alternatieve HPLC-opstelling wordt gebruikt, moet worden aangetoond dat die gelijkwaardig is aan de hierboven beschreven gevalideerde opstelling (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing in aanhangsel 2 te testen). De extinctie wordt bewaakt op 220 nm. Als een fotodiode-arraydetector wordt gebruikt, dient ook de extinctie op 258 nm te worden geregistreerd. Er zij op gewezen dat bepaalde voorraden acetonitril de stabiliteit van het peptide kunnen aantasten. Dat moet worden beoordeeld wanneer een nieuwe partij acetonitril wordt gebruikt. De ratio van de piekoppervlakte bij 220 nm en bij 258 nm kan ook als indicator voor de co-elutie worden gebruikt. Voor elk monster vormt een ratio binnen het bereik van 90 % < gemiddelde ([1]) oppervlakteratio van de controlemonsters <100 % een goede indicatie dat er geen co-elutie is opgetreden.

Bepaalde teststoffen kunnen de oxidatie van het cysteïnepeptide bevorderen. De piek van het gedimeriseerde cysteïnepeptide kan visueel worden bewaakt. Als er dimerisatie lijkt te zijn opgetreden, dient dit te worden genoteerd, aangezien het percentage peptidedepletie te hoog kan worden ingeschat, wat aanleiding kan geven tot vals-positieve voorspellingen en/of toewijzing aan een hogere reactiviteitsklasse (zie punten 29 en 30).

De HPLC-analyse voor het cysteïne- en het lysinepeptide kan gelijktijdig gebeuren (als er twee HPLC-systemen voorhanden zijn) of op verschillende dagen. Als de analyse op verschillende dagen wordt verricht, dienen alle oplossingen met teststoffen elke dag vers te worden bereid voor beide tests. De tijd van de analyse dient te worden opgenomen om te verzekeren dat de injectie van het eerste monster wordt gestart 22 tot 26 uur nadat de teststof werd gemengd met de peptideoplossing. De reeks experimenten van de HPLC dient zo te worden

([1]) Met gemiddelde wordt in dit document het rekenkundige gemiddelde bedoeld.

▼M7

opgezet dat de HPLC-analyse minder dan 30 uur in beslag neemt. Voor de HLPC-opstelling die in de valideringsstudie werd gebruikt en in deze testmethode is beschreven, kunnen tot 26 analysemonsters worden meegenomen in een enkele HPLC-reeks (zie ook punt 17). Aanhangsel 3 bevat een voorbeeld van een reeks HPLC-analyses.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de gegevens

De concentratie van cysteïne- en lysinepeptide wordt in elk monster fotometrisch bepaald op 220 nm door de piekoppervlakte (de oppervlakte onder de curve of AUC) van de passende pieken te meten en de concentratie peptide te berekenen met behulp van de lineaire kalibratiecurve die uit de standaarden werd afgeleid.

Het percentage peptidedepletie wordt voor elk monster bepaald door de piekoppervlakte te meten en ze te delen door de gemiddelde piekoppervlakte van de relevante referentiecontroles C (zie aanhangsel 3) volgens onderstaande formule.

$$peptidedepletie = \left[1 - \left(\frac{piekoppervlakte\ peptide\ herhaalde\ injectie}{gem.\ piekoppervlakte\ relevante\ referentiecontroles\ C}\right)\right] \times 100$$

Aanvaardbaarheidscriteria

Wil een reeks experimenten geldig zijn, dan moet aan de volgende criteria worden voldaan:

a) de standaardkalibratiecurve dient een $r^2 > 0{,}99$ te hebben;

b) de gemiddelde waarde voor het percentage peptidedepletie van de drie duplo's voor de positieve controle, cinnamaldehyde, dient tussen 60,8 % en 100 % te liggen voor het cysteïnepeptide en tussen 40,2 % en 69,0 % voor het lysinepeptide en de maximale standaardafwijking (SD) voor de positieve controleduplo's dient < 14,9 % te zijn voor het percentage peptidedepletie en < 11,6 % voor het percentage lysinedepletie; en

c) de gemiddelde peptideconcentratie van referentiecontroles A dient 0,50±0,05 mM te bedragen en de variatiecoëfficiënt (CV) van de peptidepiekoppervlakten voor de negen referentiecontroles B en C in acetonitril dient < 15,0 % te zijn.

Als aan een of meerdere van deze criteria niet is voldaan, dient de reeks experimenten te worden overgedaan.

Willen de resultaten voor een teststof geldig zijn, dan moet aan de volgende criteria worden voldaan:

a) de maximale standaardafwijking voor de teststofduplo's dient < 14,9 % voor het percentage cysteïnedepletie en < 11,6 % voor het percentage lysinedepletie te bedragen;

b) de gemiddelde peptideconcentratie van de drie referentiecontroles C in het passende oplosmiddel dient 0,50±0,05 mM te bedragen. Als niet aan deze criteria is voldaan, moeten de gegevens worden verworpen en moet de reeks experimenten voor de desbetreffende teststof worden overgedaan.

Voorspellingsmodel

De gemiddelde waarde voor het percentage cysteïne- en lysinedepletie wordt berekend voor elke teststof. Een negatieve depletie wordt bij de berekening van het gemiddelde als „0” beschouwd. Bij gebruik van het voorspellingsmodel voor cysteïne 1:10/lysine 1:50 uit tabel 1 dient de drempel van een gemiddelde peptidedepletie van 6,38 % te worden gehanteerd om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen in het kader van een IATA te ondersteunen. De toepassing van het voorspellingsmodel voor het toewijzen van een teststof aan een reactiviteitsklasse (lage, matige en hoge reactiviteit) kan wellicht nuttig blijken als inbreng voor de potentiebeoordeling in het kader van een IATA.

▼M7

Tabel 1

Voorspellingsmodel cysteïne 1:10/lysine 1:50 ([1])

Gemiddeld % depletie voor cysteïne en lysine	Reactiviteitsklasse	DPRA-voorspelling ([2])
0 % ≤ gemiddeld % depletie ≤ 6,38 %	Geen of minimale reactiviteit	Negatief
6,38 % < gemiddeld % depletie ≤ 22,62 %	Lage reactiviteit	Positief
22,62 % < gemiddeld % depletie ≤ 42,47 %	Matige reactiviteit	
42,47 % < gemiddeld % depletie ≤ 100 %	Hoge reactiviteit	

([1]) De cijfers verwijzen naar statistisch gegenereerde drempelwaarden en houden geen verband met de nauwkeurigheid van de meting.
([2]) In het kader van een IATA en in overeenstemming met de bepalingen van punten 9 en 12 dient een DPRA-voorspelling te worden overwogen.

In sommige gevallen zou de teststof (de stof of een of meerdere van de componenten van een stof met meerdere componenten of een mengsel) op 220 nm aanzienlijk absorbeert en dezelfde retentietijd heeft als het peptide (co-elutie). Co-elutie kan worden verholpen door de HPLS-opstelling enigszins aan te passen om het verschil in retentietijd tussen de teststof en het peptide te vergroten. Als een alternatieve HPLC-opstelling wordt gebruikt om co-elutie te voorkomen, moet worden aangetoond dat die gelijkwaardig is aan gevalideerde opstelling (bv. door de bekwaamheidsstoffen in aanhangsel 2 te testen). Wanneer co-elutie optreedt, kan de piek van het peptide niet worden geïntegreerd en kan het percentage peptidedepletie niet worden berekend. Als co-elutie van dergelijke teststoffen optreedt bij zowel het cysteïne- als het lysinepeptide, dient de analyse te worden gemeld als „niet overtuigend”. In gevallen waarin co-elutie enkel optreedt bij het lysinepeptide, kan het voorspellingsmodel voor cysteïne 1:10 uit tabel 2 worden gebruikt.

Tabel 2

Voorspellingsmodel cysteïne 1:10 ([1])

% cysteïnedepletie (Cys)	Reactiviteitsklasse	DPRA-voorspelling ([2])
0 % £ % cysteïnedepletie £ 13,89 %	Geen of minimale reactiviteit	Negatief
13,89 % < % cysteïnedepletie £ 23,09 %	Lage reactiviteit	Positief
23,09 % < % cysteïnedepletie £ 98,24 %	Matige reactiviteit	
98,24 % < % cysteïnedepletie £ 100 %	Hoge reactiviteit	

([1]) De cijfers verwijzen naar statistisch gegenereerde drempelwaarden en houden geen verband met de nauwkeurigheid van de meting.
([2]) In het kader van een IATA en in overeenstemming met de bepalingen van punten 9 en 12 dient een DPRA-voorspelling te worden overwogen.

Het is mogelijk dat de retentietijd van de teststof en die van een van beide peptiden in sommige gevallen niet volledig overlapt. In dergelijke gevallen kunnen de waarden voor het percentage peptidedepletie worden geraamd en gebruikt binnen het voorspellingsmodel voor cysteïne 1:10/lysine 1:50, maar kan de teststof niet met de nodige nauwkeurigheid aan een reactiviteitsklasse worden toegewezen.

▼M7

Eén HPLC-analyse voor zowel het cysteïne- als het lysinepeptide zou voldoende moeten zijn voor een teststof, indien het resultaat ervan ondubbelzinnig is. Bij resultaten die dicht bij de drempelwaarde liggen die werd gebruikt om het onderscheid te maken tussen positieve en negatieve resultaten (d.w.z. in grensgevallen) kan het echter nodig zijn om bijkomende tests te verrichten. In gevallen waarin het gemiddelde percentage depletie tussen 3 % en 10 % bedraagt voor het voorspellingsmodel voor cysteïne 1:10/lysine 1:50 of het percentage cysteïnedepletie tussen 9 % en 17 % bedraagt voor het voorspellingsmodel voor cysteïne 1:10, moet worden overwogen om een tweede reeks experimenten uit te voeren, en eventueel ook een derde als de resultaten van de eerste twee reeksen niet overeenkomen.

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof

— Stof die uit één component bestaat

  — chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;

  — fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;

  — zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;

  — behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

  — geteste concentratie(s);

  — opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

— Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel:

  — karakterisering, voor zover mogelijk aan de hand van bv. chemische identiteit (zie hierboven), zuiverheid, kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie hierboven) van de bestanddelen, voor zover beschikbaar;

  — fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;

  — molecuulgewicht of schijnbaar molecuulgewicht in het geval van mengsels/polymeren waarvan de samenstelling bekend is, of andere informatie die relevant is voor het verloop van de studie;

  — behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

  — geteste concentratie(s);

  — opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Controles

— Positieve controle

  — chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;

  — fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;

  — zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;

▼M7

— behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

— geteste concentratie(s);

— opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;

— verwijzing naar historische positievecontroleresultaten waaruit de geschiktheid van de aanvaardbaarheidscriteria voor de reeks experimenten blijkt, indien van toepassing.

— Oplosmiddel/medium

— gebruikt oplosmiddel/medium en verhouding van de componenten ervan, indien van toepassing;

— chemische identificatie(s), zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s) en/of andere identificatiemiddelen;

— zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;

— fysisch voorkomen, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, in het geval er andere oplosmiddelen/media worden gebruikt dan diegene die zijn vermeld in de testmethode, en voor zover beschikbaar;

— opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;

— motivering van de keuze van het oplosmiddel voor elke teststof;

— voor acetonitril, de resultaten van de test van de impact op de stabiliteit van het peptide.

Bereiding van de peptiden, positieve controle en teststof

— karakterisering van de peptideoplossingen (leverancier, partij, exact gewicht van het peptide, volume dat werd toegevoegd voor de stamoplossing);

— karakterisering van de positievecontroleoplossing (exact gewicht van de positievecontrolestof, volume dat werd toegevoegd voor de testoplossing);

— karakterisering van de teststofoplossingen (exact gewicht van de teststof, volume dat werd toegevoegd voor de testoplossing).

HPLC-instrumentopstelling en -analyse

— type HPLC-instrument, HPLC- en voorkolom, detector, autosampler;

— relevante parameters voor de HPLC-analyse, zoals kolomtemperatuur, injectievolumes, stroomdebiet en gradiënt.

Geschiktheid van het systeem

— peptide-piekoppervlakte op 220 nm van elke standaard- en referentiecontrole A-duplo;

— een grafische weergave van de lineaire kalibratiecurve en de gemelde r^2;

— peptideconcentratie voor elke referentiecontrole A-duplo;

— gemiddelde peptideconcentratie (mM) van de drie referentiecontroles A, SD en CV;

— peptideconcentratie van referentiecontroles A en C.

▼M7

Analysereeks

— Voor de referentiecontroles:

  — peptide-piekoppervlakte op 220 nm van elke B- en C-duplo;

  — gemiddelde peptide-piekoppervlakte op 220 nm van de negen referentiecontroles B en C in acetonitril, SD en CV voor de stabiliteit van de referentiecontroles in de loop van de analyses);

  — voor elk gebruikt oplosmiddel de gemiddelde peptide-piekoppervlakte op 220 nm van de drie passende referentiecontroles C (voor de berekening van het percentage peptidedepletie);

  — voor elk gebruikt oplosmiddel, de peptideconcentratie (mM) van de drie passende referentiecontroles C;

  — voor elk gebruikt oplosmiddel, de gemiddelde peptideconcentratie (mM) van de drie passende referentiecontroles C, SD en CV;

— Voor de positieve controle:

  — peptide-piekoppervlakte op 220 nm van elke duplo;

  — percentage peptidedepletie van elke duplo;

  — gemiddelde percentage peptidedepletie van de drie duplo's, SD en CV;

— Voor elke teststof:

  — voorkomen van neerslag in het reactiemengsel aan het einde van de incubatietijd, indien er neerslag wordt waargenomen; of de neerslag opnieuw werd opgelost of gecentrifugeerd;

  — aanwezigheid van co-elutie;

  — beschrijving van eventuele andere relevante waarnemingen;

  — peptide-piekoppervlakte op 220 nm van elke duplo;

  — percentage peptidedepletie van elke duplo;

  — gemiddelde percentage peptidedepletie van de drie duplo's, SD en CV;

  — gemiddelde waarden voor het percentage cysteïne- en lysinedepletie;

  — gebruikt voorspellingsmodel en DPRA-voorspelling.

Bekwaamheidstoetsing

— indien van toepassing, de procedure die werd gebruikt om aan te tonen dat het laboratorium bekwaam is om de testmethode toe te passen (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen) of om aan te tonen dat de prestaties van de testmethode in de loop van de tijd kunnen worden gereproduceerd.

Bespreking van de resultaten

— bespreking van de resultaten verkregen met de DPRA-testmethode;

— bespreking van de resultaten van de testmethode in de context van een IATA, als er andere relevante informatie beschikbaar is.

Conclusie

▼M7

LITERATUUR

(1) Verenigde Naties (VN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, VN New York en Genève, 2013. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OESO (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment nr. 168, OESO, Parijs.

(3) Hoofdstuk B.6 van deze bijlage: Sensibilisatie van de huid.

(4) Hoofdstuk B.42 van deze bijlage: Lokale lymfkliertest

(5) Hoofdstuk B.50 van deze bijlage: Huidsensibilisatie: lokale lymfkliertest: DA.

(6) Hoofdstuk B.51 van deze bijlage: Huidsensibilisatie: lokale lymfkliertest: BrdU-ELISA

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Beschikbaar op: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, online gepubliceerd, 14 mei 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74 blz. Beschikbaar op: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, online gepubliceerd, 9 april 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17 blz. Beschikbaar op: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OESO (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. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs, Frankrijk.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22 blz. Accessible at: 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 nr. 87).

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

AOP (Adverse Outcome Pathway): een reeks gebeurtenissen van de chemische structuur van een doelstof of een groep soortgelijke chemische stoffen over de moleculaire inleidende gebeurtenis tot een te onderzoeken in-vivoresultaat (2).

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid (21).

Chemische stof: een stof of mengsel.

Geldige testmethode: een testmethode die voldoende relevant en betrouwbaar wordt geacht voor een specifiek doel en gebaseerd is op wetenschappelijk verantwoorde beginselen. Een testmethode is nooit algemeen geldig, maar enkel met betrekking tot een specifiek doel (21).

Geschiktheid van het systeem: bepaling van de prestaties van de instrumenten (bv. gevoeligheid) door een referentienorm te analyseren voordat de reeks analyses wordt uitgevoerd (22).

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Gevoeligheid: Het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. De gevoeligheid is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (21).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering): een gestructureerde aanpak die wordt gebruikt voor de identificatie van gevaren (potentieel), het kenmerken van gevaren (potentie) en/of het beoordelen van de veiligheid (potentieel/potentie en blootstelling) van een chemische stof of een groep chemische stoffen, waarbinnen alle relevante gegevens strategisch worden geïntegreerd en worden afgewogen als inbreng voor regelgevingsbesluiten inzake potentiële gevaren en/of risico's en/of de noodzaak van verdere gerichte en bijgevolg minimale tests.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie”. Deze term en de term „concordantie”, waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (21).

Kalibratiecurve: het verband tussen de responswaarde in het experiment en de analytische concentratie (ook wel *standaardcurve* genoemd) van een bekende stof.

Mengsel: een mengsel of een oplossing bestaande uit twee of meer stoffen waarin deze stoffen geen reactie met elkaar aangaan (1).

Moleculaire inleidende gebeurtenis: een door chemische stoffen geïnduceerde verstoring van een biologisch systeem op het moleculaire niveau, waarvan is

▼M7

vastgesteld dat zij het beginpunt is van de *adverse outcome pathway*.

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positieve-controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Referentiecontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of medium, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of medium opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten negatieve controle, toont het ook aan of het oplosmiddel of medium met het testsysteem interageert.

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (21).

Reproduceerbaarheid: de overeenkomst tussen resultaten verkregen uit tests op dezelfde chemische stof met behulp van hetzelfde testprotocol (zie betrouwbaarheid) (21).

Specificiteit: Het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. De specificiteit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert, en is een belangrijke factor bij de beoordeling van de relevantie van een testmethode (21).

Stof: chemische elementen en verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het product en alle onzuiverheden ten gevolge van het productieprocédé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd (1).

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ≥ 10 % (w/w) en < 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een chemische reactie.

Teststof: met de term „teststof” wordt verwezen naar datgene dat wordt getest.

UVCB: stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

Variatiecoëfficiënt: een maat voor de variabiliteit die wordt berekend voor een groep duplogegevens door de standaardafwijking te delen door het gemiddelde. Dit quotiënt kan ook worden vermenigvuldigd met 100 om het uit te drukken als een percentage.

▼M7

Aanhangsel 2

STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING

In-chemicohuidsensibilisatie: Direct Peptide Reactivity Assay

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van deze testmethode, dienen laboratoria hun technische bekwaamheid aan te tonen door de correcte DPRA-voorspelling te verkrijgen voor de 10 stoffen die in tabel 1 worden aangeraden en door cysteïne- en lysinedepletiewaarden te bekomen die binnen de respectieve referentiebereiken vallen voor 8 van de 10 stoffen voor elk peptide. Deze stoffen voor bekwaamheidstoetsing werden geselecteerd om alle mogelijke responsen voor huidsensibilisatiegevaar te weerspiegelen. Andere selectiecriteria waren dat stoffen commercieel beschikbaar zijn, dat er in-vivoreferentiegegevens en met de DPRA gegenereerde in-vitrogegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn en dat zij in de door het EURL ECVAM gecoördineerde valideringsstudie werden gebruikt om de geslaagde toepassing van de testmethode in de laboratoria die aan de studie deelnamen, aan te tonen.

Tabel 1

Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met de Direct Peptide Reactivity Assay

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing	CAS RN	Fysische toestand	In-vivovoorspelling (1)	DPRA-voorspelling (2)	Bereik (3) van het % cysteïne-peptidedepletie	Bereik (3) van het % lysine-peptidedepletie
2,4-Dinitrochloorbenzeen	97-00-7	Vaste stof	Sensibiliserend (extreem)	Positief	90-100	15-45
Oxazolon	15646-46-5	Vaste stof	Sensibiliserend (extreem)	Positief	60-80	10-55
Formaldehyde	50-00-0	Vloeistof	Sensibiliserend (krachtig)	Positief	30-60	0-24
Benzylideenaceton	122-57-6	Vaste stof	Sensibiliserend (matig)	Positief	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Vloeistof	Sensibiliserend (zwak)	Positief	15-55	0-25
2,3-Butaandion	431-03-8	Vloeistof	Sensibiliserend (zwak)	Positief	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Vloeistof	Niet-sensibiliserend	Negatief	0-7	0-5,5
6-Methylcumarine	92-48-8	Vaste stof	Niet-sensibiliserend	Negatief	0-7	0-5,5
Melkzuur	50-21-5	Vloeistof	Niet-sensibiliserend	Negatief	0-7	0-5,5
4-Methoxyacetofenon	100-06-1	Vaste stof	Niet-sensibiliserend	Negatief	0-7	0-5,5

(1) De in-vivogevaren- en (potentie)voorspellingen zijn gebaseerd op LLNA-gegevens (19). De in-vivopotentie wordt afgeleid met behulp van de criteria die zijn voorgesteld door ECETOC (23).

(2) In het kader van een IATA en in overeenstemming met de bepalingen van punten 9 en 11 dient een DPRA-voorspelling te worden overwogen.

(3) Bereiken bepaald op basis van ten minste 10 depletiewaarden gegenereerd door 6 onafhankelijke laboratoria.

▼M7

Aanhangsel 3

VOORBEELDEN VAN ANALYSEREEKSEN

Kalibratiestandaarden en referentiecontroles	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Verdunningsbuffer Referentiecontrole A, rep 1 Referentiecontrole A, rep 2 Referentiecontrole A, rep 3
Co-elutiecontroles	Co-elutiecontrole 1 voor teststof 1 Co-elutiecontrole 2 voor teststof 2
Referentiecontroles	Referentiecontrole B, rep 1 Referentiecontrole B, rep 2 Referentiecontrole B, rep 3
Eerste set replicaties	Referentiecontrole C, rep 1 Cinnamaldehyde, rep 1 Monster 1, rep 1 Monster 2, rep 1
Tweede set replicaties	Referentiecontrole C, rep 2 Cinnamaldehyde, rep 2 Monster 1, rep 2 Monster 2, rep 2
Derde set replicaties	Referentiecontrole C, rep 3 Cinnamaldehyde, rep 3 Monster 1, rep 3 Monster 2, rep 3
Referentiecontroles	Referentiecontrole B, rep 4 Referentiecontrole B, rep 5 Referentiecontrole B, rep 6

Er dienen drie reeksen referentiecontroles (d.w.z. monsters die uitsluitend bestaan uit het peptide, opgelost in het juiste oplosmiddel) in de analysereeks te worden opgenomen:
referentiecontrole A: wordt gebruikt om de geschiktheid van het HPLC-systeem te verifiëren;
referentiecontrole B: wordt opgenomen aan het begin en aan het einde van de analysereeks om de stabiliteit van de referentiecontroles in de loop van de analyse te verifiëren;
referentiecontrole C: wordt opgenomen in de analysereeks om te verifiëren dat het oplosmiddel dat wordt gebruikt om de teststof op te lossen, geen invloed heeft op het percentage peptidedepletie.

▼M7

B.60. IN-VITROHUIDSENSIBILISATIE: ARE-NRF2-LUCIFERASETEST-METHODE

INLEIDING

Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 442D (2015) van de OESO. Een huidsensibiliserende stof is een stof die een allergische reactie uitlokt na contact met de huid, zoals gedefinieerd in het wereldwijd geharmoniseerd systeem voor de indeling en etikettering van chemische stoffen van de Verenigde Naties (GHS) (1) en Verordening (EG) nr. 1272/2008 van de Europese Unie betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsel (CLP-verordening) ([1]). Deze testmethode reikt een in-vitroprocedure (de ARE-Nrf2-luciferasetest) aan die kan worden gebruikt om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven, in overeenstemming met het VN-GHS (1) en de CLP-verordening.

Er bestaat algemene overeenstemming over de belangrijkste biologische gebeurtenissen die aan de basis liggen van huidsensibilisatie. De bestaande kennis van de chemische en biologische mechanismen die verband houden met huidsensibilisatie zijn samengevat in een Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), van de moleculaire gebeurtenis die er aanleiding toe geeft over de tussenliggende gebeurtenissen tot het schadelijke effect voor de gezondheid, te weten allergische contactdermatitis bij mensen of contactovergevoeligheid bij knaagdieren (2) (3). De moleculaire inleidende gebeurtenis is de covalente binding van elektrofiele stoffen aan nucleofiele centra in de eiwitten van de huid. De tweede belangrijke gebeurtenis in deze AOP vindt plaats in de keratinocyten en omvat zowel ontstekingsreacties als genexpressie die samenhangt met specifieke signaalpaden in de cellen, zoals de paden die afhankelijk zijn van het antioxidant-/elektrofiel responselement (ARE). De derde belangrijke gebeurtenis is de activering van dendritische cellen. Deze gebeurtenis wordt gewoonlijk beoordeeld aan de hand van de expressie van specifieke markers op het celoppervlak. De vierde belangrijke gebeurtenis is de proliferatie van T-cellen, die indirect wordt beoordeeld in de lokale lymfkliermurinetest (4).

De bepaling van de huidsensibilisatie ging meestal gepaard met het gebruik van proefdieren. Bij de klassieke methoden op basis van cavia's, de maximalisatietest met cavia's (GMPT) van Magnusson-Kligman en de Buehler-test (TM B.6 (5)) worden zowel de inductie- als de uitlokkingsfase van huidsensibilisatie bestudeerd. Ook een murinetest, de lokale lymfkliertest (LLNA) (TM B.42 (4)), en de twee niet-radioactieve aanpassingen ervan, LLNA: DA (TM B.50 (6)) en LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), waarbij telkens uitsluitend de inductierespons wordt beoordeeld, zijn gangbaar geworden aangezien zij beter zijn voor het dierenwelzijn dan tests met cavia's en het mogelijk maken om de inductiefase van huidsensibilisatie objectief te meten.

Recenter zijn ook mechanistisch gebaseerde in-chemico- en in-vitrotestmethoden wetenschappelijk geldig bevonden voor de beoordeling van het gevaar van huidsensibilisatie van chemische stoffen. Om de dierproeven die momenteel worden gebruikt, volledig te kunnen vervangen, zullen echter combinaties van methoden zonder dierproeven (in silico, in chemico, in vitro) binnen geïntegreerde test- en beoordelingsbenaderingen (Integrated Approaches to Testing and Assessment of IATA) nodig zijn, aangezien elk van de momenteel beschikbare testmethoden zonder dierproeven vanuit mechanistisch oogpunt slechts een beperkt deel van de AOP afdekt (2) (3).

Deze testmethode (ARE-Nrf2-luciferasetest) wordt voorgesteld om de tweede belangrijke gebeurtenis zoals toegelicht in punt 2 te onderzoeken. Er zijn meldingen van huidsensibiliserende stoffen die genen induceren die worden gereguleerd door het antioxidantresponselement (ARE) (8) (9). Kleine elektrofiele

([1]) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

▼M7

stoffen zoals huidsensibiliserende stoffen kunnen inwerken op het sensoreiwit Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), bijvoorbeeld via covalente aanpassingen van het cysteïneresidu van dat eiwit, waardoor het eiwit wordt gescheiden van de transcriptiefactor Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). De afgescheiden Nrf2 kan vervolgens ARE-afhankelijke genen activeren, zoals diegenen die coderen voor fase II-ontgiftingsenzymen (8) (10) (11).

Voorlopig is de KeratinoSens™-test de enige in-vitro-ARE-Nrf2-luciferasetest in deze testmethode waarvoor valideringsstudies zijn verricht (9) (12) (13), gevolgd door een onafhankelijke beoordeling door vakgenoten uitgevoerd door het referentielaboratorium voor alternatieven voor dierproeven van de Europese Unie (EURL ECVAM) (14). De KeratinoSens™-test werd wetenschappelijk geldig bevonden voor gebruik in het kader van een IATA om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen te staven met het oog op de gevarenindeling en etikettering (14). Laboratoria die de testmethode willen invoeren kunnen de bij de KeratinoSens™-test gebruikte recombinante cellijn verkrijgen door een licentieovereenkomst te sluiten met de ontwikkelaar van de testmethode (15).

Definities worden gegeven in aanhangsel 1.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN, TOEPASSELIJKHEID EN BEPERKINGEN

Aangezien activering van het Keap1-Nrf2-ARE-pad enkel betrekking heeft op de tweede belangrijke gebeurtenis van de AOP voor huidsensibilisatie, volstaat informatie verkregen uit testmethoden die gebaseerd zijn op de activering van dat pas waarschijnlijk niet wanneer zij als dusdanig wordt gebruikt om conclusies te formuleren over het huidsensibilisatiepotentieel van chemische stoffen. De gegevens die deze testmethode oplevert, dienen daarom te worden bekeken in het kader van een geïntegreerde aanpak, zoals een IATA, waarbij zij worden gecombineerd met andere aanvullende informatie die bijvoorbeeld is afgeleid uit invitrotesten waarin andere belangrijke gebeurtenissen binnen de AOP van huidsensibilisatie worden bestudeerd of uit niet-testmethoden zoals een „read-across” van chemische analogen. Er zijn voorbeelden van het gebruik van ARE-Nrf2-luciferasetestmethode in combinatie met andere informatie beschreven in de literatuur (13) (16) (17) (18) (19).

Deze testmethode kan worden gebruikt om het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen (d.w.z. VN-GHS/CLP-categorie 1) en niet-sensibiliserende stoffen te staven in de context van IATA. Deze testmethode kan niet afzonderlijk worden gebruikt om huidsensibiliserende stoffen in te delen in de subcategorieën 1A en 1B zoals gedefinieerd door VN-GHS/CLP of om de potentie te voorspellen met het oog op besluiten inzake veiligheidsbeoordelingen. Naargelang van het regelgevingskader kan een positief resultaat echter wel afzonderlijk worden gebruikt om een stof in te delen in VN-GHS/CLP-categorie 1.

Op basis van de gegevensreeks uit de valideringsstudie en interne tests die werden gebruikt voor de onafhankelijke beoordeling door vakgenoten van de testmethode bleek de KeratinoSens™-test overdraagbaar te zijn naar laboratoria met ervaring in het kweken van cellen. De verwachte reproduceerbaarheid van voorspellingen op basis van deze testmethode binnen laboratoria en tussen verschillende bedraagt 85 % (14). De nauwkeurigheid (77 % — 155/201), gevoeligheid (78 % — 71/91) en specificiteit (76 % — 84/110) van de KeratinoSens™-test bij het onderscheiden van huidsensibiliserende stoffen (d.w.z. VN GHS/CLP-cat. 1) van niet-sensibiliserende stoffen in vergelijking met de resultaten van de LLNA-tests werden berekend aan de hand van alle gegevens die bij het EURL ECVAM werden ingediend voor de evaluatie en de beoordeling door vakgenoten van de testmethode (14). Die cijfers zijn vergelijkbaar met de cijfers die onlangs werden gepubliceerd op basis van interne tests op ongeveer 145 stoffen (77 % nauwkeurigheid, 79 % gevoeligheid, 72 % specificiteit) (13). Bij de KeratinoSens™-test is de kans op een te lage voorspelling voor chemische stoffen met

▼M7

een lage tot gemiddelde potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1B) hoger dan voor chemische stoffen met een hoge potentie voor huidsensibilisatie (d.w.z. VN-GHS/CLP-subcategorie 1A) (13) (14). Gecombineerd geeft deze informatie een indicatie van het nut van de KeratinoSens™-test om bij te dragen aan de bepaling van het gevaar van huidsensibilisatie. De waarden die hier worden vermeld voor de nauwkeurigheid van de KeratinoSens™-test als losstaande testmethode, vormen echter slechts een indicatie, aangezien de testmethode dient te worden beschouwd in combinatie met andere informatiebronnen in de context van een IATA en in overeenstemming met hetgeen hierboven bepaald is in punt 9. Bovendien moet bij de beoordeling van methoden zonder dierproeven voor huidsensibilisatie rekening worden gehouden met het feit dat de LLNA en andere dierproeven de situatie van de doelsoort, in dit geval mensen, mogelijk niet volledig weerspiegelen.

De term „teststof” wordt in deze teststof gebruikt om te verwijzen naar datgene dat wordt getest en houdt geen verband met de toepasselijkheid van de ARE-Nrf2-luciferasetestmethode op het testen van stoffen en/of mengsels. Op basis van de thans beschikbare gegevens is gebleken dat de KeratinoSens™-test van toepassing is op teststoffen die verschillende organische functionele groepen, reactiemechanismen, potenties voor huidsensibilisatie (zoals bepaald bij in-vivo-onderzoek) en fysisch-chemische eigenschappen beslaan (9) (12) (13) (14). Er werden voornamelijk stoffen die bestaan uit één component getest, hoewel er ook een beperkte hoeveelheid gegevens beschikbaar is over het testen van mengsels (20). De testmethode is vanuit technisch oogpunt evenwel toepasbaar voor het testen van stoffen die uit meerdere componenten bestaan en van mengsels. Voordat deze testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet echter worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is. Bovendien moet bij tests op stoffen die uit meerdere componenten bestaan of op mengsels rekening worden gehouden met mogelijke interferentie van cytotoxische componenten met de waargenomen responsen. De testmethode is van toepassing op teststoffen die oplosbaar zijn of een stabiele dispersie vormen (d.w.z. een colloïde of suspensie waarin de teststof niet bezinkt of zich van het oplosmiddel afscheidt in verschillende fasen) in water of DMSO (inclusief alle componenten van de teststof wanneer een stof met meerdere componenten of een mengsel wordt getest). Teststoffen die niet aan deze voorwaarden voldoen in de hoogste uiteindelijke vereiste concentratie van 2000 μM (zie punt 22), mogen nog steeds worden getest bij lagere concentraties. In dat geval kunnen resultaten die aan de criteria voor positiviteit voldoen zoals beschreven in punt 39, nog steeds worden gebruikt om de teststof aan te merken als huidsensibiliserende stof, terwijl een negatief resultaat verkregen bij concentraties van < 1000 μM als niet-overtuigend dient te worden beschouwd (zie voorspellingsmodel in punt 39). Over het algemeen zijn stoffen met een LogP van maximaal 5 met succes getest, terwijl bijzonder hydrofobe stoffen met een LogP van meer dan 7 buiten het bekende toepassingsbereik van de testmethode vallen (14). Voor stoffen met een LogP tussen 5 en 7 is slechts beperkte informatie beschikbaar.

Negatieve resultaten dienen met de nodige voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd, aangezien stoffen die enkel reageren met lysineresiduen, als negatief kunnen worden gedetecteerd door deze testmethode. Bovendien kunnen ook prohaptenen (d.w.z. chemische stoffen die enzymactivering nodig hebben, bijvoorbeeld via P450-enzymen) en prehaptenen (d.w.z. chemische stoffen die worden geactiveerd door auto-oxidatie), in het bijzonder met een trage oxidatiesnelheid, negatieve resultaten geven vanwege de beperkte metabole capaciteit van de gebruikte cellijn (21) en vanwege de omstandigheden bij het experiment. Teststoffen die niet huidsensibiliserend werken maar toch chemische stressoren zijn, kunnen anderzijds tot vals-positieve uitslagen leiden (14). Bovendien kunnen bijzonder cytotoxische teststoffen niet altijd betrouwbaar worden beoordeeld. Tot slot kunnen teststoffen die interfereren met het luciferase-enzym de luciferaseactiviteit in tests op celbasis verstoren, doordat zij een schijnbare remming of verhoging van de luminescentie veroorzaken (22). Zo werd bij andere reportergentests op basis van luciferase gemeld dat fyto-oestrogeenconcentraties boven

▼M7

1 μM interfereerden met de luminescentiesignalen vanwege overactiviteit van het luciferasereportergen (23). De luciferase-expressie bij hoge concentraties fyto-oestrogenen of soortgelijke chemische stoffen waarvan vermoed wordt dat zij fyto-oestrogeenachtige overactivatie van het luciferasereportergen kunnen veroorzaken, dient daarom zorgvuldig te worden bestudeerd (23). In gevallen waarin kan worden aangetoond dat de testmethode niet toepasselijk is op andere specifieke categorieën van teststoffen, dient de testmethode niet te worden gebruikt voor die specifieke categorieën.

De KeratinoSens™-test staaft niet alleen het onderscheid tussen huidsensibiliserende stoffen en niet-sensibiliserende stoffen, maar levert ook informatie over de concentratierespons op die kan bijdragen aan de beoordeling van de sensibiliserende potentie wanneer deze test wordt gebruikt binnen een geïntegreerde aanpak, zoals een IATA (19). Er moet echter nog meer werk worden verricht, bij voorkeur op basis van betrouwbare gegevens verzameld bij mensen, om te bepalen hoe de resultaten van de KeratinoSens™-test kunnen bijdragen aan de beoordeling van de potentie (24) en de indeling van sensibiliserende stoffen in subcategorieën volgens VN-GHS/CLP.

PRINCIPE VAN DE TEST

Bij de ARE-Nrf2luciferasetestmethode wordt gebruikgemaakt van een geïmmortaliseerde adherente cellijn afgeleid van menselijke HaCaT-keratinocyten die stabiel zijn getransfecteerd met een te selecteren plasmide. De cellijn bevat het luciferasegen onder transcriptionele controle door een constitutieve promotor met een ARE-element uit een gen waarvan bekend is dat het wordt gestimuleerd door contactallergenen (25) (26). Het luciferasesignaal weerspiegelt de activering van endogene Nrf2-afhankelijke genen door sensibiliserende stoffen, en er is reeds aangetoond dat het luciferasesignaal in de recombinante cellijn afhankelijk is van Nrf2 (27). Daardoor wordt een kwantitatieve meting (via luminescentiedetectie) van de inductie van het luciferasegen met behulp van gangbare lichtproducerende luciferasesubstraten mogelijk, als indicator van de activiteit van de Nrf2-transcriptiefactor in cellen die zijn blootgesteld aan elektrofiele stoffen.

De teststoffen worden positief bevonden bij de KeratinoSens™-test als zij een statistisch significante inductie van de luciferaseactiviteit induceren boven een bepaalde drempel (d.w.z. > 1,5-voudige of 50 %-toename), onder een bepaalde concentratie die geen significante invloed heeft op de levensvatbaarheid van de cellen (d.w.z. lager dan 1000 μM en bij een concentratie waarbij de levensvatbaarheid van de cellen meer dan 70 % bedraagt (9) (12)). Daartoe wordt de maximale x-voudige inductie van de luciferaseactiviteit ten opzichte van de (negatieve) oplosmiddelcontrole (I_{max}) bepaald. Aangezien de cellen aan reeksen concentraties van de teststof worden blootgesteld, moet voorts de concentratie die nodig is voor een statistisch significante inductie van de luciferaseactiviteit, boven de drempel (d.w.z. de waarde voor $EC_{1,5}$) worden geïnterpoleerd op grond van de dosis-responscurve (zie punt 32 voor de berekening). Tot slot dienen parallelle metingen van de cytotoxiciteit te worden verricht om te beoordelen of er bij subcytotoxische concentraties niveaus worden bereikt die luciferaseactiviteit induceren.

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van de ARE-Nrf2-luciferasetest die samenhangt met deze testmethode, zouden laboratoria hun technische bekwaamheid moeten aantonen aan de hand van de tien stoffen voor bekwaamheidstoetsing die in aanhangsel 2 zijn opgesomd.

Er zijn prestatienormen (PS) (28) beschikbaar om de validering van nieuwe of gewijzigde in-vitro-ARE-Nrf2-luciferasetestmethoden die vergelijkbaar zijn met de KeratinoSens™-test te vergemakkelijken en tijdige wijziging van deze testmethode met het oog op de opname van dergelijke testmethoden mogelijk te maken. De wederzijdse aanvaarding van gegevens in overeenstemming met de OESO-overeenkomst is enkel gewaarborgd voor testmethoden die zijn gevalideerd volgens de prestatienormen, voor zover die testmethoden door de OESO zijn geëvalueerd en zijn opgenomen in de overeenkomstige testrichtsnoeren.

▼M7

PROCEDURE

Momenteel is de wetenschappelijk geldige KeratinoSens™-test de enige methode die onder deze testmethode valt (9) (12) (13) (14). De standaardwerkwijzen voor de KeratinoSens™-test zijn beschikbaar en dienen te worden gebruikt wanneer de testmethode in een laboratorium wordt toegepast en gebruikt (15). Laboratoria die de testmethode willen invoeren, kunnen de bij de KeratinoSens™-test gebruikte recombinante cellijn verkrijgen door een licentieovereenkomst te sluiten met de ontwikkelaar van de testmethode. Hieronder worden de belangrijkste onderdelen en procedures van de ARE-Nrf2-luciferasetestmethode beschreven.

Bereiding van de keratinocytenculturen

Er dient een transgene cellijn te worden gebruikt waarin het luciferasereportergen stabiel is ingebracht onder controle van het ARE-element (bv. de KeratinoSens™-cellijn). Bij ontvangst worden de cellen vermeerderd (bv. 2 tot 4 passages) en in bevroren toestand bewaard als homogene stam. Cellen uit deze oorspronkelijke stam kunnen worden vermeerderd tot een maximumaantal passages (25 in het geval van KeratinoSens™) en worden gebruikt voor routinetests waarbij een passend medium wordt gebruikt om de cellen in leven te houden (in het geval van KeratinoSens™ gaat het om DMEM met serum en geneticine).

Voor het testen dienen de cellen 80-90 % confluent te zijn en dient ervoor te worden gezorgd dat de cellen nooit doorgroeien naar volledige confluentie. Een dag voor het testen worden de cellen geoogst en verdeeld over 96-wells-platen (10 000 cellen/well in het geval van KeratinoSens™). Er moet de nodige aandacht worden geschonken aan het voorkomen van sedimentatie van de cellen tijdens het enten om een homogene verdeling van het aantal cellen over de wells te verzekeren. Als dat niet gebeurt, kan deze stap aanleiding geven tot grote verschillen van well tot well. Voor elke herhaling worden drie duplo's gebruikt voor het meten van de luciferaseactiviteit en een parallelle duplo voor het testen van de levensvatbaarheid van de cellen.

Bereiding van de teststof en de controlestoffen

De teststof en controlestoffen worden bereid op de dag van de tests. Voor de KeratinoSens™-test worden de teststoffen opgelost in dimethylsulfoxide (DMSO) tot de gewenste uiteindelijke concentratie is bereikt (bv. 200 mM). De DMSO-oplossingen zijn zelfsteriliserend en behoeven dus geen steriele filtratie. Teststoffen die niet oplosbaar zijn in DMSO worden opgelost in steriel water of in een kweekmedium, waarna de oplossingen worden gesteriliseerd, bv. door filtratie. Voor een teststof waarvan het molecuulgewicht niet is vastgesteld, wordt bij de KeratinoSens™-test een stamoplossing bereid in een standaardconcentratie (40 mg/ml or 4 % (w/v)). Wanneer andere oplosmiddelen dan DMSO, water of het kweekmedium worden gebruikt, moet dat voldoende wetenschappelijk gemotiveerd worden.

Op basis van de stam-DMSO-oplossingen van de teststof worden seriële verdunningen gemaakt met behulp van DMSO om 12 basisconcentraties van de te testen stof te verkrijgen (van 0,098 tot 200 mM bij de KeratinoSens™-test). Voor teststoffen die niet oplosbaar zijn in DMSO, worden de verdunningen om de basisconcentraties te verkrijgen gemaakt met behulp van steriel water of steriel kweekmedium. De basisconcentraties worden vervolgens ongeacht het gebruikte oplosmiddel 25 keer verder verdund in het serum bevattende kweekmedium en worden tot slot gebruikt voor behandeling met een bijkomende verdunningsfactor 4, zodat de uiteindelijke concentraties van de geteste chemische stof 0,98 tot 2000 μM bedragen bij de KeratinoSens™-test. Alternatieve concentraties kunnen worden gebruikt als zij worden gemotiveerd (bv. in het geval van cytotoxiciteit of slechte oplosbaarheid).

De negatieve (oplosmiddel)controle die wordt gebruikt bij de KeratinoSens™-test, is DMSO (CAS-nr. 67-68-5, ≥ 99 % zuiverheid), waarvoor zes wells per plaat worden geprepareerd. Deze controle ondergaat dezelfde verdunning als beschreven voor de basisconcentraties in punt 22, zodat de uiteindelijke concentratie van de negatieve (oplosmiddel)controle 1 % bedraagt, geen gevolgen heeft

▼M7

voor de levensvatbaarheid van de cellen en overeenkomt met dezelfde concentratie DMSO als die in de geteste chemische stof en in de positieve controle. Voor teststoffen die niet oplosbaar zijn in DMSO, waarvoor de verdunningen met water zijn gebeurd, moet het DMSO-niveau in alle wells van de uiteindelijke testoplossing worden gecorrigeerd naar 1 %, net zoals voor de overige teststoffen en controlestoffen.

De positieve controle die wordt gebruikt bij de KeratinoSens™ -test is cinnamaldehyde (CAS-nr. 14371-10-9, ≥ 98 % zuiverheid), waarvoor een reeks van 5 basisconcentraties van 0,4 tot 6,4 mM wordt bereid in DMSO (op basis van 6,4 mM stamoplossing) en verdund zoals beschreven voor de basisconcentraties in punt 22, zodat de uiteindelijke concentraties van de positieve controle 4 tot 64 μM bedragen. Andere geschikte positieve controles, die bij voorkeur gematigde $EC_{1,5}$-waarden opleveren, kunnen worden gebruikt als er historische gegevens beschikbaar zijn waaruit vergelijkbare aanvaardbaarheidscriteria voor de reeks experimenten kunnen worden afgeleid.

Opbrengen van de teststof en de controlestoffen

Er moet voor elke teststof en positieve controlestof een experiment worden verricht om een (positieve of negatieve) voorspelling af te leiden, waarbij ten minste twee onafhankelijke herhalingen moeten plaatsvinden met elk drie duplo's (d.w.z. n=6). Wanneer de resultaten van de twee onafhankelijke herhalingen van elkaar afwijken, dient het experiment een derde keer te worden herhaald met de drie duplo's (d.w.z. n=9). Elke onafhankelijke herhaling wordt op een andere dag verricht met een verse stamoplossing van teststoffen en onafhankelijk geoogste cellen. De cellen kunnen echter wel uit dezelfde passage komen.

Na het enten volgens punt 20, worden de cellen gedurende 24 uur gekweekt in de 96-wells-microtiterplaat. Het medium wordt vervolgens verwijderd en vervangen door een vers kweekmedium (150 μl kweekmedium met serum maar zonder geneticine, in het geval van KeratinoSens™) waaraan 50 μl van de 25 maal verdunde teststof en controlestoffen wordt toegevoegd. Ten minste één well per plaat dient leeg te worden gelaten (geen cellen en geen behandeling) om de achtergrondwaarden te beoordelen.

Bij de KeratinoSens™-test worden de behandelde platen vervolgens gedurende ongeveer 48 uur geïncubeerd op 37±1 °C in aanwezigheid van 5 % CO_2. Er moet goed op worden gelet dat vluchtige teststoffen niet verdampen en dat er geen kruisbesmetting met teststoffen tussen wells optreedt, bijvoorbeeld door de platen voor incubatie met de teststoffen af te dekken met een folie.

Metingen van de luciferaseactiviteit

Drie factoren zijn van kritiek belang om correcte metingen van de luminescentie te verzekeren:

— de keuze voor een gevoelige luminometer;

— het gebruik van een voldoende hoog plaatformaat om lichtkruisbesmetting te voorkomen; en

— het gebruik van een luciferasesubstraat dat voldoende licht uitstraalt om een voldoende hoge gevoeligheid en lage variabiliteit te verzekeren.

Voorafgaand aan het testen dient een controle-experiment zoals gedefinieerd in aanhangsel 3 te worden verricht om na te gaan of aan die drie criteria is voldaan.

Nadat de cellen bij de KeratinoSens™-test 48 uur zijn blootgesteld aan de teststof en de controlestoffen, worden zij uitgewassen met een zoutoplossing met fosfaatbuffer en wordt gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur de relevante lysisbuffer voor de luminescentiewaarden toegevoegd aan elke well.

▼M7

De platen met het cellysaat worden vervolgens in de luminometer geplaatst voor de meting, die bij de KeratinoSens™-test is geprogrammeerd om: (i) het luciferasesubstraat aan elke well toe te voegen (d.w.z. 50 µl), (ii) 1 seconde te wachten en vervolgens (iii) de luciferaseactiviteit gedurende 2 seconden te integreren. Wanneer er alternatieve instellingen worden gebruikt, bv. naargelang van het gebruikte luminometermodel, moeten die worden gemotiveerd. Voorts kan ook een gloeisubstraat worden gebruikt, voor zover het kwaliteitscontrole-experiment uit aanhangsel 3 met succes wordt afgerond.

Cytotoxiciteitsbeoordeling

Om de levensvatbaarheid van de cellen te testen bij de KeratinoSens™-test wordt het medium na de blootstellingstijd van 48 uur vervangen door vers medium met MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide, thiazolylblauwtetrazoliumbromide; CAS-nr. 298-93-1) en worden de cellen ongeveer 4 uur geïncubeerd op 37 °C in aanwezigheid van 5 % CO_2. Vervolgens wordt het MTT-medium verwijderd en worden de cellen gedurende een nacht gelyseerd (bv. door 10 % SDS-oplossing toe te voegen aan elke well). Nadat de wells zijn geschud, wordt de extinctie gemeten op bv. 600 nm met een fotometer.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van de gegevens

In de KeratinoSens™-test worden de volgende parameters berekend:

— de maximale gemiddelde waarde voor de x-voudige inductie van luciferaseactiviteit (I_{max}) die bij alle concentraties van de geteste stof en de positieve controle werd waargenomen;

— de $EC_{1,5}$-waarde voor de concentratie waarbij de inductie van luciferaseactiviteit de 1,5-voudige drempel (d.w.z. een met 50 % verhoogde luciferaseactiviteit) overschreed; en

— de IC_{50}- en IC_{30}-concentratiewaarden voor een daling met 50 % en met 30 % van de levensvatbaarheid van de cellen.

— De x-voudige inductie van luciferaseactiviteit wordt berekend met vergelijking 1, en de totale maximale x-voudige inductie (I_{max}) wordt berekend als gemiddelde van de individuele herhalingen.

Vergelijking 1:

$$voudige\ inductie = \frac{(L_{monster} - L_{blanco})}{(L_{oplosmiddel} - L_{blanco})}$$

waarbij

$L_{monster}$ de luminescentiewaarde is voor de well met de teststof

L_{blanco} de luminescentiewaarde is voor de blanco well die geen cellen en een behandeling bevat

$L_{oplosmiddel}$ de gemiddelde luminescentiewaarde is voor de wells met cellen en met de (negatieve) oplosmiddelcontrole

$EC_{1,5}$ wordt berekend via lineaire interpolatie volgens vergelijking 2, en de totale $EC_{1,5}$ wordt berekend als het geometrische gemiddelde van de individuele herhalingen.

Vergelijking 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

waarbij

C_a de laagste concentratie in µM is met > 1,5-voudige inductie

C_b de hoogste concentratie in µM is met < 1,5-voudige inductie

I_a de x-voudige inductie is, gemeten bij de laagste concentratie met > 1,5-voudige inductie (gemiddelde van drie duplowells)

I_b de x-voudige inductie is, gemeten bij de hoogste concentratie met < 1,5-voudige inductie (gemiddelde van drie duplowells)

De levensvatbaarheid wordt berekend met vergelijking 3:

Vergelijking 3:

$$levensvatbaarheid = \frac{(V_{monster} - V_{blanco})}{V_{oplosmiddel} - V_{blanco}} \times 100$$

waarbij

$V_{monster}$ de MTT-extinctiewaarde is voor de well met de teststof

V_{blanco} de MTT-extinctiewaarde is voor de blanco well die geen cellen en een behandeling bevat

$V_{oplosmiddel}$ de gemiddelde MTT-extinctiewaarde is voor de wells met cellen en met de (negatieve) oplosmiddelcontrole

IC_{50} en IC_{30} worden berekend via lineaire interpolatie volgens vergelijking 4, en de totale IC_{50} en IC_{30} worden berekend als het geometrische gemiddelde van de individuele herhalingen.

Vergelijking 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

waarbij

X het % reductie bij de te berekenen concentratie is (50 en 30 voor IC_{50} en IC_{30})

C_a de laagste concentratie in µM is met > x % daling van de levensvatbaarheid

C_b de hoogste concentratie in µM is met < x % daling van de levensvatbaarheid

V_a het % levensvatbaarheid bij de laagste concentratie is, met > x % daling van de levensvatbaarheid

V_b het % levensvatbaarheid bij de hoogste concentratie is, met < x % daling van de levensvatbaarheid

Voor elke concentratie die een > 1,5-voudige inductie van luciferaseactiviteit oplevert, wordt de statistische significantie berekend (bv. met behulp van een tweezijdige t-toets van Student), waarbij de luminescentiewaarden voor de drie duplomonsters worden vergeleken met de luminescentiewaarden in de (negatieve) oplosmiddelcontrole om te bepalen of de inductie van luciferaseactiviteit statistisch significant is ($p < 0,05$). De laagste concentratie die een > 1,5-voudige inductie van luciferaseactiviteit oplevert is de waarde die de $EC_{1,5}$-waarde bepaalt. Voor elk geval wordt gecontroleerd of die waarde lager is dan de IC_{30}-waarde, hetgeen erop wijst dat de daling van de levensvatbaarheid van de cellen minder dan 30 % bedraagt bij de concentratie die de $EC_{1,5}$ bepaalt.

▼M7

Het wordt aanbevolen om de gegevens visueel te controleren aan de hand van regelkaarten. Als er geen duidelijke dosis-responscurve wordt waargenomen of als de verkregen dosis-responscurve tweefasig is (d.w.z. dat zij de drempel van 1,5 tweemaal overschrijdt), moet het experiment worden overgedaan om te controleren of dit eigen is aan de teststof of te wijten is aan een artefact van het experiment. Wanneer de tweefasige respons kan worden gereproduceerd in een onafhankelijk experiment, dient de laagste $EC_{1,5}$-waarde (de concentratie waarbij de drempel van 1,5 voor het eerst wordt overschreden) te worden gemeld.

In het zeldzame geval waarin een statistisch niet-significante inductie van meer dan 1,5 maal wordt waargenomen gevolgd door een hogere concentratie met een statistisch significante inductie, worden de resultaten van die herhaling enkel als geldig en positief beschouwd als de statistisch significante inductie boven de drempel van 1,5 werd verkregen bij een niet-cytotoxische concentratie.

Tot slot wordt voor teststoffen die al een 1,5-voudige of hogere inductie vertonen bij de laagste testconcentratie van 0,98 μM een $EC_{1,5}$-waarde van < 0,98 vastgesteld op basis van een visuele controle van de dosis-responscurve.

Aanvaardbaarheidscriteria

Bij gebruik van de KeratinoSens™-test dient aan de volgende aanvaardbaarheidscriteria te worden voldaan. Ten eerste dient de inductie van luciferaseactiviteit die wordt verkregen met de positieve controle, cinnamaldehyde, statistisch significant te zijn, boven de drempel van 1,5 (bv. bij gebruik van een t-toets), in ten minste een van de geteste concentraties (van 4 tot 64 μM).

Ten tweede dient de $EC_{1,5}$-waarde tussen twee standaardafwijkingen van het historische gemiddelde van de testinstelling te vallen (bv. tussen 7 μM en 30 μM op basis van de gegevensreeks voor validering), dat regelmatig dient te worden bijgewerkt. Daarnaast dient de gemiddelde inductie in de drie duplo's voor cinnamaldehyde bij 64 μM tussen 2 en 8 te liggen. Als niet aan dat laatste criterium is voldaan, dient de dosis-respons van cinnamaldehyde zorgvuldig te worden gecontroleerd en kunnen tests enkel worden aanvaard als er een duidelijke dosis-respons bestaat waarbij de inductie van luciferaseactiviteit in de positieve controle toeneemt als de concentratie toeneemt.

Tot slot dient de gemiddelde variatiecoëfficiënt van de luminescentiewaarde voor de (negatieve) oplosmiddelcontrole DMSO minder dan 20 % te bedragen voor elke herhaling waarbij 6 wells in drievoud worden getest. Als de variatie groter is, dienen de resultaten te worden verworpen.

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

Een KeratinoSens™-voorspelling wordt positief geacht als aan elk van de volgende 4 voorwaarden is voldaan in 2 van 2 of in dezelfde 2 van 3 herhalingen. Is dat niet het geval, dan wordt de KeratinoSens™-voorspelling negatief geacht (figuur 1):

1. de I_{max} is hoger dan (>) 1,5-voudig en vertoont een statistisch significant verschil ten opzichte van de (negatieve) oplosmiddelcontrole (zoals bepaald aan de hand van een tweezijdige, ongepaarde t-toets van Student);

2. de levensvatbaarheid van de cellen is hoger dan (>) 70 % bij de laagste concentratie waarbij een meer dan 1,5-voudige inductie van luciferaseactiviteit optreedt (d.w.z. bij de concentratie die de $EC_{1,5}$ bepaalt);

3. de $EC_{1,5}$-waarde ligt lager dan (<) 1 000 μM (of < 200 μg/ml voor teststof waarvan het molecuulgewicht niet is bepaald);

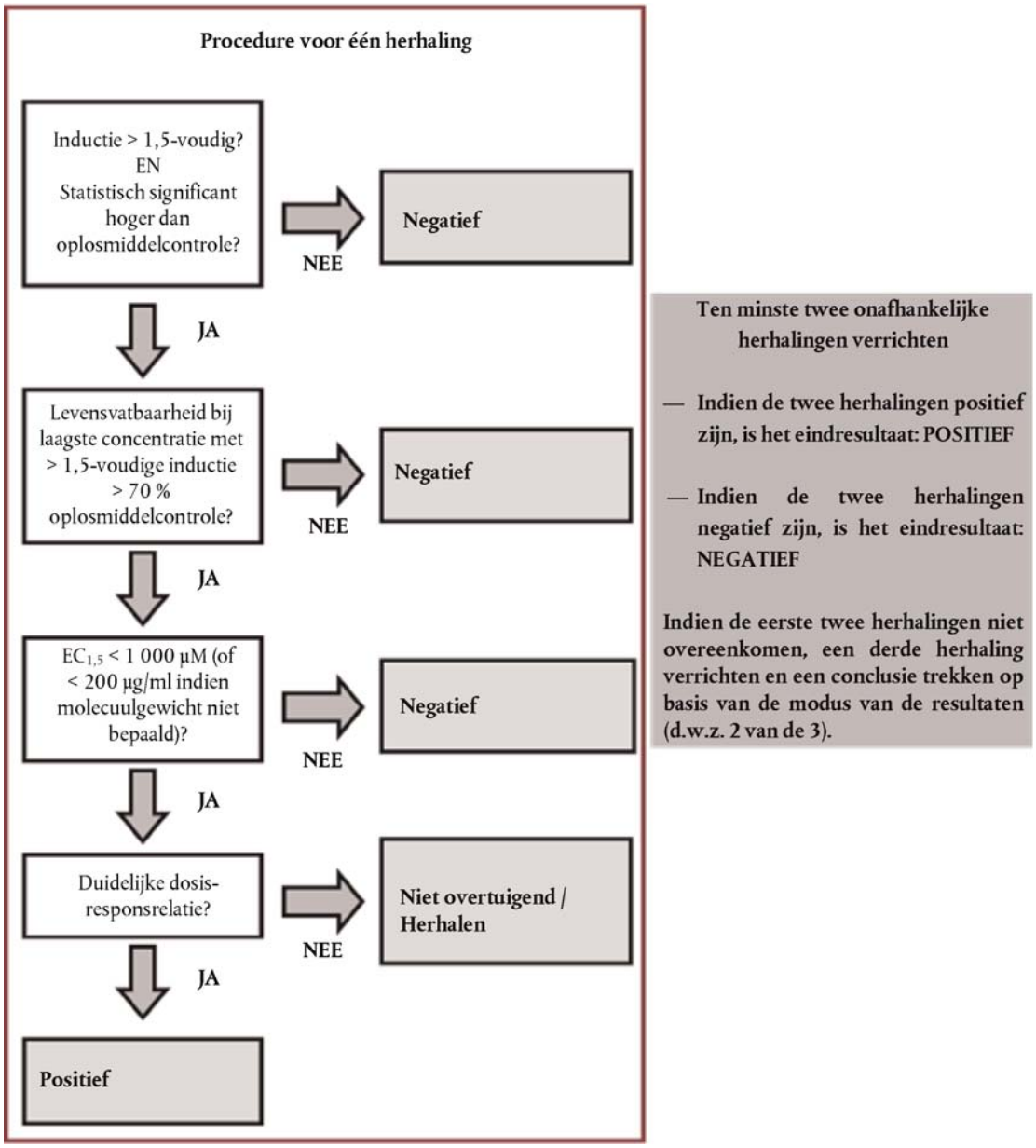
4. er bestaat een duidelijke globale dosis-respons voor luciferase-inductie (of een tweefasige respons zoals vermeld in punt 33).

▼M7

Als bij een herhaling aan elk van de eerste drie voorwaarden is voldaan maar er geen duidelijke dosis-respons voor de luciferase-inductie kan worden waargenomen, dient het resultaat van die herhaling als niet-overtuigend te worden beschouwd en kunnen bijkomende tests nodig zijn (figuur 1). Voorts dient ook een negatief resultaat dat werd verkregen bij concentraties < 1 000 µM (of < 200 µg/ml voor teststoffen waarvan het molecuulgewicht niet is bepaald) als niet-overtuigend te worden beschouwd (zie punt 11).

Figuur 1:

voorspellingsmodel dat wordt gebruikt in de KeratinoSens™-test. Een KeratinoSens™-voorspelling dient te worden bekeken in het kader van een IATA en in overeenstemming met hetgeen is bepaald in de punten 9 en 11.



In zeldzame gevallen kunnen teststoffen die luciferaseactiviteit induceren op een niveau dat erg dicht bij het cytotoxiciteitsniveau ligt, bij niet-cytotoxische niveaus (d.w.z. wanneer de concentratie die de $EC_{1,5}$ bepaalt lager is dan (<) de IC_{30}) een positief resultaat opleveren in sommige herhalingen, terwijl dat in andere herhalingen enkel bij cytotoxische niveaus gebeurt (d.w.z. wanneer de concentratie die de $EC_{1,5}$ bepaalt hoger is dan (>) de IC_{30}). Dergelijke teststoffen worden opnieuw getest met een striktere analyse van de dosis-respons, waarbij

▼M7

een lagere verdunningsfactor wordt gebruikt (bv. 1,33- of Ö2-voudige (=1,41-voudige) verdunning tussen wells) om te bepalen of er inductie is opgetreden bij cytotoxische niveaus of niet (9).

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof

— Stof die uit één component bestaat

  — chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;

  — fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, oplosbaarheid in DMSO, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;

  — zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;

  — behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

  — geteste concentratie(s);

  — opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

— Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB en mengsel:

  — karakterisering, voor zover mogelijk aan de hand van bv. chemische identiteit (zie hierboven), zuiverheid, kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie hierboven) van de bestanddelen, voor zover beschikbaar;

  — fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, oplosbaarheid in DMSO en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn;

  — molecuulgewicht of schijnbaar molecuulgewicht in het geval van mengsels/polymeren waarvan de samenstelling bekend is, of andere informatie die relevant is voor het verloop van de studie;

  — behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

  — geteste concentratie(s);

  — opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar.

Controles

— Positieve controle

  — chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s), SMILES- of InChI-code(s), structuurformules en/of andere identificatiemiddelen;

  — fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water, oplosbaarheid in DMSO, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, voor zover die beschikbaar zijn en voor zover van toepassing;

  — zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;

  — behandeling voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

  — geteste concentratie(s);

  — opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;

▼M7

— verwijzing naar historische positievecontroleresultaten waaruit de geschiktheid van de aanvaardbaarheidscriteria voor de reeks experimenten blijkt, indien van toepassing.

— Negatieve (medium)controle:

— chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-na(a)m(en), CAS-nummer(s) en/of andere identificatiemiddelen;

— zuiverheid, chemische naam van onzuiverheden waar passend en praktisch haalbaar enz.;

— fysisch voorkomen, molecuulgewicht en andere relevante fysisch-chemische eigenschappen, in het geval er andere negatieve controles/media worden gebruikt dan diegene die zijn vermeld in deze testmethode, en voor zover beschikbaar;

— opslagomstandigheden en stabiliteit, voor zover beschikbaar;

— motivering van de keuze van het oplosmiddel voor elke teststof.

Omstandigheden van de testmethode

— Naam en adres van de opdrachtgever, testinstallatie en de directeur van het onderzoek;

— een beschrijving van de gebruikte testmethode;

— gebruikte cellijn, omstandigheden waarin die werd bewaard en oorsprong (bv. de instelling waar de cellijn werd gehaald);

— aantal passages en mate van confluentie van de cellen die werden gebruikt voor de tests;

— gebruikte methode voor het tellen van de cellen met het oog op de enting voorafgaand aan de tests en getroffen maatregelen om een homogene verdeling van het aantal cellen te verzekeren (zie punt 20);

— gebruikte luminometer (bv. model), met inbegrip van de instrumentinstellingen, het gebruikte luciferasesubstraat en bewijs van passende luminescentiemetingen op basis van de in aanhangsel 3 beschreven controletest;

— gebruikte procedure om aan te tonen dat het laboratorium bekwaam is om de testmethode toe te passen (bv. door de stoffen voor bekwaamheidstoetsing te testen) of om aan te tonen dat de prestaties van de testmethode in de loop van de tijd kunnen worden gereproduceerd.

Testprocedure

— Het aantal gebruikte herhalingen en duplo's;

— De concentraties van de teststof, gebruikte procedure voor het opbrengen en blootstellingstijd (indien verschillend van de aanbevolen tijd);

— Een beschrijving van de gebruikte beoordelings- en beslissingscriteria;

— Een beschrijving van de gebruikte criteria voor de aanvaardbaarheid van tests;

— Een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure.

Resultaten

— Een tabel met de waarden voor I_{max}, $EC_{1,5}$ en levensvatbaarheid (d.w.z. IC_{50}, IC_{30}) die werden verkregen voor de teststof en voor de positieve controle van elke herhaling, evenals de gemiddelde waarden (I_{max}: gemiddelde; $EC_{1,5}$- en levensvatbaarheidswaarden: geometrisch gemiddelde) en de SD, berekend met behulp van gegevens uit alle afzonderlijke herhalingen, en een indicatie van de score van de teststof volgens het voorspellingsmodel;

▼M7

— De variatiecoëfficiënt verkregen op basis van de luminescentiewaarden voor de negatieve controle voor elk experiment;

— Een grafiek met de dosis-responscurves voor inductie van luciferaseactiviteit en levensvatbaarheid;

— Een beschrijving van eventuele andere relevante waarnemingen.

Bespreking van de resultaten

— Bespreking van de resultaten verkregen met de KeratinoSens™-test;

— Overweging van de resultaten van de testmethode in de context van een IATA, als er andere relevante informatie beschikbaar is.

Conclusie

LITERATUUR

(1) Verenigde Naties (VN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, VN New York en Genève, 2013. Beschikbaar op: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OESO (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. OESO, Parijs.

(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) Hoofdstuk B.42 van deze bijlage: sensibilisatie van de huid: lokale lymfkliertest.

(5) Hoofdstuk B.6 van deze bijlage: sensibilisatie van de huid.

(6) Hoofdstuk B.50 van deze bijlage: sensibilisatie van de huid: lokale lymfkliertest: DA.

(7) Hoofdstuk B.51 van deze bijlage: sensibilisatie van de huid: lokale lymfkliertest: BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 blz. Beschikbaar op: 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 blz. Beschikbaar op: 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) OESO (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing nr. 457. OESO, Parijs.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report nr. 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) OESO (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, OESO, Parijs.

(29) OESO (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 nr. 34. OESO, Parijs, Frankrijk.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 blz. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

AOP (Adverse Outcome Pathway): een reeks gebeurtenissen van de chemische structuur van een doelstof of een groep soortgelijke chemische stoffen over de moleculaire inleidende gebeurtenis tot een te onderzoeken in-vivoresultaat (2).

ARE: het antioxidantresponselement (ook wel EpRE of elektrofiel responselement genoemd) is een responselement dat stroomopwaarts van de promotor van veel cytoprotectieve en fase II-genen wordt aangetroffen. Wanneer het wordt geactiveerd door Nfr2, vermindert het de transcriptionele inductie van die genen.

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid (29).

Chemische stof: een stof of mengsel.

$\mathbf{EC_{1.5}}$: geïnterpoleerde concentratie voor een 1,5-voudige luciferase-inductie.

Geldige testmethode: een testmethode die voldoende relevant en betrouwbaar wordt geacht voor een specifiek doel en gebaseerd is op wetenschappelijk verantwoorde beginselen. Een testmethode is nooit algemeen geldig, maar enkel met betrekking tot een specifiek doel (29).

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Gevoeligheid: Het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. De gevoeligheid is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (29).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen (1).

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, geïntegreerde test- en beoordelingsbenadering): een gestructureerde aanpak die wordt gebruikt voor de identificatie van gevaren (potentieel), het kenmerken van gevaren (potentie) en/of het beoordelen van de veiligheid (potentieel/potentie en blootstelling) van een chemische stof of een groep chemische stoffen, waarbinnen alle relevante gegevens strategisch worden geïntegreerd en worden afgewogen als inbreng voor regelgevingsbesluiten inzake potentiële gevaren en/of risico's en/of de noodzaak van verdere gerichte en bijgevolg minimale tests.

$\mathbf{IC_{30}}$: concentratie die een daling van de levensvatbaarheid van de cellen met 30 % bewerkstelligt.

$\mathbf{IC_{50}}$: concentratie die een daling van de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % bewerkstelligt.

$\mathbf{I_{max}}$: maximale inductiefactor van luciferaseactiviteit in vergelijking met de (negatieve) oplosmiddelcontrole gemeten bij alle concentraties van de teststof.

▼M7

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1 is een sensoreiwit dat de activiteit van Nrf2 kan reguleren. In niet-geïnduceerde omstandigheden werkt het Keap1-sensoreiwit in op de Nrf2-transcriptiefactor voor ubiquitinylering en proteolytische degradatie in het proteasoom. De covalente aanpassing van de reactieve cysteïneresiduen van Keap1 door kleine moleculen kan ertoe leiden dat Nrf2 zich gaat afscheiden van Keap1 (8) (10) (11).

Medium-/oplosmiddelcontrole: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem met uitzondering van de teststof, maar met inbegrip van het gebruikte oplosmiddel. Dit monster wordt gebruikt om de referentierespons vast te stellen voor de monsters die worden behandeld met de teststof opgelost in hetzelfde oplosmiddel.

Mengsel: een mengsel of een oplossing bestaande uit twee of meer stoffen waarin deze stoffen geen reactie met elkaar aangaan (1).

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie". Deze term en de term „concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt (29).

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 is een transcriptiefactor die een rol speelt in de route van de antioxidantrespons. Als Nrf2 niet geübiquitinyleerd is, stapelt hij zich op in het cytoplasma en verplaatst hij zich naar de nucleus, waar hij in het gebied van de stroomopwaarts gelegen promotor van veel cytoprotectieve genen bindt met het ARE en zo de transcriptie van die genen start (8) (10) (11).

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positieve-controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet buitensporig zijn.

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (29).

Reproduceerbaarheid: de overeenkomst tussen resultaten verkregen uit tests op dezelfde chemische stof met behulp van hetzelfde testprotocol (zie betrouwbaarheid) (29).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de testmethode correct wordt ingedeeld. De specificiteit is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert, en is een belangrijke factor bij de beoordeling van de relevantie van een testmethode (29).

Stof: chemische elementen en verbindingen ervan, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het product en alle onzuiverheden ten gevolge van het productieprocedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd (1).

Stof die uit één component bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin een hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van ten minste 80 % (w/w).

Stof die uit meerdere componenten bestaat: een stof die wordt gekenmerkt door haar kwantitatieve samenstelling en waarin meer dan één hoofdcomponent aanwezig is in een concentratie van $\geq$ 10 % (w/w) en $<$ 80 % (w/w). Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een fabricageproces. Het verschil tussen mengsels en stoffen die uit meerdere componenten bestaan, is dat mengsels worden verkregen door twee of meer stoffen zonder chemische reactie met elkaar te vermengen. Een stof die uit meerdere componenten bestaat, is het resultaat van een chemische reactie.

▼**M7**

Teststof: met de term „teststof” wordt verwezen naar datgene dat wordt getest.

UVCB: stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

Variatiecoëfficiënt: een maat voor de variabiliteit die wordt berekend voor een groep duplogegevens door de standaardafwijking te delen door het gemiddelde. Dit quotiënt kan ook worden vermenigvuldigd met 100 om het uit te drukken als een percentage.

▼M7

Aanhangsel 2

STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING

In-vitrohuidsensibilisatie: ARE-Nrf2-luciferasetestmethode

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van deze testmethode, dienen laboratoria hun technische bekwaamheid aan te tonen door de correcte KeratinoSens™-voorspelling te verkrijgen voor de 10 stoffen die in tabel 1 worden aangeraden en door de $EC_{1,5}$- en IC_{50}-waarden te bekomen die binnen de respectieve referentiebereiken vallen voor ten minste 8 van de 10 stoffen voor bekwaamheidstoetsing. Deze stoffen voor bekwaamheidstoetsing werden geselecteerd om alle mogelijke responsen voor huidsensibilisatiegevaar te weerspiegelen. Andere selectiecriteria waren dat stoffen commercieel beschikbaar zijn en dat er in-vivoreferentiegegevens en met de KeratinoSens™-test gegenereerde in-vitrogegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn.

Tabel 1

Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met de KeratinoSens™-test

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing	CAS RN	Fysische vorm	In-vivovoorspelling (1)	KeratinoSens™-voorspelling (2)	Referentiebereik $EC_{1.5}$ (µM) (3)	Referentiebereik IC_{50} (µM) (3)
Propaan-2-ol	67-63-0	Vloeistof	Niet-allergeen	Negatief	> 1 000	> 1 000
Salicylzuur	69-72-7	Vaste stof	Niet-allergeen	Negatief	> 1 000	> 1 000
Melkzuur	50-21-5	Vloeistof	Niet-allergeen	Negatief	> 1 000	> 1 000
Glycerol	56-81-5	Vloeistof	Niet-allergeen	Negatief	> 1 000	> 1 000
Cinnamylalcohol	104-54-1	Vaste stof	Huidallergeen (zwak)	Positief	25 — 175	> 1 000
Ethyleenglycoldimethacrylaat	97-90-5	Vloeistof	Huidallergeen (zwak)	Positief	5 — 125	> 500
2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Vaste stof	Huidallergeen (matig)	Positief	25 — 250	> 500
Methyldibroomglutaronitril	35691-65-7	Vaste stof	Huidallergeen (sterk)	Positief	< 20	20 — 100
4-Methylaminofenolsulfaat	55-55-0	Vaste stof	Huidallergeen (sterk)	Positief	< 12,5	20 — 200
2,4-Dinitrochloorbenzeen	97-00-7	Vaste stof	Huidallergeen (extreem)	Positief	< 12,5	5 — 20

(1) De voorspellingen van de in-vivogevaren (en de potentie) zijn gebaseerd op LLNA-gegevens (13). De in-vivopotentie wordt afgeleid met behulp van de criteria die zijn voorgesteld door ECETOC (24).

(2) Een KeratinoSens™-voorspelling dient te worden bekeken in het kader van een IATA en in overeenstemming met hetgeen is bepaald in de punten 9 en 11 van deze testmethode.

(3) Op basis van de in het verleden waargenomen waarden (12).

▼M7

Aanhangsel 3

KWALITEITSCONTROLE VAN DE LUMINESCENTIEMETINGEN

Basisexperiment om optimale luminescentiemetingen te verzekeren bij de KeratinoSens™-test

De volgende drie parameters zijn van kritiek belang om betrouwbare resultaten te kunnen bereiken met de luminometer:

— een voldoende hoge gevoeligheid, die een stabiele achtergrond oplevert in controlewells;

— geen gradiënt over de plaat, vanwege lange meettijden; en

— geen lichtverontreiniging in aangrenzende wells afkomstig van bijzonder actieve wells.

Er wordt aanbevolen om vóór het testen te verzekeren dat de luminescentiemetingen correct zijn door een controleplaatopstelling te testen zoals hieronder beschreven (drievoudige analyse).

Plaatopstelling van het eerste oefenexperiment

	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**	**Blanco**

EGDMA = ethyleenglycoldimethacrylaat (CAS-nr.: 97-90-5) een sterk inducerende chemische stof

CA = cinnamaldehyde, positieve referentie (CAS-nr.: 104-55-2)

De analyse van de kwaliteitscontrole dient het volgende aan te tonen:

— een duidelijke dosis-respons in rij D, waarbij I_{max} > 20-voud van de achtergrondniveaus (in de meeste gevallen worden I_{max}-waarden tussen 100 en 300 bereikt);

— geen dosis-respons in de rijen C en E (geen inductiewaarde boven 1,5 (idealiter geen waarde boven 1,3) vanwege mogelijke lichtverontreiniging, in het bijzonder naast erg actieve wells in de EGDMA-rij;

— geen statistisch significant verschil tussen de rijen A, B, C, E, F en G. (d.w.z. geen gradiënt over de plaat); en

— een variabiliteit in de rijen A, B, C, E, F en G en in de DMSO-wells in rij H van minder dan 20 % (d.w.z. een stabiele achtergrond).

▼M7

B.61. FLUORESCEÏNELEKKAGE-TESTMETHODE VOOR DE IDENTIFICATIE VAN VOOR HET OOG CORROSIEVE EN HEVIG IRRITERENDE STOFFEN

INLEIDING

Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 460 (2012) van de OESO. De fluoresceïnelekkage-testmethode (FL-testmethode) is een in-vitrotestmethode die onder bepaalde voorwaarden en binnen specifieke beperkingen kan worden gebruikt om chemische stoffen (stoffen en mengsels) in te delen als voor het oog corrosieve en hevig irriterende stoffen, zoals gedefinieerd in het wereldwijd geharmoniseerd systeem voor de indeling en etikettering van chemische stoffen van de Verenigde Naties (GHS) (categorie 1), in Verordening (EG) nr. 1272/2008 van de Europese Unie betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsel (CLP-verordening) ([1]) (categorie 1) en door het Amerikaanse agentschap voor milieubescherming (Environmental Protection Agency of EPA) (klasse I) (1) (2). Voor de toepassing van deze testmethode worden voor de ogen hevig irriterende stoffen gedefinieerd als chemische stoffen die na aanbrenging van de teststof weefselschade aan het oog veroorzaken die niet reversibel is binnen 21 dagen of die ernstige fysische gezichtsvermindering teweegbrengt, terwijl voor het oog corrosieve stoffen chemische stoffen zijn die irreversibele weefselschade aan het oog veroorzaken. Deze chemische stoffen zijn ingedeeld als VN-GHS-categorie 1, EU-CLP-categorie 1 of VS-EPA-klasse I.

Hoewel de FL-testmethode niet geldig wordt geacht om de in-vivo-oogtest bij konijnen volledig te vervangen, wordt de FL aanbevolen voor gebruik als onderdeel van een trapsgewijze teststrategie voor indeling en etikettering volgens de regelgeving. De FL wordt zo aanbevolen als eerste stap in een top-downbenadering om voor het oog corrosieve/hevig irriterende stoffen te identificeren, in het bijzonder voor specifieke soorten chemische stoffen (meer bepaald in water oplosbare stoffen en mengsels) (3) (4).

Momenteel wordt algemeen aangenomen dat er in de nabije toekomst geen in-vitrotest voor oogirritatie zal komen die de in-vivotest op ogen (TM B.5 (5)) volledig kan vervangen om voorspellingen te doen voor het volledige bereik van irritatie voor verschillende klassen chemische stoffen. Strategische combinaties van meerdere alternatieve testmethoden binnen een (trapsgewijze) teststrategie kunnen de in-vivotest op ogen mogelijk echter wel vervangen (4). De top-downbenadering (4) is opgezet om te worden gebruikt wanneer op basis van bestaande informatie wordt verwacht dat een chemische stof een hoog irritatiepotentieel heeft.

Op basis van het in punt 35 beschreven voorspellingsmodel kan de FL-testmethode chemische stoffen zonder bijkomende tests identificeren binnen een beperkt toepassingsgebied als voor het oog corrosieve stoffen/hevig irriterende stoffen (VN-GHS-categorie 1; EU-CLP-categorie 1; VS-EPA-klasse I). Hetzelfde wordt aangenomen voor mengsels, hoewel er geen mengsels werden gebruikt bij de validering. De FL-testmethode kan bijgevolg worden gebruikt om de oogirritatie/corrosiviteit van chemische stoffen te bepalen, volgens de trapsgewijze teststrategie van TM B.5 (5). Een chemische stof waarvoor met de FL-testmethode niet voorspeld wordt dat zij corrosief is voor de ogen of hevig irriterend is, dient echter te worden getest in een of meer aanvullende testmethoden (in vitro en/of in vivo) die geschikt zijn voor de identificatie van i) chemische stoffen die in vitro vals-negatieve uitslagen opleveren voor oogirritatie/hevige irritatie in de FL (VN-GHS-categorie 1; EU-CLP-categorie 1; VS-EPA-klasse I); ii) chemische stoffen die niet zijn ingedeeld voor corrosie/irritatie van het oog

([1]) Verordening (EG) nr. 1272/2008 van het Europees Parlement en de Raad van 16 december 2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels tot wijziging en intrekking van de Richtlijnen 67/548/EEG en 1999/45/EG en tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1907/2006, PB L 353 van 31.12.2008, blz. 1.

▼M7

(VN GHS geen categorie; EU CLP geen categorie: VS-EPA-klasse IV); en/of iii) chemische stoffen die matig/mild irriterend zijn voor het oog (VN-GHS-categorieën 2A en 2B; EU-CLP-categorie 2; VS-EPA-klassen II en III).

Het doel van deze testmethode is het beschrijven van de procedures die worden gebruikt om de mogelijke corrosie of hevige irritatie van een teststof voor de ogen te beoordelen aan de hand van het vermogen van deze stof om schade te induceren in een ondoordringbare, confluente monolaag van epitheelcellen. De integriteit van de permeabiliteit doorheen de epitheellaag is een belangrijke functie van de epitheellaag, bijvoorbeeld in de conjunctiva en de cornea. De permeabiliteit doorheen de epitheellaag wordt gereguleerd door verschillende tight junctions. Er is een verband vastgesteld tussen het verhogen van de permeabiliteit van het hoornvliesepitheel in vivo en de mate van ontsteking en oppervlakkige schade naarmate oogirritatie optreedt.

Bij de FL-testmethode worden de toxische effecten na een korte blootstelling aan de teststof gemeten aan de hand van een verhoging van de hoeveelheid natriumfluoresceïne die door de epitheelmonolaag dringt in MDCK-cellen (Madin-Darby Canine Kidney-cellen) die op doorlaatbare inzetstukken zijn gekweekt. De hoeveelheid fluoresceïnelekkage die optreedt is evenredig aan de door chemische stoffen geïnduceerde schade aan de tight junctions, desmosomen en celmembranen en kan worden gebruikt om het toxisch potentieel van een teststof voor de ogen te ramen. Aanhangsel 1 bevat een diagram van op een membraan van een inzetstuk gekweekte MDCK-cellen.

Definities worden gegeven in aanhangsel 2.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

Deze testmethode is gebaseerd op het INVITTOX-protocol nr. 71 (6) dat werd beoordeeld in een interne valideringsstudie uitgevoerd door het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM), in samenwerking met het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) van de Verenigde Staten en het Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM).

De FL-testmethode wordt niet aanbevolen voor de identificatie van chemische stoffen die als matig/mild irriterend voor het oog ingedeeld dienen te worden of van chemische stoffen die niet ingedeeld dienen te worden (d.w.z. GHS-cat. 2A/2B, geen categorie; EU-CLP-cat. 2, geen categorie; VS-EPA-klasse II/III/IV), zoals aangetoond in de valideringsstudie (3) (7).

De testmethode enkel toepasselijk op in water oplosbare chemische stoffen (stoffen en mengsels). De FL-testmethode voorspelt gewoonlijk nauwkeurig of in water oplosbare chemische stoffen mogelijk hevige oogirritatie kunnen veroorzaken en/of het toxische effect niet wordt beïnvloed door verdunning (7). Om een chemische stof in te delen als in water oplosbaar in het kader van een experiment, dient zij oplosbaar te zijn in een steriele Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) met calcium (in een concentratie van 1,0-1,8 mM) en zonder fenol rood, in een concentratie van $\geq$ 250 mg/ml (een dosis boven de drempelwaarde van 100 mg/ml). Als de teststof echter oplosbaar is bij een lagere concentratie dan 100 mg/ml maar al een FL-inductie van 20 % induceert bij die concentratie (dus FL_{20} < 100 mg/ml), kan zij nog steeds worden ingedeeld als GHS-cat. 1 of EPA-cat. I.

Vanwege de vastgestelde beperkingen zijn sterke zuren en basen, celfixeermiddelen en bijzonder vluchtige chemische stoffen uitgesloten van het toepassingsgebied van deze testmethode. Deze chemische stoffen beschikken over mechanismen die niet worden gemeten door de FL-testmethode, zoals sterke stolling, verzeping of specifieke reactieve verbindingen. Andere vastgestelde beperkingen voor deze methode zijn gebaseerd op de resultaten voor het voorspellend vermogen voor gekleurde en viskeuze teststoffen (7). Er wordt gesuggereerd dat beide soorten chemische stoffen moeilijk uit de monolaag te verwijderen zijn na de korte blootstellingsperiode en dat de voorspelbaarheid van de testmethode zou kunnen worden verbeterd als er meer uitwassingen zouden worden gehanteerd.

▼M7

Vaste chemische stoffen die in een vloeistof in suspensie zijn gebracht, kunnen uit die vloeistof neerslaan, en de uiteindelijke concentratie voor de cellen kan moeilijk te bepalen zijn. De nauwkeurigheid van FL in het EU-, EPA- en GHS-classificatiesysteem verbetert aanzienlijk als stoffen die tot deze chemische en fysische klassen behoren, uit de databank worden verwijderd (7).

Gezien het doel van deze testmethode (de identificatie van enkel die stoffen die corrosief of hevig irriterend zijn voor de ogen) zijn vals-negatieve uitslagen (zie punt 13) niet doorslaggevend, aangezien dergelijke teststoffen nadien met andere gevalideerde in-vitrotests of, naargelang van de geldende voorschriften, op konijnen worden getest met behulp van een sequentiële teststrategie in een benadering met meervoudige bewijsvoering („weight of evidence" benadering) (5) (zie ook de punten 3 en 4).

Andere vastgestelde beperkingen van de FL-testmethode zijn gebaseerd op de percentages vals-negatieve en vals-positieve uitslagen. Wanneer deze testmethode werd gebruikt als eerste stap in een top-downbenadering om in water oplosbare voor het oog corrosieve/hevig irriterende stoffen en mengsels te identificeren (VN-GHS-categorie 1; EU-CLP-categorie 1; VS-EPA-klasse I), lag het percentage vals-positieve uitslagen voor de FL-testmethode tussen 7 % (7/103; VN-GHS en EU-CLP) en 9 % (9/99; VS-EPA) en het percentage vals-negatieve uitslagen tussen 54 % (15/28; VS-EPA) en 56 % (27/48; VN-GHS en EU-CLP) in vergelijking met in-vivoresultaten. Chemische groepen die vals-positieve en/of vals-negatieve uitslagen geven bij de FL-testmethode, worden hier niet gedefinieerd.

Bepaalde technische beperkingen hebben enkel betrekking op de MDCK-celcultuur. De tight junctions die de passage van het natriumfluoresceïne door de monolaag tegenhouden, worden steeds meer aangetast naarmate het aantal celpassages stijgt. Als de tight junctions niet volledig zijn gevormd, leidt dat tot een hogere FL in de niet-behandelde controle. Daarom is het belangrijk om een toelaatbare maximumlekkage in de niet-behandelde controles vast te stellen (zie punt 38: 0 % lekkage). Net zoals bij alle in-vitrotests bestaat de mogelijkheid dat cellen na verloop van tijd vervormen. Het is daarom van essentieel belang dat er een bereik voor het aantal passages voor de tests wordt vermeld.

Het huidige toepassingsgebied kan in sommige gevallen worden uitgebreid, maar enkel na analyse van een ruimere gegevensreeks van onderzochte teststoffen, bij voorkeur verkregen op basis van tests (3). Deze testmethode wordt dienovereenkomstig bijgewerkt naarmate nieuwe informatie en gegevens in overweging worden genomen.

Elk laboratorium dat dit onderzoek voor het eerst opstelt, dient gebruik te maken van de in bijlage 3 voorziene chemicaliën voor bekwaamheidstoetsing. Laboratoria kunnen deze chemische stoffen gebruiken om hun technische bekwaamheid met betrekking tot het uitvoeren van de FL-testmethode aan te tonen vooraleer zij FL-onderzoeksgegevens indienen voor de wettelijke gevarenclassificatie.

PRINCIPE VAN DE TEST

De FL-testmethode is een in-vitrotest op basis van de cytotoxiciteit en de celfunctie die wordt uitgevoerd op een confluente monolaag tubulaire MDCK CB997-epitheelcellen die op semipermeabele inzetstukken worden gekweekt en de niet-delende toestand van het hoornvliesepitheel in vivo modelleren. De MDCK-cellijn is uitvoerig beschreven en vormt tight junctions en desmosomen die vergelijkbaar zijn met die aan de apicale zijde van de epitheellagen van de conjunctiva en de cornea. In vivo voorkomen tight junctions en desmosomen dat opgeloste stoffen en vreemde materialen door het hoornvliesepitheel dringen. Het verlies van impermeabiliteit door de epitheellaag vanwege beschadigde tight junctions en desmosomen is een van de eerste gebeurtenissen die optreden bij oogirritatie door chemische stoffen.

▼M7

De teststof wordt aangebracht op de confluente laag cellen die op de apicale zijde van het inzetstuk is gekweekt. Gewoonlijk wordt voor een korte blootstelling van 1 min gekozen om de normale zuiveringssnelheid bij menselijke blootstelling te weerspiegelen. Een korte blootstellingsperiode biedt het voordeel dat stoffen en mengsels op waterbasis onverdund kunnen worden getest, voor zover zij na de blootstellingsperiode eenvoudig kunnen worden verwijderd. Zo zijn er meer rechtstreekse vergelijkingen tussen de chemische effecten bij mensen mogelijk. Vervolgens wordt de teststof verwijderd en wordt de niet-toxische, sterk fluorescerende kleurstof natriumfluoresceïne gedurende 30 minuten aan de apicale zijde van de monolaag aangebracht. De door de teststof veroorzaakte schade aan de tight junctions wordt bepaald aan de hand van de hoeveelheid fluoresceïne die binnen een bepaalde tijd door de cellaag lekt.

De hoeveelheid natriumfluoresceïne die door de monolaag en het membraan van het inzetstuk dringt tot in een vast volume oplossing dat aanwezig is in de well (waarin het lekkende natriumfluoresceïne wordt opgevangen), wordt bepaald door de fluoresceïneconcentratie in de well te meten met een spectrofluorimeter. De hoeveelheid fluoresceïnelekkage (FL) wordt berekend onder verwijzing naar metingen van de fluorescentie-intensiteit (FI) verkregen bij twee controles: een blanco controle en een maximumlekkagecontrole. Het percentage lekkage, en bijgevolg ook de hoeveelheid schade aan de tight junctions, wordt voor alle vastgestelde concentraties van de teststof uitgedrukt in verhouding tot die controles. Vervolgens wordt de FL_{20} (*d.w.z.* de concentratie die 20 % FL veroorzaakt ten opzicht van de waarde die werd genoteerd voor de onbehandelde confluente monolaag en de inzetstukken zonder cellen) berekend. De FL_{20}-waarde (mg/ml) wordt in het voorspellingsmodel gebruikt om voor het oog corrosieve en hevig irriterende stoffen te identificeren (zie punt 35).

Recovery vormt een belangrijk onderdeel van het toxiciteitsprofiel van een teststof, dat eveneens wordt beoordeeld bij de in-vivotest op oogirritatie. Voorlopige analyses gaven aan dat gegevens over recovery (tot 72 uur na de blootstelling aan de chemische stof) het voorspellend vermogen van INVITTOX-protocol nr. 71 zouden kunnen verhogen, maar dat er bijkomende beoordelingen nodig zijn en dat aanvullende gegevens, bij voorkeur verkregen uit verdere tests, daarbij zouden kunnen helpen (6). Deze testmethode wordt dienovereenkomstig bijgewerkt naarmate nieuwe informatie en gegevens in overweging worden genomen.

PROCEDURE

Bereiding van de monolaag van cellen

De monolaag van MDCK CB997-cellen wordt bereid met behulp van subconfluente cellen die in celkweekflessen worden gekweekt in DMEM/Nutrient Mix F12 (1x concentraat met L-glutamine, 15 mM HEPES, calcium (in een concentratie van 1,0-1,8 mM) en 10 % door warmte geïnactiveerd FCS/FBS). Belangrijk is dat alle media/oplossingen die in de loop van de FL-test worden gebruikt, calcium dienen te bevatten in een concentratie tussen 1,8 mM (200 mg/l) en 1.0 mM (111 mg/l) om de vorming van tight junctions en de integriteit ervan te verzekeren. Het bereik voor het aantal celpassages dient te worden geregeld om een gelijkmatige, reproduceerbare vorming van tight junctions te verzekeren. De cellen dienen zich bij voorkeur binnen het bereik van 3-30 passages na het ontdooien te bevinden, aangezien de functionaliteit van de cellen binnen dat passagebereik vergelijkbaar is, wat helpt om de reproduceerbaarheid van de testresultaten te verzekeren.

Voordat de FL-testmethode wordt uitgevoerd, worden de cellen losgemaakt van de fles met behulp van trypsinisatie, worden ze gecentrifugeerd en wordt een passende hoeveelheid cellen op de inzetstukken geënt, die in 24-wells-platen worden geplaatst (zie aanhangsel 1). Voor het enten van de cellen dienen inzetstukken van twaalf millimeter doorsnede met een membraan van gemengde cellulose-esters, een dikte van 80-150 µm en een poriëngrootte van 0,45 µm te worden gebruikt. Bij de valideringsstudie werden Millicell-HA-inzetstukken van 12 mm gebruikt. De eigenschappen van het inzetstuk en het membraantype zijn van belang, aangezien zij van invloed kunnen zijn op de celgroei en de binding van chemische stoffen. Bepaalde types van chemische stoffen kunnen aan het membraan van het Millicell-HA-inzetstuk binden, hetgeen van invloed kan zijn op de interpretatie van de resultaten. Als er andere membranen worden gebruikt, dient de gelijkwaardigheid te worden aangetoond met behulp van chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing (zie aanhangsel 3).

▼M7

De binding van chemische stoffen aan het membraan van het inzetstuk komt vaker voor bij kationische chemische stoffen, zoals benzalkoniumchloride, die worden aangetrokken tot het geladen membraan (7). De binding van chemische stoffen aan het membraan van het inzetstuk kan de blootstellingsperiode aan de chemische stof verlengen, waardoor het toxische potentieel van de chemische stof te hoog kan worden ingeschat, maar kan ook de fluoresceïnelekkage door het inzetstuk fysiek verminderen doordat de kleurstof aan de kationische stof bindt, die op haar beurt aan het membraan van het inzetstuk is gebonden, waardoor het toxische potentieel van de chemische stof te laag kan worden ingeschat. Dit kan eenvoudig worden bewaakt door enkel het membraan bloot te stellen aan de hoogste concentratie van de geteste chemische stof en vervolgens gedurende de standaardtijd de natriumfluoresceïnekleurstof toe te voegen bij de normale concentratie (geen celcontrole). Als het natriumfluoresceïne bindt, kleurt het membraan van het inzetstuk geel nadat het testmateriaal is weggewassen. Het is dan ook van essentieel belang om de bindende eigenschappen van de teststof te kennen om het effect van de chemische stof op de cellen te kunnen interpreteren.

Bij het enten van de cellen op de inzetstukken dient een confluente monolaag te ontstaan bij blootstelling aan de chemische stof. Er dienen 1,6 x 10^5 cellen te worden toegevoegd per inzetstuk (400 µl van een celsuspensie met een dichtheid van 4 x 10^5 cellen/ml). In die omstandigheden wordt gewoonlijk na 96 uur in cultuur een confluente monolaag verkregen. De inzetstukken dienen voor het enten visueel te worden gecontroleerd om ervoor te zorgen dat eventuele beschadigingen die bij de in punt 30 beschreven visuele controle worden vastgesteld, te wijten zijn aan de behandeling.

De MDCK-celculturen dienen in incubatoren in een bevochtigde atmosfeer te worden bewaard bij 5 % ± 1 % CO_2 en 37 ± 1 °C. De cellen mogen niet verontreinigd zijn met bacteriën, virussen, mycoplasma of schimmels.

Het aanbrengen van de test- en controlestoffen

Voor elke reeks experimenten dient een verse stamoplossing van de teststof te worden bereid, die binnen 30 minuten na bereiding moet worden gebruikt. De teststoffen dienen te worden bereid in HBSS met calcium (in een concentratie van 1,0-1,8 mM) en zonder fenolrood om serum-eiwitbinding te vermijden. De oplosbaarheid van de chemische stof in HBSS bij 250 mg/ml dient voor het testen te worden beoordeeld. Als de chemische stof bij die concentratie in 30 minuten een stabiele suspensie of emulsie vormt (d.w.z. dat zij haar uniformiteit behoudt en niet bezinkt en zich niet afscheidt in meerdere fasen), kan HBSS nog steeds worden gebruikt als oplosmiddel. Als wordt vastgesteld dat de chemische stof bij deze concentratie niet oplosbaar is in HBSS, moet echter worden overwogen om een andere testmethode dan FL te gebruiken. Het gebruik van lichte minerale olie als oplosmiddel wanneer de chemische stof niet oplosbaar blijkt in HBSS, dient met enige terughoudendheid te worden bekeken, aangezien er onvoldoende gegevens beschikbaar zijn om conclusies te formuleren over de prestaties van de FL-test in zulke omstandigheden.

Alle te testen chemische stoffen worden bereid in steriele HBSS met calcium (in een concentratie van 1,0-1,8 mM) en zonder fenolrood op basis van de stamoplossing, in vijf vaste concentraties die verdund zijn op basis van het gewicht per volume-eenheid: 1, 25, 100, 250 mg/ml en een onverdunde of een verzadigd oplossing. Wanneer een vaste chemische stof wordt getest, dient een erg hoge concentratie van 750 mg/ml te worden opgenomen. Deze concentratie van de chemische stof moet mogelijk op de cellen worden aangebracht met behulp van een plunjerpipet. Als wordt vastgesteld dat de toxiciteit tussen 25 en 100 mg/ml ligt, dienen de volgende bijkomende concentraties in tweevoud te worden getest: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. De FL_{20}-waarde dient te worden afgeleid van die concentraties, voor zover aan de aanvaardbaarheidscriteria is voldaan.

De teststoffen worden op de confluente monolagen van cellen aangebracht na verwijdering van het kweekmedium en nadat de monolagen tweemaal zijn uitgewassen met steriele, warme (37 °C) HBSS met calcium (in een concentratie van 1,0-1,8 mM) zonder fenolrood. De filters zijn vooraf visueel gecontroleerd op bestaande beschadigingen die verkeerdelijk zouden kunnen worden toegeschreven aan mogelijke incompatibiliteit met teststoffen. Er dienen in elke reeks ten minste drie duplo's te worden gebruikt voor elke concentratie van de teststof en

▼M7

voor de controles. Na 1 minuut blootstelling bij kamertemperatuur wordt de teststof zorgvuldig verwijderd door afzuiging, wordt de monolaag twee keer uitgewassen met steriele, warme (37 °C) HBSS met calcium (in een concentratie van 1,0-1,8 mM) zonder fenolrood en wordt de fluoresceïnelekkage onmiddellijk gemeten.

In elke reeks moeten negatieve controles (NC) en positieve controles (PC) worden gebruikt om aan te tonen dat de integriteit van de monolaag (NC) en de gevoeligheid van de cellen (PC) binnen een gedefinieerd historisch aanvaardbaarheidsbereik liggen. Voor de positieve controles wordt voorgesteld om Brij 35 (CAS-nr. 9002-92-0) te gebruiken bij 100 mg/ml. Deze concentratie dient een fluoresceïnelekkage van ongeveer 30 % op te leveren (aanvaardbaar bereik fluoresceïnelekkage 20-40 %, *d.w.z.* schade aan de cellaag). Voor de negatieve controles wordt voorgesteld om HBSS met calcium (in een concentratie van 1,0-1,8 mM) en zonder fenolrood te gebruiken (onbehandeld, blanco controle). In elke reeks dient ook een maximumlekkagecontrole te worden opgenomen om de FL_{20}-waarden te kunnen berekenen. De maximumlekkage wordt bepaald met behulp van een controle-inzetstuk zonder cellen.

Bepaling van de fluoresceïnepermeabiliteit

Onmiddellijk nadat de test- en controlestoffen zijn verwijderd, wordt 400µl 0,1 mg/ml natriumfluoresceïneoplossing (0,01 % (w/v) in HBSS met calcium [in een concentratie van 1,0-1,8 mM] en zonder fenolrood) aan de inzetstukken (bv. Millicell-HA) toegevoegd. De culturen worden gedurende 30 minuten op kamertemperatuur gehouden. Aan het eind van de incubatie met fluoresceïne worden de inzetstukken zorgvuldig uit elke well verwijderd. Elke filter wordt visueel gecontroleerd en eventuele beschadiging die mogelijk is opgetreden tijdens de behandeling, wordt genoteerd.

De hoeveelheid fluoresceïne die door de monolaag en het inzetstuk is gelekt, wordt gemeten in de oplossing die in de wells is achtergebleven nadat de inzetstukken zijn verwijderd. De metingen worden verricht in een spectrofluorimeter bij een excitatie- en emissiegolflengte van respectievelijk 485 nm en 530 nm. De gevoeligheid van de spectrofluorimeter dient zo te worden ingesteld dat het numerieke verschil tussen de maximale FL (inzetstuk zonder cellen) en de minimale FL (inzetstuk met confluente monolaag behandeld met NC) zo groot mogelijk is. Vanwege de verschillen in de gebruikte spectrofluorimeter wordt aanbevolen om een gevoeligheid te hanteren die bij de maximale fluoresceïnelekkagecontrole een fluorescentie-intensiteit van > 4000 geeft. De maximale FL-waarde mag niet meer dan 9999 bedragen. De maximale intensiteit van de fluoresceïnelekkage dient binnen het lineaire bereik van de gebruikte spectrofluorimeter te vallen.

Interpretatie van de resultaten en voorspellingsmodel

De hoeveelheid FL is evenredig aan de door chemische stoffen geïnduceerde schade aan de tight junctions. Het percentage FL voor elke geteste concentratie van de chemische stof wordt berekend op basis van de FL-waarden die voor de teststof werden verkregen, onder verwijzing naar de FL-waarden verkregen uit de NC (waarden afkomstig van de confluente monolaag van cellen die werd behandeld met de NC) en een maximumlekkagecontrole (waarden voor de hoeveelheid FL door een inzetstuk zonder cellen).

De gemiddelde maximale intensiteit van de fluoresceïnelekkage = x

De gemiddelde 0 %-intensiteit van de fluoresceïnelekkage (NC) = y

De gemiddelde 100 %-lekkage wordt verkregen door de gemiddelde 0 %-lekkage af te trekken van de gemiddelde maximale lekkage,

d.w.z. x – y = z

Het percentage lekkage voor elke vaste dosis wordt verkregen door de 0 %-lekkage af te trekken van de gemiddelde fluorescentie-intensiteit van de drie duplometingen (m) en die waarde te delen door de 100 %-lekkage, *d.w.z.* %FL = [(m-y) / z] x 100 %, waarbij:

▼M7

m = de gemiddelde fluorescentie-intensiteit van de drie duplometingen voor de desbetreffende concentratie

% FL = het percentage van het fluoresceïne dat door de cellaag lekt

Om de concentratie van de chemische stof te berekenen die 20 % FL veroorzaakt, dient de volgende vergelijking te worden gebruikt:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

waarbij:

D = % remming

A = % schade (20 % fluoresceïnelekkage)

B = % fluoresceïnelekkage < A

C = % fluoresceïnelekkage > A

M_C = concentratie (mg/ml) van C

M_B = concentratie (mg/ml) van B

Hieronder wordt de drempelwaarde van FL_{20} gegeven om te voorspellen of een stof voor het oog corrosief of hevig irriterend is:

FL_{20} (mg/ml)	VN-GHS C&L	EU-CLP C&L	VS-EPA C&L
≤ 100	Categorie 1	Categorie 1	klasse I

C&L: indeling en etikettering

De FL-testmethode wordt enkel aanbevolen voor de identificatie van in water oplosbare voor het oog corrosieve en hevig irriterende stoffen (VN-GHS-categorie 1, EU-CLP-categorie 1, VS-EPA-klasse I) (zie punten 1 en 10).

Om in water oplosbare chemische stoffen (stoffen en mengsels) (3) (6) (7) in te delen als „stoffen die ernstig oogletsel veroorzaken” (VN-GHS-/EU-CLP-categorie 1) of als „voor het oog corrosieve of hevig irriterende stoffen” (VS-EPA-klasse I), dient de teststof een FL_{20}-waarde van ≤ 100 mg/ml te induceren.

Aanvaarding van de resultaten

De gemiddelde waarde voor de maximale fluoresceïnelekkage (x) dient hoger dan 4 000 te zijn (zie punt 31), de gemiddelde 0 %-lekkage (y) dient gelijk te zijn aan of lager te zijn dan 300 en de gemiddelde 100 %-lekkage (z) dient tussen 3 700 en 6 000 te liggen.

Een test wordt aanvaardbaar geacht als de positieve controle 20 % tot 40 % schade aan de cellaag opleverde (meting als % fluoresceïnelekkage).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Gegevens

Voor elke reeks experimenten moeten de gegevens die voor elke individuele well zijn verkregen (bv. gegevens over de waarden voor de fluorescentie-intensiteit en de berekende percentages FL voor elke teststof, inclusief de classificatie), in tabelvorm worden gerapporteerd. Daarnaast moeten voor elke reeks experimenten gemiddelden ± standaardafwijking van elke individuele meting worden vermeld.

▼M7

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Test- en controlestoffen

— Chemische benaming(en) zoals de gestructureerde benaming gebruikt door de Chemical Abstracts Service (CAS), gevolgd door andere benamingen indien bekend;

— CAS-nummer van de chemische stof, indien bekend;

— Zuiverheid en samenstelling van de stof of het mengsel (in percentage(s) per gewicht) voor zover deze informatie beschikbaar is.

— Fysisch-chemische eigenschappen die relevant zijn voor de uitvoering van het onderzoek (bv. fysische toestand, vluchtigheid, pH, stabiliteit, oplosbaarheid in water, chemische klasse);

— De behandeling van de test-/controlestoffen voorafgaand aan de test, indien van toepassing (bv. verwarmen, fijnmalen);

— Bewaaromstandigheden;

Motivering van de gebruikte testmethode en het gebruikte protocol

— dient overwegingen inzake het toepassingsgebied en de beperkingen van de testmethode te bevatten.

Testomstandigheden

— Een beschrijving van het gebruikte celsysteem, met inbegrip van het certificaat van echtheid en de mycoplasmastatus van de cellijn;

— Gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;

— De gehanteerde concentratie(s) van de teststoffen;

— Duur van de blootstelling aan de teststof;

— Duur van de incubatie met fluoresceïne;

— Een beschrijving van eventuele modificaties van de testprocedure;

— Een beschrijving van de gebruikte beoordelingscriteria;

— Verwijzing naar historische gegevens van het model (bv. negatieve en positieve controles, ijkstoffen, indien van toepassing);

— Informatie over de door het laboratorium aangetoonde technische bekwaamheid;

Resultaten

— Gegevens over individuele teststoffen en controles voor elke reeks experimenten en elke duplometing (met inbegrip van individuele resultaten, gemiddelden en standaardafwijkingen), in tabelvorm;

— De afgeleide indeling(en) met vermelding van het gebruikte voorspellingsmodel en/of de gehanteerde beslissingscriteria;

— Een beschrijving van andere waargenomen effecten;

▼M7

Bespreking van de resultaten

— dient overwegingen ten aanzien van een niet-overtuigend resultaat (punt 35: FL_{20} > 100 mg/ml) en bijkomende tests te bevatten.

Conclusies

LITERATUUR

(1) VN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Beschikbaar op: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

(5) Hoofdstuk B.5 van deze bijlage, *Acute oogirritatie/-corrosie*

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Beschikbaar op: [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.

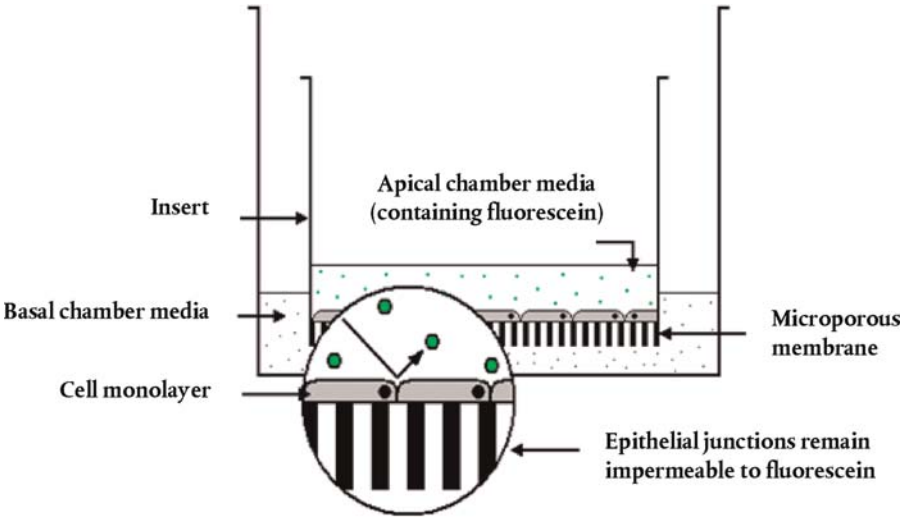
(8) OESO (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment nr. 34. OESO, Parijs.

▼M7

Aanhangsel 1

DIAGRAM VAN OP EEN MEMBRAAN VAN EEN INZETSTUK GEKWEEKTE MDCK-CELLEN VOOR DE FL-TESTMETHODE

Er wordt een confluente laag MDCK-cellen gekweekt op een semipermeabel membraan van een inzetstuk. De inzetstukken worden in de wells van de 24-wells-platen geplaatst.



Figuur overgenomen uit: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Aanhangsel 2

DEFINITIES

Betrouwbaarheid: indicatie van de mate waarin een testmethode, uitgevoerd volgens een vast protocol, op reproduceerbare wijze binnen één laboratorium en tussen laboratoria verspreid over de tijd kan worden uitgevoerd. De betrouwbaarheid wordt beoordeeld door berekening van intra- en interlaboratoriumreproduceerbaarheid en intralaboratoriumherhaalbaarheid.

Bewijskracht(proces): het proces waarbij de sterke en zwakke punten van verschillende gegevens worden onderzocht bij het komen tot en ondersteunen van een conclusie met betrekking tot het gevarenpotentieel van een stof.

Chemische stof: een stof of mengsel.

EPA-klasse I: chemische stoffen die een corrosieve (irreversibele afbraak van oogweefsel) of corneale aandoening of irritatie veroorzaken die gedurende meer dan 21 dagen aanhoudt (2).

Ernstig oogletsel: de veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging.

EU-CLP: **(**Verordening (EG) nr. 1272/2008 betreffende de indeling, etikettering en verpakking van stoffen en mengsels**):** voert in de Europese Unie (EU) het GHS-systeem van de VN uit dat chemicaliën (stoffen en mengsels) indeelt.

FL_{20}: kan worden geraamd door de concentratie te bepalen waarbij de geteste chemische stof 20 % van de fluoresceïnelekkage door de cellaag veroorzaakt.

Fluoresceïnelekkage: de hoeveelheid fluoresceïne die door de cellaag dringt, gemeten met een spectrofluorimeter.

Gevaar: inherente eigenschap van een agens of situatie die nadelige effecten kan veroorzaken als een organisme, systeem of (sub)populatie aan dit agens wordt blootgesteld.

Gevalideerde testmethode: een testmethode waarvoor valideringsstudies werden gedaan om de relevantie (inclusief nauwkeurigheid) en betrouwbaarheid voor een bepaald doel te bepalen. Er dient te worden opgemerkt dat een gevalideerde testmethode niet per definitie voldoende nauwkeurig en betrouwbaar is om aanvaardbaar te worden bevonden voor het voorgestelde doel (8).

Gevoeligheid: het percentage van alle positieve/actieve chemische stoffen dat door middel van de test correct wordt ingedeeld. De gevoeligheid is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categoriale resultaten oplevert en is een belangrijke factor voor de beoordeling van de relevantie van een testmethode (8).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, mondiaal geharmoniseerd classificatie- en etiketteringssysteem voor chemische stoffen van de Verenigde Naties (VN)): een systeem voor de indeling van chemische producten (stoffen en mengsels) op basis van gestandaardiseerde soorten en niveaus van gevaren van fysische aard en gevaren voor de gezondheid en het milieu, en dat de desbetreffende voorlichtingselementen bepaalt, zoals pictogrammen, signaalwoorden, gevarenaanduidingen, voorzorgsmaatregelen en veiligheidsinformatiebladen, waarmee informatie over de schadelijke effecten van de stoffen kenbaar wordt gemaakt teneinde mensen (waaronder werkgevers, werknemers, transporteurs, consumenten en spoedhulpverleners) en het milieu te beschermen.

GHS-klasse 1: veroorzaking van weefselschade aan het oog of ernstige fysische gezichtsvermindering na aanbrenging van een teststof op de voorste ooglaag die niet volledig reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging.

▼M7

Medium-/oplosmiddelcontrole: een onbehandeld monster dat alle componenten bevat van een testsysteem, met inbegrip van het oplosmiddel of medium, dat tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt wordt om de referentierespons voor de monsters die behandeld werden met de in hetzelfde oplosmiddel of medium opgeloste teststof vast te stellen. Als dit monster getest wordt met een tegelijkertijd gemeten negatieve controle, toont het ook aan of het oplosmiddel of medium met het testsysteem interageert.

Mengsel: gebruikt in de context van het VN-GHS voor een mengsel of oplossing bestaande uit meer dan twee stoffen waarin die stoffen niet reageren.

Nauwkeurigheid: de mate van overeenstemming tussen resultaten verkregen met de testmethode en erkende referentiewaarden. Het is een maat voor de prestaties van de testmethode en één aspect van „relevantie". Deze term en de term „concordantie", waaronder het percentage correcte uitkomsten van een testmethode wordt verstaan, worden vaak door elkaar gebruikt.

Negatieve controle: een onbehandeld monster dat alle bestanddelen van een testsysteem bevat. Dit monster wordt tezamen met de met de teststof behandelde monsters en andere controlemonsters verwerkt om te bepalen of het oplosmiddel interageert met het testsysteem.

Niet ingedeeld: chemische stoffen die niet zijn ingedeeld als voor de ogen irriterende stof van VN-GHS-categorie 1, 2A of 2B; EU-CLP-categorie 1 of 2; of VS-EPA-klasse I, II of III.

Percentage vals-negatieve uitslagen: het percentage van alle positieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als negatief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Percentage vals-positieve uitslagen: het percentage van alle negatieve chemische stoffen dat door een testmethode onterecht als positief wordt geïdentificeerd. Het is één indicator van de prestaties van de testmethode.

Positieve controle: een monster met alle bestanddelen van een testsysteem dat met een chemische stof behandeld werd waarvan bekend is dat deze een positieve respons opwekt. Om te verzekeren dat variabiliteit in de positieve-controlerespons doorheen de tijd kan worden beoordeeld, mag de grootte van de positieve respons niet extreem zijn.

Relevantie: beschrijving van het verband van de test met het te onderzoeken effect en of de test betekenis heeft en nuttig is voor een bepaald doel. Het is de mate waarin de test het te onderzoeken biologische effect correct meet of voorspelt. Relevantie omvat een beoordeling van de nauwkeurigheid (concordantie) van een testmethode (8).

Specificiteit: het percentage van alle negatieve/niet-actieve chemische stoffen dat door middel van de test correct wordt ingedeeld. Het is een maat voor de nauwkeurigheid van een testmethode die categorale resultaten oplevert, en is een belangrijke overweging bij de beoordeling van de relevantie van een testmethode.

Stof: gebruikt in de context van het VN-GHS voor een chemisch element en de verbindingen ervan zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de vervaardiging ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het product, en onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd.

Stoffen voor bekwaamheidstoetsing: een subgroep van de lijst van referentiestoffen die een onervaren laboratorium kan gebruiken om aan te tonen dat het

▼M7

bekwaam is om de gevalideerde referentietestmethode toe te passen.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Trapsgewijze teststrategie: een trapsgewijze teststrategie waarbij alle bestaande informatie over een teststof in een bepaalde volgorde wordt herbezien aan de hand van een proces op basis van bewijskracht op elke trap om te bepalen of er voldoende informatie beschikbaar is voor een beslissing tot gevarenclassificatie, vooraleer wordt overgegaan tot de volgende trap. Indien het irritatiepotentieel van een teststof kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan zijn bijkomende tests niet vereist. Indien het irritatiepotentieel van een teststof niet kan worden bepaald op basis van de bestaande informatie, dan wordt een trapsgewijze sequentiële testprocedure op dieren uitgevoerd tot een ondubbelzinnige indeling mogelijk is.

Vervangende test: een test, ontworpen ter vervanging van een voor de identificatie van gevaren en/of risicobeoordeling geaccepteerde en routinematig gebruikte test, waarvan is vastgesteld dat hij, in vergelijking met de geaccepteerde test, de gezondheid van mens of dier of het milieu, naargelang het geval, gelijke of betere bescherming biedt voor alle mogelijke testsituaties en chemische stoffen.

Voor de ogen corrosieve stof: (a) een chemische stof die irreversibele schade aan het oogweefsel veroorzaakt. (b) chemische stoffen die zijn ingedeeld als voor de ogen irriterende stoffen van VN-GHS-categorie 1; EU-CLP-categorie 1; of VS-EPA-klasse I.

Voor de ogen hevig irriterende stof: (a) een chemische stof die na aanbrenging op het voorste oogoppervlak weefselschade aan het oog veroorzaakt die niet reversibel is binnen 21 dagen na de aanbrenging, of die ernstige fysische gezichtsvermindering teweegbrengt; (b) chemische stoffen die zijn ingedeeld als voor de ogen irriterende stoffen van VN-GHS-categorie 1; EU-CLP-categorie 1; of VS-EPA-klasse I.

Voor de ogen irriterende stof: (a) een chemische stof die een reversibele wijziging in het oog teweegbrengt na aanbrenging op het voorste oogoppervlak; (b) chemische stoffen die zijn ingedeeld als voor de ogen irriterende stoffen van VN-GHS-categorie 2A of 2B; EU-CLP-categorie 2; of VS-EPA-klasse II of III.

▼M7

Aanhangsel 3

CHEMISCHE STOFFEN VOOR BEKWAAMHEIDSTOETSING VOOR DE FL-TESTMETHODE

Vooraleer over te gaan tot routinegebruik van deze testmethode, zouden laboratoria de technische bekwaamheid moeten aantonen door een correcte identificatie van de indeling als corrosief voor de ogen van de 8 stoffen die in tabel 1 worden aangeraden. Deze chemische stoffen werden geselecteerd om de mogelijke responsen voor plaatselijke oogirritatie/-corrosie weer te geven, op basis van de resultaten in de in-vivo-oogtest bij konijnen (TG 405, TM B.5(5)) (d.w.z. categorieën 1, 2A, 2B of geen indeling volgens het VN-GHS). Aangezien het nut van de FL-test (d.w.z. uitsluitend voor het oog corrosieve/hevig irriterende stoffen te identificeren) is gevalideerd, zijn er echter slechts twee testresultaten voor indelingsdoeleinden (corrosief/hevig irriterend of niet-corrosief/niet hevig irriterend) waarvoor de bekwaamheid moet worden aangetoond. Andere selectiecriteria waren dat stoffen commercieel beschikbaar zijn, dat er in-vivoreferentiegegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn, en dat er gegevens van zeer goede kwaliteit beschikbaar zijn van de FL-testmethode. Daarom werden de chemische stoffen voor bekwaamheidstoetsing geselecteerd uit het „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing" (8), dat werd gebruikt om de FL-testmethode met terugwerkende kracht te valideren.

Tabel 1

Aanbevolen stoffen voor het aantonen van technische bekwaamheid met FL

Chemische stof	CAS-nr.	Chemische klasse (1)	Fysische vorm	In-vivoclassificatie (2)	In-vitroclassificatie (3)
Benzalkoniumchloride (5 %)	8001-54-5	Onium-verbinding	Vloeistof	Categorie 1	Corrosief/hevig irriterend
Promethazinehydrochloride	58-33-3	Amine/amidine, heterocyclisch, organische zwavelverbinding	Vaste stof	Categorie 1	Corrosief/hevig irriterend
Natriumhydroxide (10 %)	1310-73-2	Alkali	Vloeistof	Categorie 1	Corrosief/hevig irriterend
Natriumlaurylsulfaat (15 %)	151-21-3	Carbonzuur (zout)	Vloeistof	Categorie 1	Corrosief/hevig irriterend
4-Carboxybenzaldehyde	619-66-9	Carbonzuur, aldehyde	Vaste stof	Categorie 2(A)	Niet-corrosief/niet-hevig irriterend
Ammoniumnitraat	6484-52-2	Anorganisch zout	Vaste stof	Categorie 2(A)	Niet-corrosief/niet-hevig irriterend
Ethyl-2-methylaceto-acetaat	609-14-3	Keton, ester	Vloeistof	Categorie 2(B)	Niet-corrosief/niet-hevig irriterend
Glycerol	56-81-5	Alcohol	Vloeistof	Geen categorie	Niet-corrosief/niet-hevig irriterend

Afkortingen: CAS-nummer = registratienummer van de Chemical Abstracts Service.

(1) Scheikundige klassen werden toegekend aan elke teststof aan de hand van een standaard classificatieschema, gebaseerd op het classificatiesysteem National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (beschikbaar op: http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Gebaseerd op de resultaten van de in-vivo-oogtest op konijnen (OESO TG 405, TM B.5) en aan de hand van het VN-GHS en EU-CLP.

(3) Op basis van de resultaten verkregen met FL (INVITTOX-protocol nr. 71(6)).

▼M7

B.62. IN VIVO ALKALISCHE KOMEETTEST BIJ ZOOGDIEREN

INLEIDING

Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 489 (2016) van de OESO. De in vivo alkalische komeettest bij zoogdieren (gelelektroforese op cellen) (hierna verkort „de komeettest" genoemd) wordt gebruikt om breuken in de DNA-strengen te detecteren in cellen of nuclei die zijn afgezonderd uit verschillende dierlijke weefsels, gewoonlijk van knaagdieren, die zijn blootgesteld aan mogelijk genotoxische materialen. De komeettest is geëvalueerd en er zijn aanbevelingen gepubliceerd door verschillende deskundigengroepen (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Deze testmethode maakt deel uit van een reeks methoden om de genotoxiciteit te testen. Er is een OESO-document opgesteld met beknopte informatie over genetisch-toxicologische tests en een overzicht van de recente wijzigingen van deze testrichtlijnen (11).

Deze komeettest is bedoeld om chemische stoffen te identificeren die schade aan het DNA veroorzaken. In alkalische omstandigheden (pH > 13) kan de komeettest zowel enkelstrengige als dubbelstrengige breuken detecteren ten gevolge van, bijvoorbeeld, een directe wisselwerking met het DNA, alkalilabiele plekken of voorbijgaande breuken van DNA-strengen ten gevolge van excisieherstel van het DNA. Deze strengbreuken kunnen worden hersteld, waarbij geen blijvende effecten ontstaan, kunnen letaal zijn voor de cel of kunnen worden vastgezet in een mutatie die tot een blijvende, levensvatbare verandering leidt. Zij kunnen ook aanleiding geven tot chromosoombeschadiging, die eveneens in verband wordt gebracht met talrijke ziekten bij de mens, waaronder kanker.

Tussen 2006-2012 werd een formele validatieproef van de in-vivokomeettest bij knaagdieren uitgevoerd die werd gecoördineerd door het Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), in samenwerking met het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM), het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) en het NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (12). Deze testmethode omvat het aanbevolen gebruik en de beperkingen van de komeettest en is gebaseerd op het definitieve protocol (12) dat werd gebruikt bij de validatieproef en op andere relevante gepubliceerde en niet gepubliceerde gegevens (eigen gegevens van de laboratoria).

De definities van kernbegrippen worden uiteengezet in aanhangsel 1. Voor deze test kunnen heel wat verschillende platforms worden gebruikt (microscoopglaasjes, geldruppels, 96-wells-platen enz.). Gemakshalve wordt in de rest van dit document de term „glaasje" gebruikt, waaronder eveneens alle overige platforms worden begrepen.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

De komeettest is een methode om breuken van DNA-strengen te meten in eukaryotische cellen. Op een glaasje in agarosegel ingebedde cellen/nuclei worden met een detergent en een hoge zoutconcentratie gelyseerd. Bij deze stap wordt het cel- en nucleusmembraan verteerd en komen opgerolde DNA-lussen, ook wel nucleoïden genoemd, en DNA-fragmenten vrij. Elektroforese bij een hoge pH leidt tot structuren die op kometen lijken en die, met behulp van passende fluorescerende kleurstoffen, met een fluorescentiemicroscoop kunnen worden waargenomen. DNA-fragmenten migreren van de „kop" naar de „staart" op basis van hun grootte, en de intensiteit van de staart van de komeet in verhouding tot de totale intensiteit (kop plus staart) weerspiegelt het aantal DNA-breuken (13) (14) (15).

De in vivo alkalische komeettest bij zoogdieren is in het bijzonder relevant om het genotoxische gevaar te beoordelen, aangezien de responsen op de test afhankelijk zijn van de ADME (absorptie, distributie, metabolisme en excretie) in vivo en van de DNA-herstelprocessen. Die kunnen verschillen naargelang van de diersoort, het soort weefsel en het soort DNA-beschadiging.

▼M7

Om aan de voorschriften op het gebied van dierenwelzijn te voldoen, in het bijzonder inzake het beperken van het gebruik van dieren (de beginselen van de drie v's — vervangen, vermijden en verfijnen), kan deze test ook worden gecombineerd met andere toxicologische studies, bv. toxiciteitsonderzoeken met herhaalde toediening (10) (16) (17), of kan het eindpunt worden gecombineerd met andere eindpunten voor genotoxiciteit, zoals in-vivomicronucleustest op erytrocyten bij zoogdieren (18) (19) (20). De komeettest wordt meestal uitgevoerd op knaagdieren, hoewel zij ook al op andere zoogdieren en niet-zoogdieren is toegepast. Het gebruik van andere diersoorten dan knaagdieren dient voor elk afzonderlijk geval wetenschappelijk en ethisch te worden gemotiveerd en het is sterk aanbevolen om de komeettest enkel te verrichten op andere soorten dan knaagdieren als onderdeel van een andere toxiciteitsstudie en niet als op zichzelf staande test.

De keuze voor de blootstellingsroute en de te onderzoeken weefsels dient te worden gebaseerd op alle beschikbare/bestaande kennis over de teststoffen, zoals de beoogde/verwachte blootstellingsroute bij de mens, het metabolisme en de distributie, het potentieel voor effecten op de plek van contact, structurele waarschuwingen, andere gegevens over genotoxiciteit of toxiciteit en het doel van de studie. Waar passend dient het genotoxisch potentieel van de teststoffen daarom te worden beoordeeld in het (de) doelweefsel(s) van kankerverwekkende en/of andere toxische effecten. De test wordt ook geschikt geacht om in vitro gesignaleerde genotoxiciteit nader te onderzoeken. Wanneer redelijkerwijs kan worden verwacht dat een te onderzoeken weefsel op passende wijze kan worden blootgesteld, is het verstandig om een in-vivokomeettest op dat weefsel toe te passen.

De test is het meest uitvoerig gevalideerd voor somatische weefsels van mannetjesratten, in gezamenlijke studies zoals de JaCVAM-proef (12) en in Rothfuss *et al*., 2010 (10). In de internationale valideringsproef van het JaCVAM werden de lever en de maag gebruikt. De keuze viel op de lever, omdat dat het orgaan is dat het actiefst is in het metabolisme van chemische stoffen en vaak ook een doelorgaan is voor carcinogeniteit. De maag werd onderzocht omdat het gewoonlijk de eerste plek van contact is voor chemische stoffen na orale blootstelling, hoewel ook andere delen van het spijsverteringskanaal, zoals de duodenum en de jejunum, kunnen worden beschouwd als weefsels die in contact komen met chemische stoffen en relevanter kunnen zijn voor mensen dan de glandulaire maag van knaagdieren. Er dient voor te worden gezorgd dat zulke weefsels niet overmatig worden blootgesteld aan hoge concentraties van de teststof (21). De techniek kan in principe worden toegepast op elk weefsel waaruit analyseerbare suspensies van afzonderlijke cellen/nuclei kunnen worden afgeleid. Eigen gegevens van verschillende laboratoria geven aan dat de techniek met succes kan worden toegepast op uiteenlopende weefsels, en er zijn talrijke publicaties te vinden waaruit blijkt dat de techniek toepasbaar is op andere organen of weefsels dan de lever of de maag, zoals de jejunum (22), de nieren (23) (24), de huid (25) (26) of de urineblaas (27) (28), de longen of bronchoalveolaire lavagecellen (relevant voor studies naar chemische stoffen die worden ingeademd) (29) (30). Voorts zijn er ook tests verricht op meerdere organen (31) (32).

Hoewel het nuttig kan zijn om de genotoxische effecten op geslachtscellen te onderzoeken, dient te worden opgemerkt dat de standaard alkalische komeettest zoals beschreven in deze testmethode niet geschikt wordt geacht om breuken van DNA-strengen te meten in volwassen geslachtscellen. Aangezien er in een literatuurstudie naar het gebruik van de komeettest om de genotoxiciteit voor geslachtscellen te onderzoeken (33) hoge en variabele achtergrondniveaus voor DNA-beschadiging werden gemeld, zijn er aanpassingen van de protocollen en betere standaardiserings- en valideringsstudies nodig, alvorens de komeettest op volwassen geslachtscellen (zoals spermacellen) in de testmethode kan worden opgenomen. Bovendien is het in deze testmethode beschreven aanbevolen blootstellingsregime niet optimaal en zouden er langere blootstellingstijden of bemonsteringstijden nodig zijn om een zinvolle analyse te kunnen maken van de breuken van DNA-strengen in volwassen sperma. De bij de komeettest gemeten genotoxische effecten in testiculaire cellen in verschillende stadia van de differentiatie zijn beschreven in de literatuur (34) (35). Er zij echter op gewezen dat geslachtsklieren een combinatie van somatische en geslachtscellen bevatten. Daarom wijzen positieve resultaten in de volledige geslachtsklier (testis) niet noodzakelijk op schade aan de geslachtscellen; zij wijzen er echter wel op dat de geteste chemische stof(fen) en/of hun metabolieten tot in de geslachtsklier zijn doorgedrongen.

▼M7

Crosslinks kunnen niet op betrouwbare wijze worden gedetecteerd onder de gebruikelijke experimentele omstandigheden van de komeettest. In bepaalde, aangepaste experimentele omstandigheden kunnen mogelijk crosslinks tussen DNA en DNA en tussen DNA en eiwitten en andere baseveranderingen, zoals geoxideerde basen, worden gedetecteerd (23) (36) (37) (38) (39). Er moet evenwel verder onderzoek worden verricht met het oog op de adequate omschrijving van de nodige aanpassingen van de protocollen. Het detecteren van crosslinkende stoffen is dan ook niet het hoofddoel van de test zoals die hier is beschreven. De test is niet geschikt om aneugenen te detecteren, ongeacht eventuele aanpassingen.

Vanwege de huidige kennisstand gelden er verschillende bijkomende beperkingen (zie aanhangsel 3) voor de in-vivokomeettest. Er wordt verwacht dat de testmethode in de toekomst zal worden geëvalueerd en indien nodig zal worden herzien in het licht van de opgedane ervaring.

Voordat de testmethode wordt gebruikt op een mengsel om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

PRINCIPE VAN DE METHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld. De dosering en bemonstering worden in detail beschreven in de punten 36-40. Op de gekozen bemonsteringstijdstippen worden de te onderzoeken weefsels ontleed en worden suspensies van afzonderlijke cellen/nuclei bereid (er kan een in-situperfusie worden uitgevoerd wanneer dat nuttig wordt geacht, bv. voor de lever), die in zachte agar worden ingebed om te immobiliseren op de glaasjes. De cellen/nuclei worden behandeld met lysis-buffermengsel om het cel- en/of nucleusmembraan te verwijderen en worden blootgesteld aan krachtige alkali, bv. met een pH $\geq$ 13, om het DNA te ontrafelen en ervoor te zorgen dat de losgekomen DNA-lussen en -fragmenten worden vrijgegeven. Het nucleaire DNA in de agar wordt vervolgens onderworpen aan elektroforese. Normaal gezien blijven niet-gefragmenteerde DNA-moleculen in de positie waarin het nucleaire DNA zich bevond in de agar, terwijl gefragmenteerd DNA en losgekomen DNA-lussen naar de anode migreren. Na elektroforese wordt het DNA zichtbaar gemaakt met behulp van een geschikte fluorescente kleurstof. De preparaten dienen te worden geanalyseerd met een microscoop en volledig of halfautomatische beeldanalysesystemen. De mate waarin het DNA tijdens de elektroforese is gemigreerd en de afstand die het daarbij heeft afgelegd, weerspiegelt de hoeveelheid en de grootte van de DNA-fragmenten. De komeettest heeft verschillende eindpunten. Het DNA-gehalte in de staart (% DNA in de staart of % staartintensiteit) werd aanbevolen om de DNA-beschadiging te beoordelen (12) (40) (41) (42). Nadat voldoende nuclei zijn geanalyseerd, worden de gegevens met behulp van passende methoden geanalyseerd om de testresultaten te beoordelen.

Er zij op gewezen dat aanpassing van verschillende aspecten van de methodologie, waaronder de bereiding van de monsters, de elektroforeseomstandigheden, de parameters voor visuele analyse (zoals de intensiteit van de kleurstof, de intensiteit van de microscooplamp en het gebruik van microscoopfilters en cameradynamica), en van de omgevingsomstandigheden (zoals de achtergrondverlichting) is onderzocht en de DNA-migratie kan beïnvloeden (43) (44) (45) (46).

VERIFICATIE VAN DE BEKWAAMHEID VAN LABORATORIA

Elk laboratorium dient de nodige experimentele competentie met de komeettest te ontwikkelen door aan te tonen dat het in staat is om suspensies van afzonderlijke cellen of nuclei van voldoende kwaliteit te verkrijgen voor elk doelweefsel van elke gebruikte soort. De kwaliteit van de preparaten wordt in eerste instantie beoordeeld aan de hand van het % DNA in de staart voor met een medium behandelde dieren die binnen een reproduceerbaar laag bereik vallen. De huidige gegevens suggereren dat het groepsgemiddelde voor het % DNA in de staart (op basis van het gemiddelde van de medianen — zie punt 57 voor meer informatie over deze voorwaarden) in de rattenlever bij voorkeur niet hoger mag zijn dan 6 %, hetgeen zou stroken met de waarden van de JaCVAM-valideringsproef (12) en van andere gepubliceerde en eigen gegevens. Er zijn op dit moment onvoldoende gegevens beschikbaar om aanbevelingen te doen over optimale of aanvaardbare bereiken voor andere weefsels. Dit sluit niet uit dat andere weefsels kunnen worden gebruikt, als dat wordt

▼M7

gemotiveerd. Het testverslag dient een passende beoordeling van de prestaties van de komeettest in die weefsels te bevatten, in verhouding tot de gepubliceerde literatuur of op basis van eigen gegevens. Ten eerste is een laag bereik van % DNA in de staart in controles wenselijk om het bereik voldoende dynamisch te houden om een positief effect te kunnen detecteren. Ten tweede dient elk laboratorium de verwachte responsen voor directe mutagenen en pro-mutagenen te kunnen reproduceren, met verschillende werkwijzen zoals voorgesteld in tabel 1 (punt 29).

In voorkomend geval en mits de nodige motivering kunnen positieve stoffen worden geselecteerd, bijvoorbeeld op basis van de JaCVAM-valideringsproef (12) of van andere gepubliceerde gegevens (zie punt 9), waarbij duidelijke positieve responsen in de te onderzoeken weefsels moeten worden aangetoond. Het vermogen om zwakke effecten van bekende mutagenen, zoals EMS bij lage doses, te detecteren dient eveneens te worden aangetoond, bijvoorbeeld door dosis-responsrelaties vast te stellen met een passend aantal en een passende onderlinge afstand van de doseringen. Er moet in eerste instantie worden getracht om de bekwaamheid aan te tonen voor de vaakst gebruikte weefsels, zoals leverweefsel van knaagdieren, waarvoor vergelijkingen kunnen worden gemaakt met bestaande gegevens en verwachte resultaten (12). Tegelijkertijd kunnen gegevens van andere weefsels zoals de maag/de duodenum/de jejunum, het bloed enz. worden verzameld. Het laboratorium moet zijn bekwaamheid aantonen voor elk afzonderlijk weefsel in elke soort die het wil onderzoeken en moet eveneens aantonen dat er in dat weefsel een aanvaardbare positieve respons kan worden verkregen met een bekend mutageen (zoals EMS).

Er dienen ook gegevens over mediumcontroles/negatieve controles te worden verzameld om de reproduceerbaarheid van negatieve gegevensresponsen aan te tonen en om ervoor te zorgen dat de technische aspecten van de test terdege werden gecontroleerd of om aan te geven dat er mogelijk opnieuw historische controlebereiken moeten worden vastgesteld (zie punt 22).

Er zij op gewezen dat, hoewel er bij de necropsie meerdere weefsels kunnen worden verzameld voor verwerking met het oog op komeetanalyse, het laboratorium bekwaam moet zijn in het oogsten van meerdere weefsels bij één dier, om zo te verzekeren dat potentiële DNA-beschadigingen niet verloren gaan en de komeetanalyse niet in het gedrang komt. De tijd tussen de euthanasie en het verwijderen van de weefsels voor verwerking kan van kritiek belang zijn (zie punt 44).

Bij het ontwikkelen van bekwaamheid in deze test dient aandacht te worden geschonken aan het dierenwelzijn. Daarom kunnen weefsels van in andere tests gebruikte dieren worden gebruikt om competenties op te bouwen in de verschillende aspecten van de test. Voorts hoeft bij het invoeren van een nieuwe testmethode in een laboratorium niet altijd een volledige studie te worden verricht en kunnen er minder dieren of testconcentraties worden gebruikt om de nodige vaardigheden te verwerven.

Controlegegevens uit het verleden

Het laboratorium dient in de loop van het bekwaamheidsonderzoek een historische databank samen te stellen om positieve en negatieve controlebereiken en distributies voor relevante weefsels en soorten vast te stellen. Aanbevelingen voor het samenstellen en gebruiken van de gegevens uit het verleden (zoals criteria voor opname en uitsluiting van gegevens in historische gegevens en aanvaardbaarheidscriteria voor specifieke experimenten) zijn te vinden in de literatuur (47). Verschillende weefsels en verschillende soorten, maar ook verschillende media en toedieningswegen kunnen verschillende negatieve controlewaarden voor het % DNA in de staart geven. Het is daarom belangrijk om voor elk weefsel en voor elke soort negatieve controlebereiken vast te stellen. Laboratoria moeten methoden voor kwaliteitscontrole gebruiken, zoals controlekaarten (bv. C-kaarten of X-kaarten (48)), om vast te stellen hoe variabel

▼M7

hun gegevens zijn en om aan te tonen dat het laboratorium de methodologie 'onder controle' heeft. Ook de keuze van passende positieve controlestoffen, dosisbereiken en experimentele omstandigheden (bv. elektroforeseomstandigheden) moet mogelijk worden geoptimaliseerd om zwakke effecten te kunnen detecteren (zie punt 17).

Bij eventuele wijzigingen in het experimentele protocol moet rekening worden gehouden met hun consistentie met de bestaande databanken met historische controlegegevens van het laboratorium. Eventuele grote inconsistenties moeten leiden tot de oprichting van een nieuwe databank met historische controlegegevens.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Voorbereidingen

Keuze van de diersoort

Gewoonlijk worden gangbare laboratoriumstammen van gezonde, jonge volwassen knaagdieren gebruikt (6-10 weken oud aan het begin van de behandeling, hoewel ook iets oudere dieren kunnen worden gebruikt). De keuze van de knaagdiersoort dient te worden gebaseerd op (i) de soorten die worden gebruikt in andere toxiciteitsstudies (zodat er altijd verbanden kunnen worden gelegd tussen de gegevens en om geïntegreerde studies mogelijk te maken), (ii) de soorten die tumoren ontwikkelden in een carcinogeniteitsstudie (wanneer het mechanisme van carcinogenese werd onderzocht), of (iii) de soorten waarvan het metabolisme het meest relevant is voor de mens, voor zover dat bekend is. Voor deze test worden gewoonlijk ratten gebruikt. Er kunnen evenwel andere soorten worden gebruikt als dat ethisch en wetenschappelijk gemotiveerd wordt.

Huisvestings- en voedingsomstandigheden van de dieren

Voor knaagdieren moet de temperatuur in de proefdierruimte idealiter 22 °C (±3 °C) zijn. De relatieve luchtvochtigheid moet ten minste 30 % en idealiter 50-60 % bedragen en mag, behalve tijdens het schoonmaken van de ruimte, bij voorkeur niet hoger zijn dan 70 %. Er moet gebruik worden gemaakt van kunstlicht met een cyclus van 12 uur licht en 12 uur donker. Als voeding mag het gewone laboratoriumvoer worden gebruikt met een onbeperkte hoeveelheid drinkwater. De keuze van het voer kan worden beïnvloed door de noodzaak om voor een afdoende mengbaarheid met de teststof te zorgen, wanneer de stof via het voer wordt toegediend. De knaagdieren moeten worden gehuisvest in kleine groepen (gewoonlijk niet meer dan vijf) van hetzelfde geslacht indien geen agressief gedrag wordt verwacht. De dieren mogen uitsluitend individueel worden gehuisvest als dat wetenschappelijk gerechtvaardigd is. Waar mogelijk moet worden gebruikgemaakt van vaste vloeren, aangezien gaasvloeren ernstige verwondingen kunnen veroorzaken (49). Er moet worden voorzien in de nodige milieuverrijking.

Voorbereiding van de dieren

De dieren worden willekeurig in de controle- en behandelingsgroepen ingedeeld. De dieren krijgen een unieke identificatie en krijgen voordat de test begint minimaal vijf dagen de tijd om aan de omstandigheden in het laboratorium te wennen. Voor het identificeren van de dieren dient de minst invasieve methode te worden gebruikt. Passende methoden zijn ringen, merken, microchippen en biometrische identificatie. Het afknippen van tenen of oren is in deze test niet wetenschappelijk gerechtvaardigd. De kooien moeten op zodanige wijze worden opgesteld dat eventuele plaatseffecten geminimaliseerd worden. Bij het begin van de studie moet per geslacht het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit niet meer dan ± 20 % bedragen.

Voorbereiding van de doses

Vaste chemische teststoffen moeten worden opgelost of gesuspendeerd in geschikte media of worden vermengd met voedsel of drinkwater voordat dit aan de dieren wordt gegeven. Vloeibare chemische teststoffen kunnen direct worden gegeven of eerst worden verdund. Voor blootstelling via inhalatie kunnen teststoffen worden toegediend als gas, damp of een vaste/vloeibare aerosol, naargelang van de fysisch-chemische eigenschappen ervan (50) (51).

Er dienen verse preparaten van de teststof te worden toegepast, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat bewaren van de preparaten aanvaardbaar is en blijkt wat de juiste bewaaromstandigheden zijn.

▼M7

Testomstandigheden

Medium

Het medium mag bij de gebruikte dosisvolumes geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de chemische teststoffen moeten uitgesloten zijn. Als andere media dan de algemeen bekende worden gebruikt, moet het gebruik ervan worden ondersteund met referentiegegevens die wijzen op de verenigbaarheid ervan wat de proefdieren, de toedieningsweg en het eindpunt betreft. Het wordt aanbevolen waar mogelijk eerst het gebruik van een waterig oplosmiddel/medium te overwegen. Er zij op gewezen dat sommige media (in het bijzonder viskeuze media) ontstekingen kunnen veroorzaken en de achtergrondniveaus van DNA-strengbreuken kunnen verhogen op de plek van contact, in het bijzonder bij herhaaldelijke toediening.

Controles

Positieve controles

Op dit moment in elke test een groep van minimaal 3 analyseerbare dieren van één geslacht, of van elk geslacht als beide worden gebruikt (zie punt 32), te worden opgenomen, die behandeld is met een positieve controlestof. In de toekomst kan mogelijk voldoende bekwaamheid worden aangetoond om de noodzaak van positieve controles te beperken. Als er meerdere bemonsteringstijdstippen worden toegepast (bv. bij een protocol met enkelvoudige toediening) moeten enkel positieve controles worden opgenomen op een van de bemonsteringstijdstippen, maar moet wel voor een evenwichtige opzet worden gezorgd (zie punt 48). Gelijktijdige positieve controlestoffen hoeven niet via dezelfde weg als de teststof te worden toegediend, hoewel het bij het meten van de effecten op de plek van contact belangrijk is om dezelfde weg te gebruiken. Van de positieve controlestoffen dient te zijn aangetoond dat zij breuken van de DNA-strengen induceren in alle weefsels die voor de teststof moeten worden onderzocht. EMS is daarbij waarschijnlijk de positieve controle bij uitstek, omdat deze stof in alle onderzochte weefsels breuken van DNA-strengen heeft veroorzaakt. De doses van de voor positieve controle gebruikte chemische stoffen dienen zodanig te worden gekozen dat matige effecten worden geproduceerd waarmee de prestaties en gevoeligheid van de test kritisch worden beoordeeld en kunnen worden gebaseerd op de dosis-responscurves die het laboratorium heeft vastgesteld tijdens de bekwaamheidstoetsing. Het % DNA in de staart bij dieren die worden gebruikt voor de gelijktijdige positieve controles dient te stroken met het vooraf in het laboratorium vastgestelde bereik voor elk afzonderlijk weefsel en voor elk bemonsteringstijdstip voor die soort (zie punt 16). Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte chemische stoffen en enkele van de doelweefsels ervan (bij knaagdieren) staan vermeld in tabel 1. Er kunnen andere stoffen worden gekozen dan die welke vermeld zijn in tabel 1, voor zover dat wetenschappelijk wordt gemotiveerd.

Tabel 1

Voorbeelden van voor positieve controle gebruikte stoffen en enkele van de doelweefsels ervan

Stoffen en CAS-registratienummers
Ethylmethaansulfonaat (CAS RN 62-50-0) voor elk weefsel
Ethylnitrosoureum (CAS RN 759-73-9) voor lever en maag, duodenum of jejunum
Methylmethaansulfonaat (CAS RN 66-27-3) voor lever, maag, duodenum of jejunum, long- en bronchoalveolaire lavage- (BAL-) cellen, nier, blaas, long, testis en beenmerg/bloed
N-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (CAS RN 70-25-7) voor maag, duodenum of jejunum
1,2-Dimethylhydrazine 2HCl (CAS RN 306-37-6) voor lever en darm
N-methyl-*N*-nitrosoureum (CAS RN 684-93-5) voor lever, beenmerg, bloed, nier, maag, jejunum en hersenen.

▼M7

Negatieve controles

Voor elk bemonsterinsgtijdstip en weefsel dient een groep dieren voor de negatieve controle te worden meegenomen die zijn behandeld met alleen medium en verder op dezelfde wijze zijn behandeld als de behandelingsgroepen. Het percentage DNA in de staart in dieren voor de negatieve controle dient te liggen binnen het vooraf bepaalde achtergrondbereik van het laboratorium voor elk afzonderlijk weefsel en bemonsteringstijdstip voor de betreffende soort (zie punt 16). Bij het ontbreken van historische of gepubliceerde controlegegevens waaruit blijkt dat het gekozen medium, het aantal toedieningen en de toedieningsweg geen schadelijke of genotoxische effecten induceren, dienen voorafgaand aan het volledige onderzoek voorlopige onderzoeken te worden uitgevoerd om vast te stellen dat de mediumcontrole aanvaardbaar is.

PROCEDURE

Aantal en geslacht van de dieren

Hoewel er voor de komeettest weinig gegevens over vrouwtjes beschikbaar zijn op basis waarvan een vergelijking tussen de geslachten kan worden gemaakt, zijn andere in-vivogenotoxiciteitsresponsen voor vrouwtjes en mannetjes in het algemeen gelijk en kunnen de meeste studies dus bij beide geslachten worden uitgevoerd. Gegevens waaruit blijkt dat er relevante verschillen tussen vrouwtjes en mannetjes bestaan (bv. verschillen in systemische toxiciteit, metabolisme, biologische beschikbaarheid enz., met inbegrip van bijvoorbeeld in een bereikbepalingsonderzoek), zijn een aanmoediging om beide geslachten te gebruiken. In dit geval kan het passend zijn om een onderzoek bij beide geslachten uit te voeren, bijvoorbeeld als onderdeel van een toxiciteitsonderzoek bij herhaalde toediening. Het kan passend zijn om een factoriële onderzoeksopzet te gebruiken als beide geslachten worden gebruikt. Details over de wijze waarop de gegevens bij deze onderzoeksopzet moeten worden geanalyseerd, zijn te vinden in aanhangsel 2.

De vaststelling van de groepsgrootte aan het begin van het onderzoek (en tijdens de aantoning van de bekwaamheid) moet erop gericht zijn minimaal 5 analyseerbare dieren van één geslacht, of van elk geslacht als beide worden gebruikt, per groep te krijgen (minder in de gelijktijdige positieve controlegroep — zie punt 29). Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals dit bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd. Als richtsnoer voor de maximale typische behoefte aan dieren: voor een onderzoek uitgevoerd volgens de in punt 33 vastgestelde parameters met drie dosisgroepen en parallelle negatieve en positieve controlegroepen (elke groep bestaande uit vijf dieren van één geslacht) zijn 25 tot 35 dieren nodig.

BEHANDELINGSSCHEMA

Dieren moeten gedurende een periode van 2 of meer dagen dagelijkse behandelingen krijgen (d.w.z. twee of meer behandelingen met een interval van ongeveer 24 uur), en monsters moeten eenmalig 2-6 uur (of op T_{max}) na de laatste behandeling worden verzameld (12). Monsters van verlengde doseringsschema's (bv. dagelijkse dosistoediening gedurende 28 dagen) zijn aanvaardbaar. Er is aangetoond dat de komeettest en de micronucleustest bij erytrocyten succesvol kunnen worden gecombineerd (10) (19). Er moet echter zorgvuldig rekening worden gehouden met de logistiek die komt kijken bij de bemonstering van weefsel voor de komeetanalyse naast de vereisten voor de bemonstering van weefsel voor andere typen toxicologische beoordelingen. Oogsten 24 uur na de laatste dosistoediening, wat typisch is voor een algemeen toxiciteitsonderzoek, is in de meeste gevallen niet passend (zie punt 40 over bemonsteringstijdstippen). Het gebruik van andere behandelings- en bemonsteringsschema's moet worden gemotiveerd (zie aanhangsel 3). Er kan bijvoorbeeld één behandeling met meerdere bemonsteringen worden gebruikt; er zij echter opgemerkt dat voor een studie met één toediening meer dieren nodig zullen zijn, omdat meerdere bemonsteringstijdstippen nodig zullen zijn, maar dit kan bij gelegenheid toch de voorkeur genieten, bijvoorbeeld wanneer de teststof na herhaalde toedieningen excessieve toxiciteit veroorzaakt.

▼M7

Ongeacht de wijze waarop de test wordt uitgevoerd, is de test aanvaardbaar zolang de teststof leidt tot een positieve respons of, voor een negatieve studie, zolang als er direct of indirect bewijs is van blootstelling van, of toxiciteit voor, het doelweefsel of als de limietdosis is bereikt (zie punt 36).

De doses van de teststoffen kunnen eventueel worden gesplitst (bv. twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan 2-3 uur) om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. In deze omstandigheden moet het bemonsteringstijdstip worden gepland op basis van het tijdstip van de laatste dosistoediening (zie punt 40).

Dosisniveaus

Als er een bereikbepalingsonderzoek wordt uitgevoerd omdat er uit andere relevante onderzoeken geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek en volgens de huidige benaderingen voor het uitvoeren van doseringsbereikstudies. Het onderzoek moet erop gericht zijn de maximaal verdraagbare dosis (maximum tolerated dose, MTD) vast te stellen, dat wil zeggen, de dosis die lichte toxische effecten induceert, in verhouding tot de duur van de onderzoeksperiode (bijvoorbeeld duidelijke klinische tekenen zoals afwijkend gedrag of afwijkende reacties, licht gewichtsverlies of cytotoxiciteit voor het doelweefsel), maar geen dood of aanwijzingen voor pijn, lijden of nood die humane doding noodzakelijk maken. Voor een niet-toxische teststof met een toedieningsperiode van 14 dagen of meer is de maximale (limiet)dosis 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag. Voor een toedieningsperiode van minder dan 14 dagen is de maximale (limiet)dosis 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag. Voor bepaalde typen teststoffen (bv. geneesmiddelen voor menselijk gebruik) waarvoor specifieke voorschriften gelden, kunnen deze limieten verschillen.

Chemische stoffen die verzadiging van toxicokinetische eigenschappen vertonen, of detoxificatieprocessen induceren die kunnen leiden tot een afname van de blootstelling na langlopende toediening, kunnen uitzonderingen zijn op de doseringscriteria en moeten per geval worden beoordeeld.

Voor zowel de acute als de sub-acute versie van de komeettest moet naast de maximale dosis (MTD, maximaal haalbare dosis, maximale blootstelling of limietdosis) een aflopende reeks van ten minste twee aanvullende dosisniveaus die niet te ver uit elkaar liggen (bij voorkeur minder dan 10) worden gekozen voor elk bemonsteringstijdstip om doseringsgerelateerde responsen aan te tonen. De gebruikte dosisniveaus moeten bij voorkeur echter ook een bereik dekken van maximale tot weinig of geen toxiciteit. Wanneer toxiciteit voor het doelweefsel bij alle geteste dosisniveaus wordt waargenomen, wordt verder onderzoek bij niet-toxische doses aanbevolen (zie punten 54-55). Voor onderzoek dat ten doel heeft de vorm van de dosisresponscurve vollediger te onderzoeken, kunnen een of meer aanvullende dosisgroepen nodig zijn.

Toediening van de doses

Bij de opzet van een test moet rekening worden gehouden met de verwachte blootstellingsroute bij mensen. Daarom kunnen andere blootstellingsroutes zoals voeding, drinkwater, lokaal, subcutaan, intraveneus, oraal (via sonde), inhalatie, intratracheaal of implantatie worden gekozen, als deze onderbouwd worden. De route moet in elk geval zodanig worden gekozen dat adequate blootstelling van het (de) doelweefsel(s) is gewaarborgd. Intraperitoneale injectie wordt in het algemeen niet aanbevolen, omdat zij bij mensen geen typische relevante blootstellingsroute is, en zij mag uitsluitend worden toegepast met een specifieke motivering (bv. sommige stoffen voor positieve controles, voor onderzoeksdoeleinden of voor sommige geneesmiddelen die intraperitoneaal worden toegediend).

▼M7

Het maximale vloeistofvolume dat via sonde of injectie per keer kan worden toegediend, hangt af van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 1 ml/100 g lichaamsgewicht, behalve wanneer het om een waterige oplossing gaat: in dat geval mag 2 ml/100 g lichaamsgewicht worden gebruikt. Hogere volumes dan dit (mits toegestaan volgens wetgeving inzake dierenwelzijn) moeten worden onderbouwd. Indien mogelijk moeten verschillende dosisniveaus worden bereikt door de concentratie van de doseringsformule aan te passen, zodat er op alle dosisniveaus hetzelfde volume in verhouding tot het lichaamsgewicht wordt toegediend.

Bemonsteringstijdstip

Het bemonsteringstijdstip is een kritische variabele: het wordt bepaald door de tijd die nodig is om de teststoffen de maximale concentratie in het doelweefsel te laten bereiken en om breuken in DNA-strengen te induceren, maar zo dat deze breuken nog niet zijn verwijderd of gerepareerd en niet leiden tot celdood. De persistentie van sommige laesies die leiden tot de in de komeettest gedetecteerde breuken in DNA-strengen, kan voor sommige in vitro geteste chemische stoffen heel kort zijn (52) (53). Als dergelijke tijdelijke DNA-laesies worden vermoed, moeten dus maatregelen worden genomen om de verwijdering ervan te verminderen door ervoor te zorgen dat weefsels vroeg genoeg worden bemonsterd, mogelijk vóór de hieronder vermelde standaardtijdstippen. De optimale bemonsteringstijdstippen kunnen afhangen van de chemische stof of de toedieningsweg en kunnen leiden tot bijvoorbeeld snelle blootstelling van weefsel bij intraveneuze toediening of blootstelling via inhalatie. Indien beschikbaar, moeten de bemonsteringstijdstippen bijgevolg worden bepaald op basis van kinetische gegevens (bv. het tijdstip (T_{max}) waarop de piek-plasmaconcentratie of piek-weefselconcentratie (C_{max}) wordt bereikt, of op de stationaire toestand bij meerdere toedieningen). Indien kinetische gegevens niet beschikbaar zijn, kunnen de monsters bij wijze van geschikt compromis voor de meting van genotoxiciteit 2-6 uur na de laatste behandeling bij twee of meer behandelingen worden genomen, of zowel 2-6 uur als 16-26 uur na één behandeling, hoewel ervoor moet worden gezorgd dat necropsie bij alle dieren op hetzelfde tijdstip na de laatste (of enige) dosis plaatsvindt. Ook informatie over het optreden van toxische effecten in doelorganen (indien beschikbaar) kan worden gebruikt om geschikte bemonsteringstijdstippen te kiezen.

Observaties

Algemene klinische waarnemingen verband houdend met de gezondheid van de dieren moeten ten minste eenmaal per dag plaatsvinden en worden opgetekend, bij voorkeur steeds op hetzelfde tijdstip en met inachtneming van de piekperiode van de te verwachten effecten na toediening (54). Alle dieren moeten ten minste tweemaal per dag worden geobserveerd op ziekteverschijnselen en sterfte. Voor onderzoeken van langere duur moeten alle dieren ten minste eenmaal per week en bij afloop van de testperiode worden gewogen. Het voedselverbruik wordt bij elke wijziging in het voer en ten minste wekelijks gemeten. Als de teststof met het drinkwater wordt toegediend, moet het waterverbruik bij elke verversing van water en ten minste wekelijks worden gemeten. Dieren die niet-letale indicatoren van excessieve toxiciteit vertonen, moeten voor afloop van de testperiode worden gedood en ze worden gewoonlijk niet gebruikt voor de komeetanalyse.

Weefselverzameling

Omdat inductie van breuken in DNA-strengen (kometen) in bijna alle weefsels onderzocht kan worden, moet de selectie van het (de) te verzamelen weefsel(s) duidelijk worden onderbouwd en worden gebaseerd op de reden voor uitvoering van het onderzoek en eventuele bestaande gegevens over ADME, genotoxiciteit, carcinogeniteit of andere toxiciteit voor de onderzochte teststoffen. Belangrijke factoren waarmee rekening moet worden gehouden, zijn de toedieningsweg (op basis van de waarschijnlijke blootstelling bij mensen), de voorspelde weefseldistributie en -absorptie, de rol van metabolisme en het mogelijke werkingsmechanisme van de teststoffen. De lever is het weefsel dat het vaakst is onderzocht en waarvoor de meeste gegevens beschikbaar zijn. Indien geen achtergrondinformatie beschikbaar is, en als er geen specifieke weefsels van belang zijn geïdentificeerd, is bemonstering van de lever gerechtvaardigd, aangezien de lever een primaire plaats van het xenobiotisch metabolisme is en vaak sterk

▼M7

blootstaat aan zowel de oorspronkelijke stof(fen) als de metaboliet(en) daarvan. In sommige gevallen kan onderzoek van een plaats van direct contact heel belangrijk zijn (bijvoorbeeld de glandulaire maag, of duodenum/jejunum, voor chemische stoffen die oraal worden toegediend, of de longen voor chemische stoffen die worden geïnhaleerd). Aanvullende of alternatieve weefsels moeten worden geselecteerd op basis van de specifieke redenen waarom de test wordt uitgevoerd; het kan nuttig zijn meerdere weefsels in dezelfde dieren te onderzoeken, mits het laboratorium bekwaamheid met deze weefsels en met het gelijktijdig hanteren van meerdere weefsels heeft aangetoond.

Bereiding van de monsters

Voor de in de volgende punten (44-49) beschreven processen is het belangrijk dat alle oplossingen of stabiele suspensies vóór hun uiterste gebruiksdatum worden gebruikt, of vers worden bereid indien nodig. In de volgende punten worden de tijden die worden genomen (i) om elk weefsel na necropsie te verwijderen, (ii) elk weefsel te verwerken tot cel-/nuclei-suspensies, en (iii) de suspensie te verwerken en de objectglaasjes te prepareren, ook allemaal als kritische variabelen beschouwd (zie aanhangsel 1, Definities en eenheden), en bij de vaststelling van de methode en het aantonen van de bekwaamheid moeten voor elke stap tijden van aanvaardbare lengte worden vastgesteld.

De dieren worden gedood op een wijze die in overeenstemming is met de geldende wetgeving inzake dierenwelzijn en de beginselen van de 3 V's (vervanging, vermindering en verfijning), op het (de) toepasselijke tijdstip(pen) na de laatste behandeling met een teststof. Het geselecteerde weefsel wordt verwijderd en in stukken gesneden, en een deel ervan wordt verzameld voor de komeettest, terwijl tegelijkertijd een gedeelte van hetzelfde deel van het weefsel moet worden uitgesneden en voor mogelijke histopathologische analyse (zie punt 55) volgens de standaardmethoden in een formaldehydeoplossing of in een geschikte fixeerstof moet worden geplaatst (12). Het weefsel voor de komeettest wordt in een maalbuffer geplaatst, voldoende uitgewassen met koude maalbuffer om resterend bloed te verwijderen, en in ijskoude maalbuffer bewaard totdat het wordt verwerkt. In-situ perfusie kan ook worden uitgevoerd, bv. voor lever of nier.

In publicaties zijn allerlei methoden voor het isoleren van cellen/nuclei beschreven. Enkele daarvan zijn het fijnmalen van weefsel zoals lever en nier, het schrapen van oppervlakken van slijmvliezen in geval van het maag-darmkanaal, homogenisering en enzymatische vertering. In de valideringsstudie van het JaCVAM werden uitsluitend losse cellen onderzocht, en daarom wordt de voorkeur gegeven aan losse cellen waar het gaat om het vaststellen van de methode en om voor het aantonen van bekwaamheid naar de onderzoeksgegevens van het JaCVAM te kunnen verwijzen. Er is echter aangetoond dat het testresultaat bij gebruik van losse cellen niet essentieel verschilt van dat bij gebruik van losse nuclei (8). Ook verschillende methoden om cellen/nuclei te isoleren (d.w.z homogenisering, fijnhakken, enzymatische vertering en filtering door gaas) gaven vergelijkbare resultaten (55). Zowel geïsoleerde cellen als geïsoleerde nuclei kunnen dus worden gebruikt. Een laboratorium moet weefselspecifieke methoden voor het isoleren van afzonderlijke cellen/nuclei grondig evalueren en valideren. Zoals in punt 40 is besproken, kan de persistentie van sommige laesies die leiden tot de door de komeettest gedetecteerde breuken in DNA-strengen, heel kort zijn (52) (53). Ongeacht de methode die wordt gebruikt voor het bereiden van de cel/nuclei-suspensies, is het dus belangrijk dat weefsels zo spoedig mogelijk na doding van de dieren worden verwerkt en worden bewaard onder omstandigheden die de verwijdering van laesies verminderen (bv. door het weefsel op een lage temperatuur te houden). De celsuspensies moeten ijskoud worden bewaard tot ze gereed zijn voor gebruik, zodat kan worden aangetoond dat de variatie tussen monsters minimaal is en de positieve en negatieve controleresponsen geschikt zijn.

▼M7

BEREIDING VAN DE OBJECTGLAASJES

De objectglaasjes dienen zo spoedig mogelijk (idealiter binnen één uur) na de bereiding van het cel/nuclei-preparaat te worden bereid, maar de temperatuur en de tijd tussen de dood van de dieren en de bereiding van de objectglaasjes dient streng te worden gecontroleerd en gevalideerd onder de omstandigheden in het laboratorium. Het volume van de celsuspensie die voor het prepareren van de objectglaasjes wordt toegevoegd aan agarose met een laag smeltpunt (gewoonlijk 0,5-1,0 %), moet zo zijn dat het percentage agarose met laag smeltpunt niet tot onder de 0,45 % daalt. De optimale celdichtheid wordt bepaald door het beeldanalysesysteem dat voor het scoren van de kometen wordt gebruikt.

Lysis

De lysisomstandigheden zijn ook een kritische variabele en kunnen als gevolg van specifieke typen modificaties in het DNA (bepaalde alkyleringen van DNA en base-adducten) interfereren met strengbreuken. Het wordt daarom aanbevolen de lysisomstandigheden voor alle objectglaasjes in een experiment zo constant mogelijk te houden. Wanneer de objectglaasjes eenmaal zijn bereid, moeten ze gedurende ten minste één uur (of een nacht) worden ondergedompeld in gekoelde lysisoplossing bij ongeveer 2-8 °C bij getemperde lichtomstandigheden, bijvoorbeeld geel licht (of lichtdicht), die blootstelling aan wit licht dat UV-componenten kan bevatten vermijden. Na deze incubatieperiode worden de objectglaasjes gewassen om vóór de alkalische ontwindingsstap resten detergent en zouten te verwijderen. Dit kan worden gedaan met behulp van gezuiverd water, neutralisatiebuffer of fosfaatbuffer. Elektroforesebuffer kan ook worden gebruikt. Dit houdt de alkalische omstandigheden in de elektroforesekamer in stand.

Ontwinding en elektroforese

De objectglaasjes dienen willekeurig te worden geplaatst op het platform van een elektroforeseapparaat van het type submarine dat zoveel elektroforeseoplossing bevat dat de oppervlakken van de objectglaasjes volledig worden bedekt (de diepte van de bedekking moet van run tot run gelijk zijn). In een ander type elektroforeseapparaten voor komeettests, d.w.z. met actieve koeling, circulatie en stroomvoorziening met een hoge capaciteit, zal een dikkere laag oplossing leiden tot hogere elektrische stromen bij gelijk voltage. Er moet voor het plaatsen van de objectglaasjes in de elektroforesetank een gebalanceerde opzet worden gebruikt, om de effecten van eventuele trends of randeffecten binnen de tank te verminderen en de variabiliteit tussen batches zo klein mogelijk te maken, d.w.z. in elke elektroforeserun dient het aantal objectglaasjes van elk dier in het onderzoek hetzelfde te zijn en dienen monsters uit de verschillende dosisgroepen, negatieve en positieve controles te worden opgenomen. De objectglaasjes moeten ten minste 20 minuten de gelegenheid krijgen om te rusten zodat het DNA kan ontwinden, en vervolgens worden onderworpen aan elektroforese onder gecontroleerde omstandigheden die de gevoeligheid en het dynamisch bereik van de test maximaliseren (d.w.z. voor negatieve en positieve controles leiden tot aanvaardbare niveaus voor het % DNA in de staart die de gevoeligheid maximaliseren). Het niveau van de DNA-migratie hangt lineair samen met de duur van de elektroforese en ook met de potentiaal (V/cm). Op basis van het JaCVAM-onderzoek kan dit 0,7 V/cm gedurende ten minste 20 minuten zijn. De duur van de elektroforese wordt als kritische variabele beschouwd, en de elektroforeseduur moet zo worden ingesteld dat het dynamisch bereik optimaal is. Langere elektroforesetijden (bv. 30 of 40 minuten om maximale gevoeligheid te verkrijgen) leiden gewoonlijk tot sterkere positieve responsen voor bekende mutagenen. Langere elektroforesetijden kunnen echter ook tot excessieve migratie in controlemonsters leiden. In elk experiment moet het voltage constant worden gehouden en de variabiliteit in de andere parameters moet binnen een smalle en voorgeschreven band liggen; in het JaCVAM-onderzoek leverde 0,7 V/cm bijvoorbeeld een beginstroom van 300 mA op. De diepte van de bufferlaag moet worden aangepast om de vereiste omstandigheden te verkrijgen en moet gedurende het hele experiment in stand worden gehouden. De stroom aan het begin en

▼M7

aan het einde van de elektroforeseperiode moet worden opgetekend. De optimale omstandigheden moeten daarom worden bepaald tijdens de initiële aantoning van bekwaamheid in het laboratorium dat betrokken is bij elk onderzocht weefsel. De temperatuur van de elektroforeseoplossing doorheen de ontwinding en elektroforese moet laag worden gehouden, gewoonlijk 2-10 °C (10). De temperatuur van de elektroforeseoplossing aan het begin van de ontwinding, het begin van de elektroforese en het einde van de elektroforese moet worden opgetekend.

Na voltooiing van de elektroforese worden de objectglaasjes gedurende ten minste 5 minuten ondergedompeld/gewassen in de neutralisatiebuffer. Gels kunnen worden gekleurd en „vers" worden gescoord (bv. binnen 1-2 dagen) of kunnen worden gedehydrateerd voor latere scoring (bv. binnen 1-2 weken na kleuring) (56). De omstandigheden moeten echter tijdens de aantoning van bekwaamheid worden gevalideerd, en voor elk van deze omstandigheden moeten historische gegevens worden verkregen en bewaard. In het laatstgenoemde geval moeten de objectglaasjes worden gedehydrateerd door ze gedurende ten minste 5 minuten onder te dompelen in absolute ethanol, worden gedroogd aan de lucht en vervolgens bij kamertemperatuur of in een houder in een koelkast worden opgeslagen totdat ze worden gescoord.

Metingsmethoden

Kometen moeten kwantitatief worden gescoord met behulp van een automatisch of halfautomatisch beeldanalysesysteem. De objectglaasjes worden gekleurd met een geschikte fluorescerende kleurstof zoals SYBR Gold, Green I, propidiumjodide of ethidiumbromide, en worden gemeten bij een geschikte vergroting (bv. 200x) op een epifluorescentiemicroscoop met passende detectoren of een digitale (bv. CCD-) camera.

Cellen kunnen worden geclassificeerd in drie categorieën, zoals is beschreven in de atlas van afbeeldingen van kometen (57), te weten, scoorbaar, niet-scoorbaar en „hedgehog" (zie punt 56 voor een nadere bespreking). Om artefacten te voorkomen, moet alleen voor scoorbare cellen (duidelijk afgebakende kop en staart zonder interferentie met omliggende cellen) het % DNA in de staart worden gescoord. De frequentie niet-scoorbare cellen hoeft niet te worden gerapporteerd. Omdat „hedgehogs" door het ontbreken van een duidelijk afgebakende kop niet gemakkelijk te detecteren zijn door middel van beeldanalyse, moet hun frequentie worden bepaald op basis van de visuele scoring van ten minste 150 cellen per monster (zie punt 56 voor een nadere bespreking) en apart worden gedocumenteerd.

Alle objectglaasjes voor de analyse, ook die van de positieve en negatieve controles, worden onafhankelijk gecodeerd en „blind" gescoord, zodat de scorer de behandelingssituatie niet kent. Voor elk monster (per weefsel per dier) worden ten minste 150 cellen („hedgehogs" niet inbegrepen — zie punt 56) worden geanalyseerd. Het scoren van 150 cellen per dier in ten minste 5 dieren per dosis (minder in de gelijktijdige positieve controle — zie punt 29) geeft volgens de analyse van Smith *et al*., 2008 (5) een voldoende statistisch onderscheidingsvermogen. Als er objectglaasjes worden gebruikt, kan dit worden gedaan door 2 of 3 objectglaasjes per monster te scoren wanneer vijf dieren per groep worden gebruikt. Er moeten meerdere gebieden van het objectglaasje worden geobserveerd bij een dichtheid die verzekert dat er geen sprake is van overlappende staarten. Scoring aan de rand van de objectglaasjes moet worden vermeden.

Breuken in DNA-strengen in de komeettest kunnen worden gemeten door onafhankelijke eindpunten zoals het % DNA in de staart, de staartlengte en het staartmoment. Alle drie de metingen kunnen worden verricht als het juiste softwarematige beeldanalysesysteem wordt gebruikt. Het % DNA in de staart (ook bekend als % staartintensiteit) wordt aanbevolen voor de beoordeling en interpretatie van resultaten (12) (40) (41) (42) en is gelijk aan de DNA-fragmentintensiteit in de staart als percentage van de totale intensiteit van de cel (13).

▼M7

Weefselschade en cytotoxiciteit

Positieve bevindingen in de komeettest zijn mogelijk niet uitsluitend te wijten aan genotoxiciteit, omdat toxiciteit voor het doelweefsel ook kan leiden tot een toename van de migratie van DNA (12) (41). Omgekeerd wordt vaak een lage tot matige cytotoxiciteit waargenomen bij bekende genotoxische stoffen (12), hetgeen laat zien dat het niet mogelijk is om enkel op basis van de komeettest DNA-migratie veroorzaakt door genotoxiciteit te onderscheiden van DNA-migratie veroorzaakt door cytotoxiciteit. Wanneer echter een toename van DNA-migratie wordt waargenomen, wordt aanbevolen een onderzoek van een of meer indicatoren van cytotoxiciteit uit te voeren, omdat dit kan helpen bij de interpretatie van de bevindingen. Een toename van de migratie van DNA met duidelijk bewijs van cytotoxiciteit moet met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd.

Er zijn veel maten voor cytotoxiciteit voorgesteld. Daarvan worden histopathologische wijzigingen geacht een relevante maat voor weefseltoxiciteit te zijn. Waarnemingen zoals ontsteking, celinfiltratie, apoptotische of necrotische wijzigingen worden in verband gebracht met toenamen van DNA-migratie, maar er is, zoals de valideringsstudie van het JaCVAM (12) heeft aangetoond, geen definitieve lijst van histopathologische wijzigingen die altijd verbonden zijn aan toegenomen DNA-migratie. Wijzigingen in klinisch-chemische maten (bv. AST, ALT) kunnen ook bruikbare informatie over weefselschade verschaffen, en ook aanvullende indicatoren zoals caspase-activering, TUNEL-kleuring, annexine V-kleuring enz. kunnen in aanmerking worden genomen. Er zijn echter slechts beperkte gepubliceerde gegevens beschikbaar waarin de laatstgenoemde zijn gebruikt voor in-vivostudies, en ze zijn mogelijk niet allemaal even betrouwbaar.

„Hedgehogs” (of wolken, spookcellen) zijn cellen die een microscoopbeeld laten zien dat bestaat uit een kleine of niet-bestaande kop en een grote diffuse staart, en die als zwaar beschadigde cellen worden beschouwd, hoewel de etiologie van de „hedgehogs” onzeker is (zie aanhangsel 3). Door het uiterlijk van „hedgehogs” zijn metingen van het % DNA in de staart door middel van beeldanalyse onbetrouwbaar, en daarom moeten „hedgehogs” apart worden beoordeeld. Het optreden van „hedgehogs” dient te worden opgetekend en gerapporteerd en elke relevante toename waarvan wordt gedacht dat zij te wijten is aan de teststof, moet worden onderzocht en zorgvuldig worden geïnterpreteerd. Kennis van het potentiële werkingsmechanisme van de teststoffen kan bij deze overwegingen helpen.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

De experimentele eenheid is het dier en daarom moeten in tabelvorm zowel gegevens van de afzonderlijke dieren als samengevatte gegevens worden gepresenteerd. Vanwege het hiërarchische karakter van de gegevens wordt aanbevolen het mediane % DNA in de staart voor elk objectglaasje te bepalen en het gemiddelde van de mediane waarden voor elk dier te berekenen (12). Vervolgens wordt het gemiddelde van de gemiddelden voor de afzonderlijke dieren bepaald om een groepsgemiddelde te krijgen. Al deze waarden dienen in het verslag te worden opgenomen. Alternatieve benaderingen (zie punt 53) mogen worden gebruikt als ze wetenschappelijk en statistisch gerechtvaardigd zijn. De statistische analyse kan geschieden met behulp van een verscheidenheid aan benaderingen (58) (59) (60) (61). Bij de keuze van de statistische methoden die zullen worden gebruikt, moet rekening worden gehouden met de noodzaak van transformatie (bv. log of vierkantswortel) van de gegevens en/of optelling van een kleine getal (bv. 0,001) bij alle waarden (ook waarden ongelijk aan nul) om de effecten van nulwaarden voor cellen te verminderen, zoals besproken in de hierboven vermelde referenties. Gedetailleerde informatie over de analyse van interacties tussen behandeling en geslacht bij gebruik van beide geslachten en de daaropvolgende gegevensanalyse, waarbij ofwel verschillen ofwel geen verschillen worden gevonden, is opgenomen in aanhangsel 2. Gegevens over de toxiciteit en klinische tekenen moeten eveneens worden gemeld.

Aanvaardbaarheidscriteria

Aanvaarding van een test geschiedt aan de hand van de volgende criteria:

a. Toevoeging van de gelijktijdige negatieve controle aan de databank met historische negatieve controlegegevens van het laboratorium zoals beschreven in punt 16 wordt aanvaardbaar geacht.

▼M7

b. Gelijktijdige positieve controles (zie punt 29) moeten reacties induceren die verenigbaar zijn met de reacties in de databank met historische positieve controlegegevens en moeten een statistisch significante toename opleveren vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle.

c. Er zijn voldoende aantallen cellen en doses geanalyseerd (punten 52 en 36-38).

d. De criteria voor de selectie van de hoogste dosis zijn consistent met de criteria beschreven in de punt 36.

Beoordeling en interpretatie van resultaten

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk positief beschouwd als:

a. minstens één van de testdoses een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b. de toename dosisgerelateerd is bij evaluatie met een geschikte trendtoets,

c. een of meer van de resultaten buiten de verdeling van de historische negatieve controlegegevens voor een gegeven soort, medium, route, weefsel en aantal toedieningen vallen.

Wanneer aan al deze criteria is voldaan, wordt de teststof in staat geacht in de onderzochte weefsels in dit testsysteem DNA-strengbreuken te veroorzaken. Zie punt 62 als slechts aan een of twee van deze criteria is voldaan.

Indien aan alle aanvaardbaarheidscriteria is voldaan, wordt een teststof als duidelijk negatief beschouwd als:

a. geen van de testconcentraties een statistisch significante toename vertoont vergeleken met de gelijktijdige negatieve controle,

b. er geen concentratiegerelateerde toename is bij evaluatie met een geschikte trendtoets,

c. alle resultaten binnen de verdeling van de historische negatieve controlegegevens voor een gegeven soort, medium, route, weefsel en aantal toedieningen vallen,

d. er direct of indirect bewijs is geleverd van blootstelling van, of toxiciteit voor, het (de) doelweefsel(s).

De teststof wordt dan niet in staat geacht in de onderzochte weefsels in dit testsysteem DNA-strengbreuken te veroorzaken.

Een duidelijk positieve of negatieve reactie behoeft niet te worden bevestigd.

Indien de reactie noch duidelijk negatief noch duidelijk positief is (d.w.z. er is niet voldaan aan alle in punt 59 of punt 60 genoemde criteria) en om de biologische relevantie van een resultaat te helpen vaststellen, moeten de gegevens door een deskundige worden beoordeeld en/of moet nader onderzoek worden verricht, indien wetenschappelijk gerechtvaardigd. Het scoren van aanvullende cellen (indien van toepassing) of het uitvoeren van een herhalingsexperiment onder mogelijk geoptimaliseerde experimentele omstandigheden (bv. dosisintervallen, andere toedieningswegen, andere bemonsteringstijdstippen of andere weefsels) kan nuttig zijn.

In zeldzame gevallen zal op basis van de gegevens, zelfs na nader onderzoek, niet kunnen worden geconcludeerd dat de resultaten positief of negatief zijn, en zullen ze daarom als moeilijk te interpreteren worden beschouwd.

▼M7

Om de biologische relevantie van een positief of moeilijk te interpreteren resultaat te beoordelen, is informatie over cytotoxiciteit voor het doelweefsel nodig (zie punten 54-55). Wanneer positieve of onduidelijke bevindingen uitsluitend worden waargenomen met duidelijk bewijs van cytotoxiciteit, wordt het onderzoek op het punt van genotoxiciteit als moeilijk te interpreteren beschouwd, tenzij er voldoende informatie is die een definitieve conclusie ondersteunt. In geval van een negatieve uitkomst van het onderzoek waarbij er bij alle geteste doses tekenen van toxiciteit zijn, kan nader onderzoek bij niet-toxische doses raadzaam zijn.

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— bron, partijnummer indien beschikbaar;

— stabiliteit van de teststof, uiterste gebruiksdatum, of datum voor heranalyse, indien bekend.

Stof die uit één component bestaat:

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Oplosmiddel/medium:

— motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;

— oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend;

— bereiding van dosisformuleringen;

— analytische bepalingen op toedieningsvormen (zoals stabiliteit, homogeniteit, nominale concentraties).

Proefdieren:

— gebruikte diersoort/stam en wetenschappelijke en ethische motiveringen van de keuze;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— herkomst, huisvesting, voeding, verrijking enz.;

— individueel gewicht van de dieren bij de start en het einde van de test, waaronder bereik, gemiddelde en standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden:

— gegevens over positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;

▼M7

— resultaten uit het oriënterende onderzoek, indien dit is uitgevoerd;

— achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;

— gedetailleerde gegevens over de bereiding van de teststof;

— gedetailleerde gegevens over de toediening van de teststof;

— achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;

— plaats van injectie (voor subcutane of intraveneuze onderzoeken);

— methoden voor de bereiding van monsters, indien beschikbaar, histopathologische analyses, in het bijzonder voor een chemische stof die een positieve komeetrespons geeft;

— achtergrond voor de weefselkeuze;

— methoden om te verifiëren of de teststof het doelweefsel heeft bereikt, of de algemene circulatie, als negatieve resultaten verkregen zijn;

— feitelijke dosis (mg/kg lichaamsgewicht/dag) berekend op basis van de teststofconcentratie in voer/drinkwater (ppm) en voedselverbruik, indien van toepassing;

— gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;

— gedetailleerde omschrijving van behandeling en bemonsteringsschema's en motivering van de keuzes (bv. toxicokinetische gegevens, indien beschikbaar);

— methode van pijnbestrijding, analgesie;

— wijze van doden;

— procedures voor het isoleren en preserveren van weefsels;

— methoden voor de bereiding van een cel/nucleisuspensie;

— bron en partijnummers van alle reagentia (waar mogelijk);

— methoden voor de beoordeling van cytotoxiciteit;

— omstandigheden van de elektroforese;

— gebruikte kleuringstechnieken; en

— methoden voor het scoren en meten van kometen.

Resultaten:

— Eventuele algemene klinische observaties voorafgaand aan en gedurende de testperiode voor elk dier;

— bewijs van cytotoxiciteit, indien uitgevoerd;

▼M7

— voor onderzoeken van meer dan één week: individueel lichaamsgewicht tijdens het onderzoek, waaronder bereik, gemiddelde en standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep; voedselverbruik;

— dosisresponsrelatie, daar waar evident;

— voor elk weefsel/dier het % DNA in de staart (of andere maten, indien gekozen) en de mediane waarden per objectglaasje, gemiddelde waarden per dier en gemiddelde waarden per groep;

— gelijktijdige en historische negatieve controlegegevens met bereiken, gemiddelden/medianen en standaardafwijkingen voor elk beoordeeld weefsel;

— gegevens over tegelijkertijd en in het verleden uitgevoerde positieve controles;

— voor andere weefsels dan de lever, een dosisresponscurve waarbij de positieve controle wordt gebruikt. Deze kan worden gebaseerd op gegevens verzameld tijdens het aantonen van de bekwaamheid (zie punten 16-17) en moet vergezeld gaan van een rechtvaardiging voor de gepastheid van de grootte en spreiding van de responsen op de controles in dat weefsel, met verwijzingen naar actuele literatuur;

— gebruikte statistische analyses en methoden; en criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;

— frequentie van „hedgehogs” in elk groep en per dier.

Bespreking van de resultaten

Conclusie

Referenties

LITERATUUR

(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, blz. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, blz. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, blz. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, blz. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, blz. 233-40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, blz. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, blz. 47-63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, blz. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, blz. 184-91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, blz. 40-69.

(11) OESO (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OESO, Parijs.

(12) OESO (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Parijs.

(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, blz. 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, blz. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, blz. 249-61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, blz. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, blz. 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, blz. 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, blz. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, blz. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, blz. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, blz. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, blz. 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, blz. 175-8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, blz. 175-80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, blz. 240-9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, blz. 26-30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, blz. 51-9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, blz. 31-5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, blz. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, blz. 629-799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, blz. 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, blz. 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, blz. 275-282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, blz. 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), blz. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, blz. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, blz. 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, blz. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, blz. 109-11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, blz. 113-23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, blz. 41-45.

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

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

(49) Bijlage A bij de Europese Overeenkomst voor de bescherming van gewervelde dieren die worden gebruikt voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden (ETS nr. 123).

(50) Hoofdstuk B.8 van deze bijlage: *Subacute inhalatietoxiciteit: onderzoek van 28 dagen*.

(51) Hoofdstuk B.29 van deze bijlage: *Subchronische inhalatietoxiciteit: onderzoek van 90 dagen*.

(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, blz. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, blz. 35-41.

(54) OESO (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, nr. 19, OECD Publishing, Parijs.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, blz. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, blz.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, blz. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, blz. 167-75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, blz. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, blz. 171-82.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Alkalische gelelektroforese op cellen: gevoelige techniek voor de detectie van primaire DNA-beschadigingen op het niveau van de afzonderlijke cel/nucleus.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Komeet: de vorm die nucleoïden aannemen wanneer ze worden onderworpen aan een elektroforetisch veld, vanwege de gelijkenis van deze vorm met kometen: de kop is de nucleus en de staart wordt gevormd door het DNA dat zich vanuit de nucleus verplaatst in het elektrisch veld.

Kritische variabele/parameter: een protocolvariabele waarvoor een kleine wijziging een groot effect kan hebben op de conclusie van de test. Kritische variabelen kunnen weefselspecifiek zijn. Kritische variabelen mogen, vooral binnen een test, niet worden gewijzigd zonder dat zorgvuldig is nagedacht over de manier waarop de wijziging een testrespons zal beïnvloeden, bijvoorbeeld zoals blijkend uit de grootte en variabiliteit van positieve en negatieve controles. In het testverslag moeten wijzigingen in kritische variabelen die worden aangebracht tijdens de test of ten opzichte van het standaardprotocol voor het laboratorium, worden vermeld met een rechtvaardiging voor elk van de wijzigingen.

Staartintensiteit of % DNA in de staart: de intensiteit van de staart van de komeet in verhouding tot de totale intensiteit (kop plus staart). Deze verhouding weerspiegelt de hoeveelheid breuken in DNA, uitgedrukt als een percentage.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

UVCB: stof met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.

▼M7

Aanhangsel 2

DE FACTORIËLE OPZET VOOR HET IDENTIFICEREN VAN VERSCHILLEN TUSSEN GESLACHTEN IN DE IN-VIVOKOMEETTEST

De factoriële opzet en zijn analyse

Bij deze opzet worden voor elk concentratieniveau minimaal 5 mannetjes en 5 vrouwtjes getest, wat leidt tot een opzet met minimaal 40 dieren (20 mannetjes en 20 vrouwtjes, plus relevante positieve controles).

De opzet, die een van de eenvoudigere factoriële opzetten is, is gelijkwaardig aan een tweewegs variantieanalyse met geslacht en concentratieniveau als hoofdeffecten. De gegevens kunnen worden geanalyseerd met veel standaard statistische softwarepakketten, zoals SPSS, SAS, STATA, Genstat, alsook met R.

De analyse verdeelt de variabiliteit in de gegevensreeks in de variabiliteit tussen de geslachten, die tussen de concentraties en die verband houdend met de interactie tussen geslacht en concentratie. Elk van de termen wordt getoetst tegen een schatting van de variabiliteit tussen de duplodieren binnen de groepen van dieren van hetzelfde geslacht die dezelfde concentratie toegediend krijgen. Volledige gegevens over de onderliggende methodologie zijn te vinden in diverse statistische standaardhandboeken (zie referenties) en in de 'help'-functionaliteit van de statistische pakketten.

De analyse begint met een inspectie van de interactieterm geslacht x concentratie in de ANOVA-tabel ([1]). Als de interactieterm niet significant is, verschaffen de gecombineerde waarden van de geslachten of van de concentratieniveaus geldige statistische toetsen tussen de niveaus op basis van de gepoolde variabiliteit binnen groepen in de ANOVA.

De volgende stap in de analyse is de verdeling van de geschatte variabiliteit tussen concentraties in contrasten, die een toets op lineaire en kwadratische contrasten van de responsen over de concentratieniveaus verschaft. Wanneer de interactie tussen geslacht en concentratie significant is, kan deze term ook worden verdeeld in interactiecontrasten lineair x geslacht en kwadratisch x geslacht. Deze termen verschaffen toetsen voor de vraag of de concentratieresponsen voor de twee geslachten parallel lopen of dat de respons voor de twee geslachten gedifferentieerd is.

De geschatte gepoolde variabiliteit binnen groepen kan worden gebruikt voor paarsgewijze toetsen voor het verschil tussen de gemiddelden. Deze vergelijkingen kunnen worden gemaakt tussen de gemiddelden voor de twee geslachten en tussen de gemiddelden voor de verschillende concentratieniveaus zoals voor vergelijkingen met de negatieve controleniveaus. Indien er sprake is van een significante interactie, kunnen vergelijkingen worden gemaakt tussen de gemiddelden van verschillende concentraties binnen een geslacht of tussen de gemiddelden van de geslachten bij dezelfde concentratie.

Referenties

Er is een groot aantal statistische handboeken waarin de theorie, opzet, methodologie, analyse en interpretatie van factoriële opzetten worden besproken, variërend van de eenvoudigste analyses met twee factoren tot de complexere vormen die worden gebruikt voor het ontwerpen van experimenten. De lijst hieronder is niet uitputtend. Enkele boeken bevatten uitgewerkte voorbeelden van vergelijkbare proefopzetten, in enkele gevallen met code voor het uitvoeren van de analyses met verschillende softwarepakketten.

([1]) Statistici die een modelbenadering zoals gegeneraliseerde lineaire modellen (GLM's) hanteren, pakken de analyse mogelijk op een andere, maar vergelijkbare manier aan, maar zullen niet noodzakelijkerwijs de traditionele ANOVA-tabel opstellen, die dateert uit de tijd van de algoritmische benaderingen om de statistieken te berekenen die werden ontwikkeld in het pre-computertijdperk.

▼**M7**

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

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

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

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

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

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

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

▼M7

Aanhangsel 3

HUIDIGE BEPERKINGEN VAN DE TEST

Vanwege de huidige kennisstand gelden er voor de in-vivokomeettest verschillende beperkingen. Er wordt verwacht dat deze beperkingen zullen afnemen of nauwkeuriger zullen worden omschreven zodra er meer ervaring met de toepassing van de test is, om in een regelgevingscontext een antwoord te geven op vragen met betrekking tot de veiligheid.

1. Sommige typen beschadigingen van DNA kunnen van korte duur zijn, d.w.z. kunnen zo snel hersteld worden dat ze 24 of meer uren na de laatste dosis niet meer kunnen worden waargenomen. Er is geen identificeerbare lijst van de typen kortstondige beschadigingen, noch van de chemische stoffen die waarschijnlijk dit type beschadigingen veroorzaken, en evenmin is bekend hoelang dit type beschadigingen kan worden waargenomen. De optimale bemonsteringstijdstippen kunnen ook afhangen van de chemische stof en toedieningsweg, en de bemonsteringstijdstippen moeten worden bepaald op basis van kinetische gegevens (bijvoorbeeld de tijd T_{max} waarop de piek-plasmaconcentratie of piek-weefselconcentratie wordt bereikt), indien dergelijke gegevens beschikbaar zijn. De meeste valideringsstudies die deze testmethode ondersteunen, specificeerden necropsie 2 of 3 uur na toediening van de laatste dosis. De meeste studies in de gepubliceerde literatuur beschrijven toediening van de laatste dosis 2 tot 6 uur voordat het dier wordt gedood. Deze ervaringen dienden daarom als basis voor de aanbeveling in de testmethode om bij het ontbreken van gegevens die anders aangeven, de laatste dosis toe te dienen op een bepaald tijdstip 2 tot 6 uur vóór de necropsie.

2. Er zijn geen identificeerbare onderzoeksgegevens beschikbaar die de gevoeligheid van de test voor de detectie van kortstondige DNA-beschadigingen bij toediening van een teststof via voer of drinkwater vergelijken met die bij toediening via een sonde. Er zijn beschadiging van DNA waargenomen na toediening via voer en drinkwater, maar er zijn relatief weinig van dergelijke meldingen vergeleken met de veel grotere ervaring met toediening via een sonde en intraperitoneale toediening. De gevoeligheid van de test kan dus minder zijn voor chemische stoffen die kortstondige beschadigingen veroorzaken bij toediening via voer of drinkwater.

3. Er zijn geen interlaboratoriumstudies uitgevoerd in andere weefsels dan de lever en maag, en er is daarom geen aanbeveling vastgesteld voor de wijze waarop in andere weefsels dan de lever een gevoelige en reproduceerbare respons kan worden verkregen, zoals verwachte positieve en negatieve controlebereiken. Bovendien kon voor de lever geen overeenstemming worden bereikt over de vaststelling van een ondergrens voor de negatieve controlewaarde.

4. Hoewel er meerdere publicaties zijn die het verstorende effect van cytotoxiciteit in vitro aantonen, zijn er maar heel weinig in-vivogegevens gepubliceerd, waardoor het niet mogelijk was één maat voor cytotoxiciteit aan te bevelen. Histopathologische wijzigingen zoals ontsteking, celinfiltratie, apoptotische of necrotische wijzigingen worden in verband gebracht met toenamen van DNA-migratie, maar zoals de valideringsstudie van het JaCVAM (OESO, 2014) heeft aangetoond, leiden deze wijzigingen niet altijd tot positieve komeetbevindingen en is er dus geen definitieve lijst van histopathologische wijzigingen die altijd verbonden zijn aan toegenomen DNA-migratie. „Hedgehogs” (of wolken, spookcellen) zijn eerder voorgesteld als een indicator voor cytotoxiciteit, maar de etiologie van de „hedgehogs” is onzeker. Er bestaan gegevens die erop wijzen dat ze kunnen worden veroorzaakt door cytotoxiciteit die verband houdt met een chemische stof, een mechanisch of door een enzym veroorzaakte beschadiging die ontstaan is tijdens de bereiding van het monster (Guerard *et al*., 2014) en/of een extremer effect van genotoxiciteit van een teststof. Andere gegevens lijken aan te tonen dat ze te wijten zijn aan uitgebreide, maar mogelijk herstelbare DNA-beschadigingen (Lorenzo et al., 2013).

▼M7

5. Weefsels of celnuclei zijn met succes ingevroren voor latere analyse. Invriezing leidt gewoonlijk tot een meetbaar effect op de respons op de medium- en positieve controle (Recio et al*.,* 2010; Recio at al., 2012; Jackson at al., 2013). Indien het laboratorium hiervan gebruikmaakt, moet het laboratorium bekwaamheid met invriesmethoden aantonen en aanvaardbare lage bereiken van het % DNA in de staart in doelweefsels van met medium behandelde dieren bevestigen, alsmede bevestigen dat nog steeds positieve responsen kunnen worden waargenomen. In de literatuur is het invriezen van weefsels met verschillende methoden beschreven. Momenteel is er echter geen overeenstemming over de beste manier om weefsels in te vriezen en te ontdooien en om te beoordelen of een mogelijk gewijzigde respons van invloed kan zijn op de gevoeligheid van de test.

6. Uit recent werk blijkt dat wordt verwacht dat de lijst van kritische variabelen in de toekomst korter zal worden en dat de parameters voor kritische variabelen nauwkeuriger zullen worden vastgesteld (Guerard *et al*., 2014).

Referenties

(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, blz. 114-21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, blz. 699-707.

(3) Lorenzo, Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, blz. 427-32.

(4) OESO (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Parijs.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, blz. 101-13.

▼B

DEEL C: METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE ECOTOXICITEIT

INHOUD

C.1. ACUTE TOXICITEIT VOOR VISSEN

C.2. *DAPHNIA* Sp. — ACUTE IMMOBILISATIETEST

C.3. ZOETWATERALGEN EN CYANOBACTERIËN: GROEIREMMINGSTEST

C.4. BEPALING VAN DE „GEMAKKELIJKE" BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

DEEL I. ALGEMENE BESCHOUWINGEN 30

DEEL II. DOC-AFVLAKKINGSTEST (Methode C.4-A)

DEEL III. GEWIJZIGDE OESO-SCREENING TEST (Methode C.4-B)

DEEL IV. KOOLDIOXYDE CO_2-ONTWIKKELINGTEST (Methode C.4-C)

DEEL V. MANOMETRISCHE RESPIROMETRIE TEST (Methode C.4-D)

DEEL VI. GESLOTEN-FLESTEST (Methode C.4-E)

DEEL VII. M.I.T.I.-TEST (Methode C.4-F)

C.5. AFBRAAK — BIOCHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

C.6. AFBRAAK — CHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

C.7. AFBRAAK — NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK: HYDROLYSE IN AFHANKELIJKHEID VAN DE pH

C.8. TOXICITEIT VOOR REGENWORMEN

C.9. BIOLOGISCHE AFBRAAK — ZAHN-WELLENS TEST

C.10. SIMULATIETEST AEROBE RIOOLWATERZUIVERING: C.10-A: ACTIEFSLIBINSTALLATIES — C.10-B: BIOFILMS

C.11. ACTIEF SLIB: ADEMHALINGSREMMINGSTEST (KOOLSTOF- EN AMMONIUMOXIDATIE)

C.12. BIOLOGISCHE AFBRAAK — GEWIJZIGDE SCAS-TEST

C.13. BIOACCUMULATIE IN VISSEN: BLOOTSTELLING VIA WATER EN VOER

C.14. GROEITEST ONVOLWASSEN VISSEN

C.15. VIS, KORTETERMIJN-TOXICITEITSTEST OP EMBRYONALE EN LARVESTADIA (SAC-FRY)

C.16. HONINGBIJEN — ACUTE-TOXICITEITSTEST (ORAAL)

C.17. HONINGBIJEN — ACUTE-TOXICITEITSTEST (CONTACT)

C.l8. BEPALING VAN DE ADSORPTIE/DESORPTIE MET BEHULP VAN EEN BATCH-EVENWICHTSMETHODE

▼B

C.19.	RAMING VAN DE ADSORPTIECOËFFICIËNT *(K_{OC})* AAN DE BODEM EN AAN RIOOLSLIB MET BEHULP VAN HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE(HPLC)
C.20.	*DAPHNIA MAGNA* VOORTPLANTINGSTEST
C.21.	MICRO-ORGANISMEN IN DE BODEM: BEPALING VAN DE OMZETTING VAN STIKSTOF
C.22.	MICRO-ORGANISMEN IN DE BODEM: BEPALING VAN DE OMZETTING VAN KOOLSTOF
C.23.	AEROBE EN ANAËROBE OMZETTING IN DE BODEM
C.24.	AEROBE EN ANAËROBE OMZETTING IN AQUATISCHE SEDIMENTSYSTEMEN
C.25.	AEROBE MINERALISATIE IN OPPERVLAKTEWATER — SIMULATIETEST VOOR BIOLOGISCHE AFBRAAK
C.26.	LEMNA-SOORTEN: GROEIREMMINGSTEST
C.27.	TEST TER BEPALING VAN DE TOXICITEIT VOOR *CHIRONOMIDEA* IN SEDIMENT EN WATER M.B.V. VERRIJKT SEDIMENT
C.28.	TEST TER BEPALING VAN DE TOXICITEIT VOOR *CHIRONOMIDEA* IN SEDIMENT EN WATER M.BV VERRIJKT WATERR
C.29.	GEMAKKELIJKE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID — CO_2 IN GESLOTEN VATEN (GASRUIMTETEST)
C.30.	BIOACCUMULATIE IN TERRESTRISCHE *OLIGOCHAETAE*
C.31.	TEST MET TERRESTRISCHE PLANTEN: OPKOMST EN GROEI VAN ZAAILINGEN
C.32.	VOORTPLANTINGSTEST MET ENCHYTRAEIDAE
C.33.	VOORTPLANTINGSTEST MET REGENWORMEN (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)
C.34.	BEPALING VAN DE REMMING VAN DE ACTIVITEIT VAN ANAEROBE BACTERIËN — VERLAGING VAN DE GASPRODUCTIE UIT ANAEROOB GISTEND (RIOOL)SLIB
C.35.	TEST TER BEPALING VAN DE TOXICITEIT VOOR *LUMBRICULUS* IN SEDIMENTEN EN WATER M.B.V. VERRIJKT SEDIMENT
C.36.	VOORTPLANTINGSTEST MET ROOFMIJTEN (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) IN BODEM
C.37.	21-DAAGSE VISTEST: KORTETERMIJNSCREENING OP OESTROGENE EN ANDROGENE ACTIVITEIT EN OP AROMATASEREMMERS
C.38.	AMFIBISCHE METAMORFOSETEST (AMA)
C.39.	REPRODUCTIETEST MET SPRINGSTAARTEN IN DE BODEM

▼B

C.40.	LEVENSLANGE TOXICITEITSTEST OP CHIRONOMIDEN IN SEDIMENT-WATERSYSTEMEN MET BEHULP VAN VERRIJKT WATER OF VERRIJKT SEDIMENT
C.41.	GESLACHTELIJKE-ONTWIKKELINGSTEST MET VISSEN
C.42.	BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID IN ZEEWATER
C.43.	ANAEROBE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN ORGANISCHE STOFFEN IN UITGEGIST SLIB: DOOR METING VAN DE GASPRODUCTIE
C.44.	UITLOGING IN BODEMKOLOMMEN
C.45.	RAMING VAN EMISSIES NAAR HET MILIEU VAN MET CONSERVERINGSMIDDEL BEHANDELD HOUT: LABORATORIUMMETHODE VOOR HOUTEN PRODUCTEN DIE NIET ZIJN BEKLEED EN DIE CONTACT MAKEN MET ZOET WATER OF ZEEWATER
C.46.	BIOACCUMULATIE IN IN SEDIMENT LEVENDE BENTISCHE OLIGOCHAETAE
C.47.	TEST OP TOXICITEIT BIJ VISSEN IN VROEGE LEVENSSTADIA (FELS — FISH EARLY-LIFE STAGE)
C.48.	TEST VOOR KORTETERMIJNEFFECTEN OP DE VOORTPLANTING VAN VISSEN
C.49.	ACUTE TOXICITEITSTEST BIJ VISEMBRYO'S (FET, FISH EMBRYO ACUTE TOXICITY TEST)
C.50.	TOXICITEITSTEST OP *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ZONDER SEDIMENT
C.51.	TOXICITEITSTEST OP *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* IN WATER EN SEDIMENT

▼B

C.1. ACUTE TOXICITEIT VOOR VISSEN

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het bepalen van de acute letale toxiciteit van een stof voor vissen in zoet water. Met het oog op de keuze van de testmethode (statisch, semi-statisch of doorstroming) die het meest geschikt is om concentraties van de teststof gedurende de testperiode voldoende constant te houden, is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de teststof.

Zowel bij de voorbereiding van de test als bij de interpretatie van de resultaten moet rekening worden gehouden met aanvullende gegevens (bijvoorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van van belang zijnde verontreinigingen, aanwezigheid en hoeveelheden van additieven en de n-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Acute toxiciteit is het waarneembare schadelijke effect dat in een organisme wordt teweeggebracht binnen een korte tijd (dagen) van blootstelling aan een stof. In deze test wordt de acute toxiciteit uitgedrukt als de mediaan letale concentratie (LC_{50}), dat wil zeggen de concentratie in water waardoor 50 % van een groep vissen in de proef wordt gedood binnen een continue blootstellingsperiode, die moet worden vermeld.

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l). Ze kunnen ook worden uitgedrukt als gewicht per gewicht (mg/kg^{-1}).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de respons van geteste diersoorten onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate is veranderd.

Voor deze test worden geen referentiestoffen gespecificeerd.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er kan een limiettest met 100 mg per liter worden uitgevoerd, om aan te tonen dat de LC_{50} groter is dan deze concentratie.

De vissen worden gedurende 96 uur blootgesteld aan de teststof die in een reeks concentraties aan het water is toegevoegd. De sterfte wordt ten minste elke 24 uur genoteerd en de concentraties waarbij 50 % van de vissen sterft (LC_{50}) wordt indien mogelijk berekend voor elke waarnemingstijd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De kwaliteitscriteria zijn zowel op de limiettest als op de volledige test van toepassing.

De sterfte in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan 10 % (of één vis indien minder dan tien worden gebruikt).

Het zuurstofgehalte moet gedurende de gehele test meer dan 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht zijn geweest.

▼B

De concentraties van de geteste stof dienen gedurende de gehele test binnen 80 % van de oorspronkelijke concentraties gehouden te worden.

Bij stoffen die gemakkelijk oplossen in het testmedium en stabiele oplossingen geven en bijvoorbeeld niet in belangrijke mate vervluchtigen of worden afgebroken, gehydrolyseerd of geadsorbeerd, mag de beginconcentratie als gelijk aan de nominale concentraties beschouwd worden. Evenwel dient aangetoond te worden dat de concentratie gedurende de gehele test gehandhaafd werden en dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Voor stoffen die:

i) moeilijk oplosbaar zijn in het testmedium

of

ii) in staat zijn stabiele emulsies of dispersies te vormen

of

iii) niet stabiel zijn in waterige oplossingen,

dient de bij het begin van de proef in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, in de waterkolom) gemeten concentratie als de beginconcentratie te worden beschouwd. De concentratie moet na een equilibratieperiode maar voordat de proefvissen worden ingebracht, worden bepaald.

In al deze gevallen dienen gedurende de test verdere metingen te worden uitgevoerd om de actuele blootstellingsconcentraties te bevestigen of om te bevestigen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

De pH mag niet meer dan 1 eenheid variëren.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Er kunnen drie verschillende procedures worden toegepast:

Statische test:

Toxiciteitstest waarbij de te onderzoeken oplossing niet stroomt. (Oplossingen blijven ongewijzigd gedurende de test.)

Semi-statische test:

Test waarbij de oplossing niet stroomt, maar de testoplossing periodiek per bak wordt ververst na een langere periode (bijvoorbeeld 24 uur).

Doorstroomtest:

Toxiciteitstest waarin het water voortdurend wordt ververst in de testbakken waarbij de te onderzoeken stof wordt meegevoerd met het water teneinde het testmedium te verversen.

1.6.1. **Reagentia**

1.6.1.1. *Oplossingen van de teststoffen*

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

De gekozen testconcentraties worden bereid door verdunning van de stamoplossing. Indien hoge concentraties worden getest, kan de te onderzoeken stof rechtstreeks worden opgelost in het verdunningswater.

▼B

De stoffen moeten normaal gezien slechts worden getest tot aan de oplosbaarheidsgrens. Bij sommige stoffen (bijvoorbeeld stoffen met lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{OW}, of stoffen die een stabiele dispersie vormen in plaats van een echte oplossing in water) is het aanvaardbaar een testconcentratie te onderzoeken boven de oplosbaarheidslimiet van de stof, om te verzekeren dat de maximaal oplosbare/stabiele concentratie werd bereikt. Het is echter belangrijk dat deze concentratie niet op andere wijze het testsysteem verstoort (bijvoorbeeld een vlies van de stof op het water waardoor de zuurstofvoorziening van het water verhinderd wordt).

Ultrasone dispersie, organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het bereiden van stamoplossingen van stoffen met een lage oplosbaarheid in water, of bij het dispergeren van deze stoffen in het testmedium. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties dezelfde hoeveelheid hulpstof bevatten en moeten extra controlevissen worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de testreeks. De concentratie van dergelijke hulpstoffen dient zo laag mogelijk gehouden te worden en mag in géén geval groter zijn dan 100 mg per liter testmedium.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt geadviseerd om de test te herhalen met gecorrigeerde pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien ten gevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld in het rapport.

1.6.1.2. *Voorraad en verdunningswater*

Leidingwater (waarin geen chloor, zware metalen of andere stoffen in mogelijk schadelijke concentraties mogen voorkomen), goede kwaliteit natuurlijk water of synthetisch water (zie aanhangsel 1) kunnen worden gebruikt. Water met een totale hardheid van 10 tot 250 mg per liter (als $CaCO_3$) en met een pH van 6,0 tot 8,5 verdient de voorkeur.

1.6.2. **Apparatuur**

Alle apparatuur dient te zijn vervaardigd van chemisch inert materiaal:

— automatisch verdunningssysteem (voor doorstroomtest),

— zuurstofmeter,

— apparatuur voor de bepaling van de hardheid van water,

— apparatuur voor de temperatuurbeheersing,

— pH-meter.

1.6.3. **Testvissen**

De vissen dienen gezond te zijn en vrij van elke waarneembare misvorming.

▼B

Het verdient aanbeveling de te gebruiken soorten te selecteren op basis van relevante praktische overwegingen, zoals goede beschikbaarheid gedurende het gehele jaar, goede houdbaarheid, geschiktheid voor testdoeleinden, relatieve gevoeligheid voor chemische stoffen, alsmede alle economische, biologische of ecologische factoren die van belang zijn. Tevens dient bij de keuze van de vissoort rekening gehouden te worden met de behoefte aan vergelijkbaarheid van de verkregen gegevens en met de bestaande internationale harmonisering (referentie 1).

Een lijst met voor de uitvoering van de onderhavige test aanbevolen vissoorten staat vermeld in aanhangsel 2; de zebravis en de regenboogforel hebben de voorkeur.

1.6.3.1. *Het houden van voorraad*

Testvissen dienen bij voorkeur afkomstig te zijn van één partij, met ongeveer dezelfde lengte en leeftijd. De vissen moeten ten minste 12 dagen onder de volgende omstandigheden worden bewaard:

Hoeveelheid vis per liter:

aangepast aan het systeem (recirculatie of doorstroming) en de vissoort;

Water:

zie 1.6.1.2;

Licht:

per dag een belichtingsperiode van 12 à 16 uur;

Zuurstofgehalte:

ten minste 80 % van de verzadigingswaarde voor lucht;

Voeren:

drie keer per week of dagelijks; dit wordt 24 uur voor het begin van de test stopgezet.

1.6.3.2. *Sterfte*

Na een gewenningsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd, waarbij de volgende criteria worden gehanteerd:

— in 7 dagen meer dan 10 % van de populatie:

de gehele partij wordt afgekeurd;

— 5 tot 10 % van de populatie:

de periode van het in voorraad houden wordt met nog 7 dagen verlengd.

Indien geen nieuwe sterfgevallen optreden, wordt de partij goedgekeurd. Anders dient deze te worden afgekeurd;

— minder dan 5 % van de populatie:

de partij wordt goedgekeurd.

1.6.4. **Aanpassing**

Alle vissen moeten gedurende ten minste 7 dagen voor het gebruik worden blootgesteld aan water van de kwaliteit en de temperatuur zoals dat in de test zal worden gebruikt.

▼B

1.6.5. **Testprocedure**

Een definitieve test kan worden voorafgegaan door een test om het meetgebied vast te stellen. Deze verschaft gegevens over de voor de eigenlijke test te gebruiken reeks concentraties.

Naast de testreeks wordt een controlegroep zonder de teststof uitgevoerd en, indien van toepassing, ook een controlegroep met de hulpstof.

Afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof kan gekozen worden voor een statische, semi-statische of doorstroomtest om aan de kwaliteitscriteria te voldoen.

Vissen worden als volgt aan de stof blootgesteld:

— tijdsduur: 96 uur;

— aantal dieren: ten minste 7 per concentratie;

— bakken: van een capaciteit die in overeenstemming is met de aanbevolen hoeveelheid vis per liter;

— hoeveelheid vis per liter: een maximale bezettingsgraad van 1,0 g per liter voor statische en semi-statische tests wordt aanbevolen; voor doorstroomsystemen kan een grotere hoeveelheid vis per liter aanvaardbaar zijn;

— testconcentratie: ten minste vijf concentraties die verschillen met een constante welke niet groter is dan 2,2 en die zo mogelijk het gebied met een sterfte van 0 % tot 100 % bestrijken;

— water: zie 1.6.1.2;

— licht: dagelijks een belichtingsperiode van 12 à 16 uur;

— temperatuur: aangepast aan de soort (Aanhangsel 2); voor iedere afzonderlijke test moet de temperatuur evenwel constant blijven binnen ± 1 ^{o}C;

— zuurstofgehalte: ten minste 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht bij de gekozen temperatuur;

— voeren: achterwege laten.

De vissen worden gecontroleerd na de eerste 2 tot 4 uur en ten minste elke 24 uur. Vissen worden geacht dood te zijn indien aanraking van de staartwortel geen reactie teweeg brengt en geen ademhalingsbewegingen zichtbaar zijn. Dode vissen worden, zodra zij zijn opgemerkt, verwijderd en de sterfte wordt geregistreerd. Er wordt aantekening gemaakt van zichtbare afwijkingen (bijvoorbeeld evenwichtsverlies, veranderingen in zwemgedrag, ademhalingsfunctie, pigmentatie enzovoort).

De pH, zuurstofconcentratie en temperatuur moeten dagelijks worden gemeten.

Limiettest

Gebruikmakend van de procedure zoals beschreven in deze methode, kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 mg per liter om aan te tonen dat de LC_{50} groter is dan deze concentratie.

Indien de aard van de stof zodanig is dat een concentratie van 100 mg per liter in het testwater niet bereikt kan worden, dient de proef te worden uitgevoerd met een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof (of de maximale concentratie die een stabiele dispersie vormt) in het gebruikte medium (zie ook punt 1.6.1.1).

▼B

De limiettest dient te worden uitgevoerd met 7 à 10 vissen en eenzelfde aantal in de controlegroepen. (De binomiale theorie schrijft voor dat als bij gebruik van 10 vissen geen sterfte optreedt, de LC_{50} met een betrouwbaarheid van 99,9 % groter is dan de in de limiettest gebruikte concentratie. Met 7, 8 of 9 vissen geeft de afwezigheid van sterfte een betrouwbaarheid van ten minste 99 % dat de LC_{50} groter is dan de gebruikte concentratie.)

Indien sterfte optreedt, dient een volledige test te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen, dienen deze te worden vermeld.

2. **GEGEVENS EN EVALUATIE**

Zet voor elke aanbevolen blootstellingsperiode op logaritmisch-waarschijnlijkheidspapier voor elk tijdstip waarop waarnemingen werden geregistreerd (24, 48, 72 en 96 uur) het sterftepercentage uit tegen de concentratie.

De LC_{50} en de betrouwbaarheidsintervallen ($p = 0,05$) dienen zo mogelijk voor iedere waarnemingsperiode geschat te worden met behulp van standaardprocedures; deze waarden moeten worden afgerond tot op één, of ten hoogste twee significante cijfers (voorbeelden voor afronding op twee cijfers: 170 voor 173,5; 0,13 voor 0,127; 1,2 voor 1,21).

In die gevallen waarin de helling van de concentratie/respons-percentage-kromme te steil is voor een berekening van de LC_{50}-waarde, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 2,2 slechts een sterfte van 0 respectievelijk 100 % geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC_{50} ligt.

Indien blijkt dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dient dit te worden vermeld en dient voorzichtigheid betracht te worden bij de interpretatie van de resultaten.

3. **RAPPORTAGE**

In het verslag moeten indien mogelijk de volgende gegevens worden opgenomen:

— gegevens over de testvis (wetenschappelijke naam; stam; leverancier; eventuele voorbehandeling; afmeting en aantal dat voor elke testconcentratie gebruikt is);

— herkomst van het verdunningswater alsmede belangrijkste chemische kenmerken (pH, hardheid, temperatuur);

— voor stoffen met een geringe oplosbaarheid in water, de methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen;

— concentratie van eventuele hulpstoffen;

— lijst van de gebruikte concentraties en alle beschikbare gegevens over de stabiliteit bij de concentraties van de teststof in de gebruikte oplossing;

— als chemische analyses zijn uitgevoerd, dienen de toegepaste methoden en de verkregen resultaten te worden vermeld;

— de resultaten van de limiettest, indien van toepassing;

— redenen voor de keuze van de testprocedure alsmede verdere details (bijvoorbeeld statisch, semi-statisch, doseersnelheid, doorstroomsnelheid, of er belucht is, hoeveelheid vis per liter, enzovoort);

▼B

— beschrijving van de testuitrusting;

— lichtregime;

— voor iedere 24 uur het zuurstofgehalte, de pH-waarde en de temperatuur van de testoplossingen;

— gegevens om aan te tonen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan;

— een tabel met de cumulatieve mortaliteit voor elke concentratie en voor de controlegroepen (en, zo nodig, voor de controlegroep met hulpstof) op elke aanbevolen waarnemingstijd;

— grafiek van de concentratie/responspercentage-kromme aan het einde van de test;

— zo mogelijk, de LC_{50}-waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen);

— statistische procedures voor de bepaling van de LC_{50}-waarden;

— als een referentiestof wordt gebruikt moeten ook hiervan de resultaten worden vermeld;

— hoogste testconcentratie die binnen de testperiode geen sterfte veroorzaakte;

— laagste testconcentratie die binnen de testperiode 100 % sterfte veroorzaakte.

4. **LITERATUUR**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 Final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 en/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Departement des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 L(l) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling 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, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities.Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. CEE Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes rum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Bush, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Aanhangsel 1

Synthetisch water

Voorbeeld van een geschikt verdunningswater

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het water moet gedistilleerd of gedeïoniseerd water van goede kwaliteit zijn met een geleidingsvermogen van minder dan 5 μScm^{-1}.

Het toestel voor de distillatie van water mag geen koperen onderdelen bevatten.

Stamoplossingen

$CaCl_2$. 2H20 (calciumchloridedihydraat) 11,76 g
Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

$MgSO_4$.7H20 (magnesiumsulfaatheptahydraat) 4,93 g
Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

$NaHCO_3$ (natriumwaterstofcarbonaat) 2,59 g
Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

KCl (kaliumchloride) 0,23 g
Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

Synthetisch verdunningswater

Meng 25 ml van elk van de vier stamoplossingen en vul met water aan tot 1 liter.

Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.

De pH moet 7,8 ± 0,2 bedragen.

De pH zo nodig bijstellen met NaOH (natriumhydroxide) of HCl (zoutzuur).

Het aldus verkregen verdunningswater wordt gedurende ongeveer 12 uur weggezet en behoeft niet verder te worden belucht.

De som van de Ca- en Mg-ionen in deze oplossing bedraagt 2,5 mmol per liter. De verhouding van de Ca- en Mg-ionen is 4:1 en die van de Na- en K-ionen 10:1. De totale alkaliteit van deze oplossing is 0,8 mmol per liter.

Eventuele afwijkingen van de bereidingswijze van het verdunningswater mogen niet leiden tot een andere samenstelling of andere eigenschappen van het water.

▼B

Aanhangsel 2

Voor tests aanbevolen vissoorten

Aanbevolen soort	Aanbevolen testtemperatuur (°C)	Aanbevolen totale lengte van het proefdier (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamil-ton-Buchanan) Zebravis	20-24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafi-nesque) Modderkruiper	20-24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Lin-naeus 1758) Gewone karper	20-24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cypri-nodonti-dae (Tomminck et Schlegel 1850) Japans rijstvisje	20-24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20-24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchi-daej (Rafinesque Linnaeus 1758) Zonnebaars	20-24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmoni-dae) (Walbaum 1988) Regenbogenforel	12-17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Lin-neaus 1758) Goudwinde	20-24	6,0 ± 2,0

Herkomst

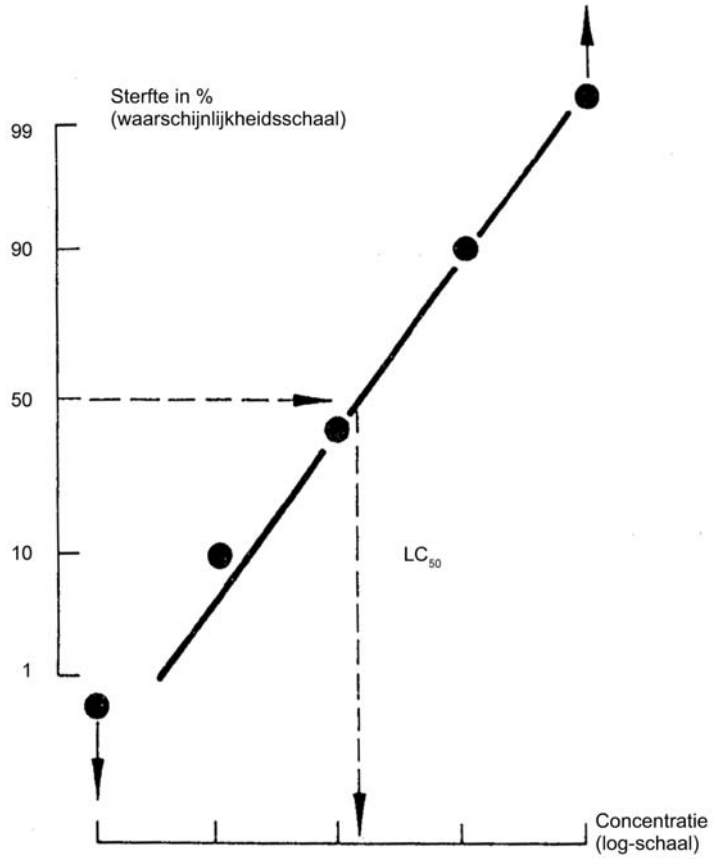
Bovengenoemde vissen laten zich gemakkelijk kweken en/of zijn het gehele jaar ruim verkrijgbaar. Zij kunnen worden geteeld en gekweekt in viskwekerijen of in het laboratorium onder omstandigheden waarbij ziektekiemen en parasieten onder controle gehouden worden, zodat de proefdieren gezond zijn en hun afkomst bekend is. Deze vissen zijn in veel delen van de wereld beschikbaar.

▼B

Aanhangsel 3

Voorbeeld van een concentratie / sterftepercentage — kromme

Voorbeeld van de bepaling van de LC_{50}-waarde met logaritmisch-waarschijnlijkheidspapier



▼B

C.2. *DAPHNIA* Sp. — ACUTE IMMOBILISATIETEST

1. METHODE

Deze testmethode voor acute immobilisatie komt overeen met OESO TG 202 (2004).

1.1. INLEIDING

In deze methode wordt een test voor acute toxiciteit beschreven om de effecten van chemische stoffen op daphniden te bepalen. Er is zo veel mogelijk gebruik gemaakt van bestaande testmethoden (1)(2)(3).

1.2. DEFINITIES

In de context van deze methode worden de volgende definities gebruikt:

EC_{50}: de concentratie waarbij wordt vastgesteld dat 50 % van de daphniden binnen een bepaalde blootstellingsperiode wordt geïmmobiliseerd. Als er een andere definitie wordt gebruikt, moet dit worden gerapporteerd en moet er een referentie worden vermeld.

Immobilisatie: dieren die niet in staat zijn binnen 15 seconden na voorzichtig schudden van het testvat te zwemmen, worden geacht te zijn geïmmobiliseerd (zelfs als ze hun antennes nog kunnen bewegen).

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Jonge daphniden, die aan het begin van de test nog geen 24 uur oud zijn, worden gedurende een periode van 48 uur aan een aantal concentraties van de teststof blootgesteld. De immobilisatie wordt na 24 uur en 48 uur geregistreerd en met controlewaarden vergeleken. De resultaten worden geanalyseerd om de EC_{50} na 48 uur te bepalen (zie de definitie in punt 1.2). Bepaling van de EC_{50} na 24 uur is facultatief.

1.4. INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

De oplosbaarheid in water en de dampdruk van de teststof dienen bekend te zijn en er moet een betrouwbare analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen met een gerapporteerde recovery-capaciteit en bepalingsgrens beschikbaar zijn. Bruikbare informatie is bijvoorbeeld: de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit in water of onder invloed van licht, de P_{ow} en resultaten van een test op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C.4).

NB: Richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat dit problemen oplevert, zijn opgenomen in (4).

1.5. REFERENTIESTOFFEN

Er kan een EC_{50}-test met een referentiestof worden uitgevoerd om te waarborgen dat de testomstandigheden betrouwbaar zijn. Voor dit doel worden toxische stoffen aanbevolen die in internationale ringtests (1)(5) zijn gebruikt [1]. Bij voorkeur eens per maand en ten minste twee keer per jaar moeten er een of meer tests met een referentiestof worden uitgevoerd.

[1] De resultaten van deze ringtests en een technisch corrigendum van ISO 6341 leveren voor kaliumdichromaat ($K_2Cr_2O_7$) een EC_{50} na 24 uur tussen 0,6 en 1,7 mg/l op.

▼B

1.6. KWALITEITSCRITERIA

Voor een geldige test moet aan de volgende criteria worden voldaan:

— in de controlegroepen, met inbegrip van de controlegroep met het ontsluitingsmiddel, mag niet meer dan 10 % van de daphniden zijn geïmmobiliseerd;

— de concentratie opgeloste zuurstof aan het eind van de test moet zowel in de controlegroepen als in de testgroepen ≥ 3 mg/l zijn.

NB: Voor het eerste criterium mag niet meer dan 10 % van de controle-daphniden immobilisatie of andere verschijnselen van ziekte of stress vertonen, bijvoorbeeld verkleuring of ongebruikelijk gedrag zoals permanent verblijf aan het wateroppervlak.

1.7. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.7.1. **Apparatuur**

Testvaten en andere apparatuur die in contact met de testoplossingen komt, moeten volledig van glas of een ander chemisch inert materiaal zijn gemaakt. Normaal gesproken worden glazen reageerbuizen of bekerglazen als testvat gebruikt; deze moeten vóór elk gebruik volgens standaardlaboratoriumprocedures worden gereinigd. De testvaten moeten losjes worden afgedekt om verlies van water door verdamping te beperken en om te voorkomen dat er stof in de oplossingen terechtkomt. Vluchtige stoffen moeten worden getest in volledig gevulde gesloten vaten die groot genoeg zijn om te voorkomen dat de zuurstofconcentratie een beperkende factor wordt of te sterk daalt (zie punt 1.6 en de eerste alinea van punt 1.8.3).

Daarnaast wordt (een deel van) de volgende apparatuur gebruikt: een zuurstofmeter (met micro-elektrode of andere geschikte instrumenten om de concentratie opgeloste zuurstof in monsters met een klein volume te meten), een pH-meter, geschikte apparatuur voor temperatuur-regulering, apparatuur voor de bepaling van de totale organische koolstofconcentratie (TOC), apparatuur voor de bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (CZV), apparatuur voor de bepaling van de hardheid van water enz.

1.7.2. **Testorganisme**

Als testsoort wordt de voorkeur gegeven aan *Daphnia magna Straus*, maar voor deze test mogen ook andere geschikte *Daphnia*-soorten worden gebruikt (b.v. *Daphnia pulex).* Aan het begin van de test mogen de dieren nog geen 24 uur oud zijn en om de variabiliteit te beperken wordt sterk aanbevolen dat ze geen eerste nakomelingen zijn. Ze moeten afkomstig zijn van een gezonde stam (d.w.z. zonder tekenen van stress zoals hoge mortaliteit, aanwezigheid van mannelijke dieren en ephippia, vertraging bij het voortbrengen van het eerste broedsel, verkleurde dieren, enz.). Alle organismen die voor een bepaalde test worden gebruikt, moeten afkomstig zijn van culturen van dezelfde daphnidenstam. De stamdieren moeten onder vergelijkbare kweekomstandigheden (licht, temperatuur, medium) worden gehouden als tijdens de test worden gebruikt. Indien het tijdens de test te gebruiken daphniden-kweekmedium afwijkt van het medium voor de gangbare daphniden-cultuur, verdient het aanbeveling vóór de test een acclimatiseringsperiode in acht te nemen. Daartoe dienen broed-daphniden gedurende ten minste 48 uur vóór het begin van de test bij de testtemperatuur in verdunningswater te worden bewaard.

▼B

1.7.3. **Medium- en verdunningswater**

Natuurlijk water (oppervlakte- of grondwater), synthetisch water of ontchloord kraanwater zijn aanvaardbaar als medium- en verdunningswater, als de daphniden daarin gedurende het kweken, de acclimatisering en de test overleven zonder tekenen van stress te vertonen. Elk water dat voldoet aan de in bijlage 1 vermelde chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater, is geschikt om voor de test te worden gebruikt. Het moet gedurende de testperiode van constante kwaliteit te zijn. Synthetisch water kan worden vervaardigd door specifieke hoeveelheden reagentia aan gedeïoniseerd of gedestilleerd water toe te voegen. Voorbeelden van synthetisch water zijn te vinden in (1) en (6) en in bijlage 2. Er dient te worden opgemerkt dat media die bekende chelaatvormers bevatten, zoals de media M4 en M7 in bijlage 2, moeten worden vermeden voor teststoffen die metalen bevatten. De pH moet op het interval tussen 6 en 9 liggen. Een hardheid tussen 140 en 250 mg/l (als $CaCO_3$) wordt aanbevolen voor *Daphnia Magna,* terwijl voor andere *Daphnia-soorten* ook een lagere hardheid geschikt kan zijn. Vóór het gebruik voor de test kan lucht door het verdunningswater worden geleid, zodat de concentratie opgeloste zuurstof het verzadigingspunt heeft bereikt.

Als natuurlijk water wordt gebruikt, moeten de kwaliteitsparameters ten minste twee keer per jaar worden gemeten of zodra het vermoeden bestaat dat deze kenmerken wellicht significant zijn veranderd (zie de vorige alinea en bijlage 1). Ook metingen van zware metalen (b.v. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni) moeten worden uitgevoerd. Als ontchloord kraanwater wordt gebruikt, is een dagelijkse analyse op chloor wenselijk. Als het verdunningswater afkomstig is van een oppervlaktewater- of grondwaterbron, moeten de geleidbaarheid en de totale hoeveelheid organische koolstof (TOC) of het chemisch zuurstofverbruik (CZV) worden gemeten.

1.7.4. **Testoplossingen**

De testoplossingen met de gekozen concentraties worden meestal bereid door verdunning van een stamoplossing. Stamoplossingen moeten bij voorkeur worden bereid door de teststof in het verdunningswater op te lossen. Het gebruik van oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen moet zo veel mogelijk worden vermeden. In sommige gevallen kunnen dergelijke verbindingen echter nodig zijn om een stamoplossing te maken die geconcentreerd genoeg is. Richtsnoeren voor geschikte oplosmiddelen, emulgatoren en dispergeermiddelen zijn te vinden in (4). In elk geval mag de hoeveelheid teststof in de testoplossingen niet groter zijn dan de oplosbaarheidsgrens in het verdunningswater.

De test moet zonder aanpassing van de pH worden uitgevoerd. Als de pH niet op het interval 6-9 blijft, moet een tweede test worden uitgevoerd waarbij de pH van de stamoplossing wordt aangepast aan die van het verdunningswater vóór de toevoeging van de teststof. De aanpassing van de pH moet zodanig gebeuren dat de concentratie van de stamoplossing niet in significante mate verandert en dat dit niet leidt tot een chemische reactie of neerslaan van de teststof. HCl en NaOH verdienen de voorkeur.

▼B

1.8. PROCEDURE

1.8.1. **Blootstellingsomstandigheden**

1.8.1.1. *Test-en controlegroepen*

De testvaten worden gevuld met de juiste volumes verdunningswater en teststof-oplossingen. De volumeverhouding lucht/water in het testvat moet voor de test- en controlegroepen identiek zijn. Vervolgens worden de daphniden in de testvaten gebracht. Bij elke testconcentratie en voor de controlegroep moeten ten minste 20 dieren worden gebruikt, bij voorkeur verdeeld in vier groepen van elk vijf dieren. Per dier moet ten minste 2 ml testoplossing beschikbaar zijn (d.w.z. een volume van 10 ml voor vijf daphniden per testvat). De test kan worden uitgevoerd met semi-statische vervanging of een doorstroomsysteem wanneer de concentratie van de teststof niet stabiel is.

Naast de groepen met teststof moeten er één controlegroep met verdunningswater en indien van toepassing één controlegroep met het ontsluitingsmiddel in de test worden opgenomen.

1.8.1.2. *Testconcentraties*

Er kan een oriënterende test worden uitgevoerd om het concentratiebereik voor de definitieve test te bepalen, tenzij er informatie over de toxiciteit van de teststof beschikbaar is. Daartoe worden de daphniden blootgesteld aan een reeks concentraties van de teststof met een grote spreiding. Aan elke concentratie moeten gedurende 48 uur of korter vijf daphniden worden blootgesteld en er zijn geen duplo's nodig. De blootstellingsduur kan worden verkort (bv. 24 uur of minder) als er in kortere tijd gegevens kunnen worden verkregen die voor de oriënterende test volstaan.

Er moeten ten minste vijf testconcentraties worden gebruikt. Deze moeten een meetkundige reeks vormen met een rede die bij voorkeur niet hoger is dan 2,2. Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet daarvoor een motivering worden gegeven. De hoogste geteste concentratie moet bij voorkeur leiden tot 100 % immobilisatie en de laagste geteste concentratie mag bij voorkeur geen waarneembaar effect veroorzaken.

1.8.1.3. *Incubatieomstandigheden*

De temperatuur moet binnen het interval tussen 18 °C en 22 °C liggen en moet voor elke afzonderlijke test binnen ± 1 °C stabiel zijn. Een cyclus met 16 uur licht en 8 uur donker wordt aanbevolen. Volledige duisternis is ook aanvaardbaar, vooral wanneer de teststof onder invloed van licht instabiel is.

De testvaten mogen tijdens de test niet worden belucht. De test wordt zonder aanpassing van de pH uitgevoerd. De daphniden mogen gedurende de test niet worden gevoerd.

1.8.1.4. *Duur*

De test duurt 48 uur.

1.8.2. **Observaties**

Elk testvat moet 24 en 48 uur na het begin van de test worden gecontroleerd op geïmmobiliseerde daphniden (zie punt 1.2 voor definities). Naast immobiliteit moet ook abnormaal gedrag of een afwijkend uiterlijk worden gerapporteerd.

▼B

1.8.3. **Analytische bepalingen**

Aan het begin en aan het eind van de test worden in de controlegroep(en) en bij de hoogste concentratie van de teststof de concentratie opgeloste zuurstof en de pH gemeten. De concentratie opgeloste zuurstof in de controlegroepen moet aan het geldigheidscriterium voldoen (zie punt 1.6). De pH mag binnen één test normaal gesproken niet meer dan 1,5 eenheid variëren. De temperatuur wordt meestal in controlevaten of in de lucht gemeten en moet bij voorkeur continu gedurende de test of ten minste aan het begin en het eind van de test worden geregistreerd.

De concentratie van de teststof moet ten minste bij de hoogste en laagste testconcentratie aan het begin en het eind van de test worden gemeten (4). Het verdient aanbeveling de resultaten op basis van de gemeten concentraties te bepalen. Als er echter gegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat de concentratie van de teststof gedurende de hele test voldoende stabiel binnen ± 20 % van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, kunnen de resultaten op basis van de nominale of gemeten beginconcentraties worden bepaald.

1.9. LIMIETTEST

Er kan volgens de in deze methode beschreven procedures een limiettest worden uitgevoerd bij 100 mg teststof/l of (indien dit lager is) de oplosbaarheidsgrens in het testmedium om aan te tonen dat de EC_{50} hoger is dan deze concentratie. De limiettest moet met 20 daphniden (bij voorkeur verdeeld in vier groepen van vijf) en hetzelfde aantal in de controlegroep(en) worden uitgevoerd. Als er sprake is van immobilisatie, moet er een volledig onderzoek worden uitgevoerd. Elk geobserveerd abnormaal gedrag moet worden geregistreerd.

2. **GEGEVENS**

De gegevens moeten worden ingediend in de vorm van een tabel waarin voor elke behandelde en controlegroep wordt vermeld hoeveel van de gebruikte daphniden op elk observatietijdstip waren geïmmobiliseerd. Het percentage geïmmobiliseerde daphniden na 24 uur en 48 uur wordt uitgezet tegen de testconcentratie. De gegevens worden met geschikte statistische methoden (zoals probit-analyse) geanalyseerd om de helling van de curves en de EC_{50} met 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen ($p = 0,05$) te berekenen (7) (8).

Wanneer de standaardmethodes voor de berekening van de EC_{50} niet bruikbaar zijn voor de verkregen gegevens, worden de hoogste concentratie die geen immobiliteit veroorzaakt en de laagste concentratie die 100 % immobiliteit veroorzaakt, als benadering voor de EC_{50} gebruikt (daarvoor wordt in dit geval het meetkundig gemiddelde van deze twee concentraties genomen).

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

▼B

— chemische identificatiegegevens, met inbegrip van de zuiverheid.

Testsoort:

— bron en species van de *Daphnia,* de leverancier van de bron (indien bekend) en de gebruikte cultuuromstandigheden (met inbegrip van bron, aard en hoeveelheid van het voer en de voerfrequentie).

Testomstandigheden:

— beschrijving van de testvaten: type, volume van de oplossing, aantal daphniden per testvat, aantal testvaten (duplo's) per concentratie;

— methoden voor de bereiding van de stam- en testoplossingen, met inbegrip van eventueel gebruikte oplosmiddelen of dispergeermiddelen en gebruikte concentraties;

— nadere bijzonderheden over het verdunningswater: bron en kwaliteitskenmerken van het water (pH, hardheid, verhouding Ca/Mg, verhouding Na/K, alkaliniteit, geleidbaarheid enz.); samenstelling van synthetisch water, indien gebruikt;

— incubatieomstandigheden: temperatuur, lichtintensiteit en -periodiciteit, opgeloste zuurstof, pH enz.

Resultaten:

— het aantal en het percentage daphniden in elke behandelde en controlegroep dat op elk observatietijdstip was geïmmobiliseerd of blijk gaf van schadelijke effecten (met inbegrip van abnormaal gedrag) en een beschrijving van de aard van de geobserveerde effecten;

— de resultaten van de met een referentiestof uitgevoerde test en de datum waarop deze is uitgevoerd, indien beschikbaar;

— de nominale testconcentraties en de resultaten van alle analyses om de concentratie van de teststof in de testvaten te bepalen; de recoverycapaciteit van de methode en de bepalingsgrens dienen ook te worden gerapporteerd;

— alle tijdens de test uitgevoerde fysisch-chemische metingen van de temperatuur, de pH en de opgeloste zuurstof;

— de EC_{50} na 48 uur voor immobilisatie met betrouwbaarheidsintervallen en grafieken van het model dat voor de berekening daarvan is gebruikt, de hellingen van de dosis/respons-curves en de standaardafwijking daarvan; de voor de bepaling van de EC_{50} gebruikte statistische procedures; (wanneer deze gegevens ook voor immobilisatie na 24 uur zijn gemeten, dienen deze ook te worden gerapporteerd)

— een verklaring voor eventuele afwijkingen van de testmethode en een toelichting of deze afwijkingen gevolgen hebben gehad voor de resultaten van de test.

4. **REFERENTIES**

(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, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp. 65-84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Bijlage 1

ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN AANVAARDBAAR VERDUNNINGSWATER

Stof	Concentratie
Deeltjes	< 20 mg/l
Totale hoeveelheid organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonium	< 1 µg/l
Chloorresiduen	< 10 µg/l
Totale hoeveelheid organofosfaat-bestrijdingsmiddelen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organochloor-bestrijdingsmiddelen plus polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organisch chloor	< 25 ng/l

▼B

Bijlage 2

VOORBEELDEN VAN GESCHIKT SYNTHETISCH TESTWATER

ISO-testwater (1)

Stamoplossingen (één stof)		Voor de bereiding van synthetisch water worden de volgende volumes stamoplossingen toegevoegd aan 1 liter water (*)
Stof	Aan 1 liter water (*) toegevoegde hoeveelheid	
Calciumchloride $CaCl_2.2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnesiumsulfaat $MgSO_4.7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natriumbicarbonaat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kaliumchloride KCl	0,23 g	25 ml

(*) Water met een geschikte zuiverheid, bijvoorbeeld gedeïoniseerd, gedestilleerd of gezuiverd door omgekeerde osmose, met een geleidbaarheid die bij voorkeur niet hoger is dan 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendt-media M7 en M4

Acclimatisering aan Elendt-media M7 en M4

Sommige laboratoria hebben problemen ondervonden bij het rechtstreeks overbrengen van Daphnia in M4- en M7-media. Toch is er enig succes geboekt met geleidelijke acclimatisering, d.w.z. overgang van het eigen medium naar 30 % Elendt, vervolgens naar 60 % Elendt en tot slot naar 100 % Elendt. De vereiste acclimatiseringsperiode kan soms oplopen tot een hele maand.

Bereiding

Spoorelementen

Eerst worden afzonderlijke stamoplossingen (I) van individuele spoorelementen bereid in water met een geschikte zuiverheid, bijvoorbeeld gedeïoniseerd, gedestilleerd of gezuiverd door omgekeerde osmose. Uit deze verschillende stamoplossingen (I) wordt één tweede stamoplossing (II) bereid die alle spoorelementen bevat (gecombineerde oplossing):

Stamoplossing(en) I (één stof)	Aan water toegevoegde hoeveelheid (mg/l)	Concentratie (in vergelijking met medium M4)	Voor de bereiding van de gecombineerde stamoplossing II wordt de volgende hoeveelheid stamoplossing I toegevoegd aan water (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-voudig	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-voudig	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-voudig	1,0	0,25

▼B

Stamoplossing(en) I (één stof)	Aan water toegevoegde hoeveelheid (mg/l)	Concentratie (in vergelijking met medium M4)	Voor de bereiding van de gecombineerde stamoplossing II wordt de volgende hoeveelheid stamoplossing I toegevoegd aan water (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-voudig	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-voudig	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-voudig	1,0	0,25
$Na_2MoO_4.2H_2$ O	1 230	20 000-voudig	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-voudig	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-voudig	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-voudig	1,0	1,0
KI	65	20 000-voudig	1,0	1,0
Na_2Se0_3	43,8	20 000-voudig	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-voudig	1,0	1,0
$Na_2EDTA.2H_2O$	5 000	2 000-voudig	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-voudig	—	—

Zowel de Na2EDTA- als de $FeSO_4$-oplossing wordt apart bereid; vervolgens worden ze samengevoegd en onmiddellijk in een autoclaaf gesteriliseerd.

Dit levert op:

2 l Fe-EDTA-oplossing		1 000-voudig	20,0	5,0

M4- en M7-media

M4- en M7-media worden als volgt bereid met behulp van stamoplossing II, macronutriënten en vitamines:

	Aan water toegevoegde hoeveelheid (mg/l)	Concentratie (in vergelijking met medium M4)	Voor de bereiding van het medium toegevoegde hoeveelheid stamoplossing II (ml/l)	
			M4	M7
Stamoplossing II (gecombineerde spoorelementen)		20-voudig	50	50
Stamoplossingen macronutriënten (één stof)				
$CaCl_2$ $2H_2O$	293 800	1 000-voudig	1,0	1,0
$MgSO_4$ $7H_2O$	246 600	2 000-voudig	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-voudig	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-voudig	1,0	1,0
Na_2 $Si0_3.9H_2O$	50 000	5 000-voudig	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-voudig	0,1	0,1
KH_2 PO_4	1 430	10 000-voudig	0,1	0,1
K_2H PO_4	1 840	10 000-voudig	0,1	0,1

▼B

	Aan water toegevoegde hoeveelheid (mg/l)	Concentratie (in vergelijking met medium M4)	Voor de bereiding van het medium toegevoegde hoeveelheid stamoplossing II (ml/l)	
			M4	M7
Gecombineer de stamoplossing met vitaminen	—	10 000-voudig	0,1	0,1
De gecombineerde stamoplossing met vitaminen wordt bereid door de volgende drie vitaminen als volgt aan 1 liter water toe te voegen:				
Thiaminehydrochloride	750	10 000-voudig		
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000-voudig		
Biotine	7,5	10 000-voudig		

De gecombineerde stamoplossing met vitaminen wordt in bevroren toestand in kleine porties bewaard. De vitaminen worden vlak vóór gebruik aan de media toegevoegd.

NB: Om het neerslaan van zouten bij de bereiding van de volledige media te voorkomen worden de porties van de stamoplossingen toegevoegd aan ongeveer 500-800 ml gedeïoniseerd water en daarna aangevuld tot 1 liter.

NB: Zie voor de eerste publicatie over het M4-medium: 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. ZOETWATERALGEN EN CYANOBACTERIËN: GROEIREMMINGSTEST

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 201 (2006, bijlage gecorrigeerd in 2011) van de OESO. De testmethode moest worden herzien om er meer soorten in op te nemen en aan te sluiten bij de eisen inzake risico-evaluatie en de indeling van chemische stoffen. Deze herziening is uitgevoerd op basis van uitgebreide praktische ervaring, vorderingen van de wetenschap op het gebied van toxiciteitsonderzoek met algen en uitgebreid gebruik in het kader van regelgeving sinds de oorspronkelijke vaststelling.

2. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

3. Deze test is bedoeld om de effecten van een chemische stof op de groei van zoetwatermicroalgen en/of cyanobacteriën te bepalen. Exponentieel groeiende testorganismen worden gedurende normaal gesproken 72 uur in batchculturen aan de teststof blootgesteld. Ondanks de betrekkelijk korte duur van de test kunnen de effecten over verschillende generaties worden bepaald.

4. De respons van het systeem is de afname van de groei in een reeks algenculturen (testeenheden) die aan verschillende concentraties van een teststof worden blootgesteld. De respons wordt bepaald als functie van de blootstellingsconcentratie in vergelijking met de gemiddelde groei van een duploreeks van niet-blootgestelde controleculturen. Om de respons van het systeem op toxische effecten volledig tot uitdrukking te laten komen (optimale gevoeligheid) laat men de culturen onbeperkt exponentieel groeien met voldoende nutriënten en continu licht gedurende een periode die lang genoeg is om een afname van de specifieke groeisnelheid te kunnen meten.

5. De groei en de remming van de groei worden kwantitatief bepaald door de biomassa van de algen als functie van de tijd te meten. De biomassa van de algen wordt gedefinieerd als het drooggewicht per volume-eenheid, bv. mg algen/liter testoplossing. Omdat het drooggewicht echter moeilijk te bepalen is, worden vaak vervangende parameters gebruikt. Het aantal cellen is de meest gangbare van deze parameters. Andere mogelijkheden zijn celvolume, fluorescentie, optische dichtheid enz. Er moeten omrekeningsfactoren bekend zijn tussen de gemeten vervangende parameter en de biomassa.

6. Het eindpunt van de test is groeiremming, uitgedrukt als de logaritmische toename van de biomassa (gemiddelde specifieke groeisnelheid) gedurende de blootstellingsperiode. Op basis van de gemiddelde specifieke groeisnelheden die in een reeks testoplossingen worden geregistreerd, wordt de concentratie bepaald die een specifiek percentage remming van de groeisnelheid ('growth rate') (bv. 50 %) veroorzaakt; deze wordt uitgedrukt als de E_rC_x (bv. E_rC_{50}).

7. Bij deze testmethode wordt ook de opbrengst ('yield') als responsvariabele gebruikt; deze kan in bepaalde landen nodig zijn om aan specifieke voorschriften in de regelgeving te voldoen. De opbrengst wordt gedefinieerd als de biomassa aan het eind van de blootstellingsperiode verminderd met de biomassa aan het begin van de blootstellingsperiode. Op basis van de opbrengst die in een reeks testoplossingen wordt geregistreerd, wordt de concentratie berekend die een specifiek percentage verlaging van de opbrengst (bv. 50 %) veroorzaakt; deze wordt uitgedrukt als de E_yC_x (bv. E_yC_{50}).

8. Daarnaast kunnen langs statistische weg de laagste concentratie met waargenomen effect (LOEC) en de concentratie zonder waargenomen effect (NOEC) worden bepaald.

▼M6

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

9. De informatie over de teststof, die nuttig kan zijn om de testomstandigheden te bepalen, omvat bijvoorbeeld de structuurformule, zuiverheid, stabiliteit in licht, stabiliteit onder de testomstandigheden, lichtabsorberende eigenschappen, pKa en resultaten van onderzoek naar de omzetting van de stof, waaronder de biologische afbreekbaarheid in water.

10. De oplosbaarheid in water, de verdelingscoëfficiënt octanol/water (P_{ow}) en de dampspanning van de teststof moeten bekend zijn en er moet een gevalideerde methode beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen met een gerapporteerde recovery en detectiegrens.

GELDIGHEID VAN DE TEST

11. Voor een geldige test moet aan de volgende criteria worden voldaan:

— De biomassa in de controleculturen moet binnen de testperiode van 72 uur exponentieel met ten minste een factor 16 zijn toegenomen. Dit komt overeen met een specifieke groeisnelheid van 0,92 dag^{-1}. Voor de meest gebruikte soorten is de groeisnelheid meestal aanzienlijk hoger (zie aanhangsel 2). Wanneer soorten worden gebruikt die trager groeien dan de in aanhangsel 2 vermelde soorten, wordt wellicht niet aan dit criterium voldaan. In dat geval moet de testperiode worden verlengd, zodat in de controleculturen ten minste een groei met een factor 16 wordt verkregen, terwijl de groei gedurende de hele testperiode exponentieel moet zijn. De testperiode kan worden ingekort, maar moet ten minste 48 uur zijn, om gedurende de test een onbeperkte, exponentiële groei te houden, zolang de vermenigvuldigingsfactor minimaal 16 is.

— De gemiddelde variatiecoëfficiënt voor partiële specifieke groeisnelheden (dagen 0-1, 1-2 en 2-3 voor tests van 72 uur) in de controleculturen (zie aanhangsel 1 onder „variatiecoëfficiënt") mag niet hoger zijn dan 35 %. Zie punt 49 voor de berekening van de partiële specifieke groeisnelheid. Dit criterium geldt voor de gemiddelde waarde van variatiecoëfficiënten die voor replicaatcontroleculturen worden berekend.

— De variatiecoëfficiënt van gemiddelde specifieke groeisnelheden gedurende de hele testperiode in replicaatcontroleculturen mag bij tests met Pseudokirchneriella subcapitata en Desmodesmus subspicatus niet hoger zijn dan 7 %. Voor andere minder vaak gebruikte soorten mag deze waarde niet hoger zijn dan 10 %.

REFERENTIESTOF

12. Er kunnen een of meer referentiestoffen worden getest, zoals 3,5-dichloorfenol dat in het internationale ringonderzoek is gebruikt (1), om de testprocedure te controleren. Kaliumdichromaat kan ook als referentiestof voor groene algen worden gebruikt. Het is wenselijk een referentiestof ten minste twee keer per jaar te testen.

TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

13. Deze testmethode kan het gemakkelijkst worden toegepast op stoffen die oplosbaar zijn in water en waarvan kan worden verwacht dat ze onder de testomstandigheden in oplossing blijven. Voor het testen van chemische stoffen die vluchtig zijn, sterk adsorberen, gekleurd zijn, slecht oplosbaar

▼M6

zijn in water of nadelige gevolgen kunnen hebben voor de beschikbaarheid van nutriënten of mineralen in het testmedium, kan het nodig zijn de beschreven procedure op bepaalde punten aan te passen (bv. een gesloten systeem of conditionering van de testvaten). In de literatuur (2), (3) en (4) wordt een leidraad gegeven voor enkele geschikte aanpassingen.

BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Apparatuur

14. Testvaten en andere apparaten die in aanraking komen met de testoplossingen, mogen alleen uit glas of een ander chemisch inert materiaal bestaan. Alle voorwerpen moeten grondig worden gewassen om ervoor te zorgen dat er geen organische of anorganische verontreinigingen zijn die invloed kunnen hebben op de groei van de algen of de samenstelling van de testoplossingen.

15. Als testvat zullen normaal gesproken glazen kolven worden gebruikt die zo groot zijn dat het volume van de cultuur groot genoeg is voor metingen tijdens de test en een afdoende massaoverdracht van CO_2 uit de lucht mogelijk is (zie punt 30). Let op dat het volume van de vloeistof groot genoeg moet zijn voor de analyses (zie punt 37).

16. Daarnaast kan (een deel van) de volgende apparatuur nodig zijn:

— Kweekapparatuur: aanbevolen wordt een kast of kamer waarin de gekozen incubatietemperatuur tot op ± 2 °C nauwkeurig kan worden gehandhaafd.

— Instrumenten voor lichtmeting: er moet rekening mee worden gehouden dat de meetmethode voor de lichtintensiteit en met name de aard van de receptor (collector) de gemeten waarde kan beïnvloeden. De metingen moeten bij voorkeur worden uitgevoerd met een sferische (4 π) receptor (die reageert op direct en gereflecteerd licht uit alle hoeken boven en onder het meetvlak) of een 2 π (die reageert op licht uit alle hoeken boven het meetvlak).

— Apparatuur om de biomassa van de algen te bepalen. De meest gebruikte vervangende parameter voor de biomassa van de algen is het aantal cellen, dat kan worden bepaald met een elektronische deeltjesteller, een microscoop met een telkamer of een flowcytometer. Andere vervangende parameters voor de biomassa kunnen worden gemeten met een flowcytometer, een fluorimeter, een spectrofotometer of een colorimeter. Er moet een omrekeningsfactor worden berekend voor het verband tussen aantal cellen en drooggewicht. Om bij gebruik van een spectrofotometer bij lage biomassaconcentraties bruikbare metingen uit te kunnen voeren kan het nodig zijn cuvetten te gebruiken met een optische weglengte van ten minste 4 cm.

Testorganismen

17. Er kunnen verschillende soorten los groeiende microalgen en cyanobacteriën worden gebruikt. Van de in aanhangsel 2 vermelde stammen is aangetoond dat ze geschikt zijn voor de in deze testmethode beschreven testprocedure.

18. Als andere soorten worden gebruikt, moeten de stam en/of de herkomst worden vermeld. Bevestig dat de gekozen algen onder de gebruikte omstandigheden gedurende de hele testperiode exponentieel kunnen blijven groeien.

Groeimedium

19. Er worden twee groeimedia aanbevolen: het OESO-medium en het AAP-medium. De samenstelling van deze media wordt in aanhangsel 3 vermeld. Let op dat de aanvankelijke pH-waarde en de buffercapaciteit (die de pH-stijging reguleert) voor deze media verschillen. Dit betekent dat de resultaten van de tests afhankelijk van het gebruikte medium kunnen verschillen, vooral wanneer ionogene chemische stoffen worden getest.

▼M6

20. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn de groeimedia te wijzigen, bijvoorbeeld wanneer metalen en chelaatvormers worden getest of wanneer bij andere pH-waarden wordt getest. Wanneer een gewijzigd medium wordt gebruikt, moet dit gedetailleerd worden beschreven en moet een motivering worden gegeven (3) (4).

Aanvankelijke biomassaconcentratie

21. De aanvankelijke biomassaconcentratie moet in alle testculturen even groot zijn en moet klein genoeg zijn om zonder risico op een tekort aan nutriënten exponentiële groei gedurende de hele incubatieperiode mogelijk te maken. De aanvankelijke biomassaconcentratie mag niet groter zijn dan 0,5 mg/l als drooggewicht. De volgende beginconcentraties cellen worden aanbevolen:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 - 10^4$ cellen/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ cellen/ml
Navicula pelliculosa	10^4 cellen/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 cellen/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ cellen/ml

Concentraties van de teststof

22. Op basis van de resultaten van bereikbepalingstests kan het concentratiebereik worden bepaald waar effecten te verwachten zijn. Voor de definitieve test moeten ten minste vijf concentraties worden gekozen die een meetkundige reeks vormen met een reden van ten hoogste 3,2. Voor teststoffen met een vlakke concentratie-responscurve moet wellicht een hogere reden worden gekozen. De concentratiereeks moet bij voorkeur het interval bestrijken waar 5-75 % remming van de groeisnelheid optreedt.

Replicaten en controles

23. Elke testconcentratie moet in triplo worden getest. Als bepaling van de NOEC niet nodig is, mag het aantal concentraties worden vergroot en het aantal replicaten per concentratie worden verkleind. De controlebepaling moet ten minste in triplo worden uitgevoerd en het aantal controles moet liefst twee keer zo groot zijn als het aantal replicaten dat voor elke testconcentratie wordt gebruikt.

24. Voor de analyse van de teststofconcentraties kan een aparte reeks testoplossingen worden bereid (zie punten 36 en 38).

25. Wanneer een oplosmiddel wordt gebruikt om de teststof in oplossing te brengen, moeten extra controles worden opgenomen met dezelfde concentratie oplosmiddel als in de testculturen.

Bereiding van de entcultuur

26. Om de algen aan de testomstandigheden te laten adapteren en ervoor te zorgen dat ze in de exponentiële groeifase zijn wanneer ze voor het beënten van de testoplossingen worden gebruikt, wordt 2-4 dagen vóór het begin van de test een entcultuur in het testmedium gemaakt. De hoeveelheid biomassa van de algen moet zo groot zijn dat exponentiële groei in de entcultuur tot het begin van de test mogelijk is. Incubeer de entcultuur onder dezelfde omstandigheden als de testculturen. Meet de toename van de biomassa in de

▼M6

entcultuur om na te gaan of de groei onder de kweekomstandigheden binnen het normale bereik voor de teststam ligt. In aanhangsel 4 wordt een voorbeeld gegeven van de procedure voor het kweken van algen gegeven. Om synchrone celdelingen tijdens de test te voorkomen kan een tweede vermeerderingsstap van de entcultuur nodig zijn.

Bereiding van de testoplossingen

27. Alle testoplossingen moeten dezelfde concentratie groeimedium en dezelfde hoeveelheid biomassa aan algen bevatten. De testoplossingen met de gekozen concentraties worden meestal bereid door een stamoplossing van de teststof met groeimedium en entcultuur te mengen. Stamoplossingen worden normaal gesproken bereid door de chemische stof in testmedium op te lossen.

28. Om slecht in water oplosbare chemische stoffen in het testmedium op te nemen kunnen oplosmiddelen zoals aceton, *tert*-butanol en dimethylformamide als drager worden gebruikt (2) (3). De oplosmiddelconcentratie mag niet hoger zijn dan 100 µl/l en aan alle culturen (met inbegrip van de controles) in de testreeks moet dezelfde concentratie oplosmiddel worden toegevoegd.

Incubatie

29. De testvaten worden afgesloten met een luchtdoorlatende stop. Ze worden geschud en in het kweekapparaat gezet. Tijdens de test moeten de algen in suspensie worden gehouden en moet de overdracht van CO_2 worden bevorderd. Daartoe moet voortdurend worden geschud of geroerd. De culturen moeten op een temperatuur tussen 21 °C en 24 °C worden gehouden, gereguleerd tot op ± 2 °C nauwkeurig. Voor andere soorten dan in aanhangsel 2 worden vermeld, bv. tropische soorten, zijn hogere temperaturen wellicht geschikt, mits aan de geldigheidscriteria kan worden voldaan. Er wordt aanbevolen de kolven een willekeurige plaats te geven en hun plaats in de incubator elke dag te veranderen.

30. De pH van het controlemedium mag gedurende de test niet meer dan 1,5 eenheden stijgen. Voor metalen en chemische stoffen die bij een pH in de buurt van de pH van de test gedeeltelijk ioniseren, kan het nodig zijn de pH-verschuiving te beperken om reproduceerbare en goed gedefinieerde resultaten te verkrijgen. Een verschuiving van minder dan 0,5 pH-eenheid is technisch haalbaar en kan worden bereikt door te zorgen voor een afdoende massaoverdracht van CO_2 vanuit de omgevingslucht naar de testoplossing, bijvoorbeeld door de schudsnelheid op te voeren. Het is ook mogelijk de behoefte aan CO_2 te verminderen door de aanvankelijke hoeveelheid biomassa of de duur van de test te verlagen.

31. Het oppervlak waar de culturen worden geïncubeerd, moet continu worden verlicht met uniform fluorescerend licht, bv. van het type „cool white” (koel wit) of „daylight” (daglicht). De lichtvereisten zijn niet voor alle stammen algen en cyanobacteriën gelijk. De lichtintensiteit moet zodanig worden gekozen dat deze geschikt is voor het gebruikte testorganisme. Voor de aanbevolen soorten groene algen moet de lichtintensiteit ter hoogte van de testoplossingen binnen het bereik 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ liggen, gemeten met een geschikte receptor binnen het voor fotosynthese effectieve golflengtebereik van 400-700 nm. Sommige soorten, met name *Anabaena flos-aquae*, groeien goed bij een lage lichtintensiteit en kunnen bij een hoge intensiteit worden beschadigd. Voor deze soorten moet een gemiddelde lichtintensiteit binnen het bereik 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ worden gekozen. (Voor lichtmeetinstrumenten die in lux gekalibreerd zijn, komt een bereik van 4 440-8 880 lux voor „cool white” licht ongeveer overeen met de aanbevolen lichtintensiteit 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). De lichtintensiteit mag niet meer dan ± 15 % afwijken van de over het incubatieoppervlak gemiddelde lichtintensiteit.

▼M6

Testduur

32. De test duurt normaal gesproken 72 uur. De duur van de test mag echter ook korter of langer zijn, mits aan alle geldigheidscriteria van punt 11 kan worden voldaan.

Metingen en analyses

33. Gedurende de testperiode wordt ten minste één keer per dag de biomassa van de algen in elke kolf bepaald. Als de metingen worden uitgevoerd met kleine volumes die met een pipet uit de testoplossing worden gehaald, mogen deze niet worden vervangen.

34. Meting van de biomassa gebeurt door handmatige celtelling met een microscoop of met een elektronische deeltjesteller (door telling van cellen en/of bepaling van biovolume). Ook andere technieken kunnen worden gebruikt, zoals flowcytometrie, *in vitro* of *in vivo* chlorofylfluorescentie (5) (6) of optische dichtheid, mits voor de hoeveelheden die bij de test worden gevonden, een bevredigende correlatie met de biomassa kan worden aangetoond.

35. Aan het begin en aan het eind van de test wordt de pH van de oplossingen gemeten.

36. Mits een analyseprocedure voor het bepalen van de teststof in het gebruikte concentratiebereik beschikbaar is, moeten de testoplossingen worden geanalyseerd om de beginconcentraties en het behoud van de blootstellingsconcentraties tijdens de test te controleren.

37. Wanneer het waarschijnlijk is dat de blootstellingsconcentraties gedurende de test minder dan 20 % van de nominale waarden zullen afwijken, kan een analyse van de concentratie van de teststof aan het begin en het eind van de test bij een lage en een hoge testconcentratie en een concentratie rond de verwachte EC_{50} voldoende zijn. Wanneer het onwaarschijnlijk is dat de concentraties binnen 80-120 % van de nominale waarde blijven, wordt een analyse van alle testconcentraties aan het begin en het eind van de test aanbevolen. Bij vluchtige, instabiele of sterk adsorberende teststoffen wordt daarnaast aanbevolen om gedurende de blootstellingsperiode om de 24 uur een monster te analyseren om beter te kunnen bepalen hoeveel teststof verloren gaat. Voor deze chemische stoffen kunnen extra replicaten nodig zijn. In alle gevallen hoeft de bepaling van de teststofconcentratie slechts op één van de replicaatvaten voor elke testconcentratie te worden uitgevoerd (of op de gecombineerde inhoud van de replicaatvaten).

38. De testmedia die specifiek worden bereid voor de analyse van de blootstellingsconcentraties gedurende de test, moeten net zo worden behandeld als die welke voor de test worden gebruikt, d.w.z. ze moeten met algen worden beënt en onder identieke omstandigheden worden geïncubeerd. Als de concentratie van de opgeloste teststof moet worden bepaald, kan het nodig zijn de algen van het medium te scheiden. De scheiding moet bij voorkeur gebeuren door centrifugeren met een laag toerental dat voldoende is om de algen te laten bezinken.

39. Als kan worden aangetoond dat de concentratie van de geteste stof gedurende de gehele test op afdoende wijze binnen ± 20 % van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, kan de analyse van de resultaten op basis van de nominale of gemeten beginwaarden worden uitgevoerd. Als de afwijking van de nominale of gemeten beginconcentratie niet binnen de marge van ± 20 % ligt, moet de analyse van de resultaten worden uitgevoerd op basis van het meetkundige gemiddelde van de concentratie gedurende de blootstelling of op basis van modellen waarmee de afname van de concentratie van de teststof wordt beschreven (3) (7).

▼M6

40. De groeiremmingstest met algen is een dynamischer testsysteem dan de meeste andere tests op aquatische toxiciteit op korte termijn. Dit betekent dat de feitelijke blootstellingsconcentraties moeilijk te bepalen kunnen zijn, vooral voor adsorberende chemische stoffen die bij lage concentraties worden getest. In die gevallen betekent het verdwijnen van de teststof uit de oplossing door adsorptie aan de toenemende biomassa van de algen niet dat deze uit het testsysteem verloren gaat. Wanneer het resultaat van de test wordt geanalyseerd, moet worden gecontroleerd of een daling van de concentratie van de teststof in de loop van de test gevolgd wordt door een daling van de groeiremming. Als dit het geval is, kan worden overwogen een geschikt model te gebruiken om de daling van de concentratie van de teststof te beschrijven (7). Als dit niet het geval is, zal het wellicht correct zijn om de analyse van de resultaten op basis van de (nominale of gemeten) beginconcentraties uit te voeren.

Andere opmerkingen

41. Er moet een microscopische observatie worden uitgevoerd om na te gaan of de entcultuur een normaal en gezond uiterlijk heeft en om een eventueel abnormaal uiterlijk van de algen (wellicht veroorzaakt door de blootstelling aan de teststof) aan het eind van de test te detecteren.

Limiettest

42. Onder bepaalde omstandigheden, bijvoorbeeld wanneer een oriënterende test erop wijst dat de teststof in concentraties tot 100 mg/l of tot de oplosbaarheidsgrens in het testmedium (als deze lager ligt) geen toxische effecten heeft, kan een limiettest worden uitgevoerd, waarbij de respons in een controlegroep en één dosisgroep (100 mg/ml of een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheidsgrens) wordt vergeleken. Er wordt sterk aanbevolen dit te ondersteunen met een analyse van de blootstellingsconcentratie. Alle in het voorgaande beschreven testomstandigheden en geldigheidscriteria zijn ook van toepassing bij een limiettest, alleen moet het aantal replicaten in de dosisgroep ten minste zes zijn. De responsvariabelen in de controlegroep en de dosisgroep kunnen worden geanalyseerd met behulp van een statistische toets om gemiddelden te vergelijken, bijvoorbeeld een t-toets van Student. Als de variantie in de twee groepen niet gelijk is, moet een aangepaste t-toets voor ongelijke varianties worden uitgevoerd.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Uitzetting van de groeicurven

43. De biomassa in de testvaten kan worden uitgedrukt in eenheden van de voor de meting gebruikte vervangende parameter (bv. aantal cellen of fluorescentie).

44. Maak een tabel met de geschatte biomassaconcentratie in de testculturen en de controles en daarnaast de concentraties teststof en de meettijdstippen met een resolutie van ten minste hele uren om zo de groeicurven uit te kunnen zetten. Bij deze eerste stap kan zowel een logaritmische schaal als een lineaire schaal nuttig zijn, maar een logaritmische schaal is verplicht en levert meestal een betere presentatie op van de variaties in het groeipatroon gedurende de testperiode. Wanneer de exponentiële groei op een logaritmische schaal wordt uitgezet, levert dit een rechte lijn op met als helling de specifieke groeisnelheid.

45. Ga met behulp van de curven na of de controleculturen gedurende de hele test met de verwachte snelheid exponentieel groeien. Kijk met een kritisch oog naar alle datapunten en de vorm van de grafieken en controleer de ruwe gegevens en procedures op mogelijke fouten. Controleer vooral punten waarvan de afwijking het gevolg van een systematische fout lijkt. Als duidelijk is dat er sprake is van fouten in de procedures en/of deze zeer

▼M6

waarschijnlijk zijn, moet het desbetreffende punt als uitbijter worden beschouwd en niet in de verdere statistische analyses worden opgenomen. (Een algenconcentratie van nul in een van de twee of drie replicaatvaten kan erop wijzen dat het testvat niet correct beënt is of niet goed schoongemaakt was.) In het verslag moet duidelijk worden vermeld om welke redenen een bepaald punt als uitbijter is beschouwd. Alleen (zeldzame) fouten in de procedures worden als reden geaccepteerd en dit geldt niet voor alleen een slechte precisie. Statistische procedures om te bepalen wat een uitbijter is, zijn voor een probleem van dit type maar beperkt bruikbaar en kunnen niet als vervanging voor een deskundig oordeel worden gebruikt. Uitbijters (als zodanig gemarkeerd) moeten bij voorkeur niet worden verwijderd uit later weergegeven grafieken of tabellen met gegevens.

Responsvariabelen

46. De test is bedoeld om de effecten van de teststof op de groei van algen te bepalen. In deze testmethode worden twee responsvariabelen beschreven, aangezien verschillende rechtsgebieden verschillende voorkeuren en behoeften qua regelgeving hebben. De testresultaten zijn alleen in alle rechtsgebieden aanvaardbaar als de effecten met beide onderstaande responsvariabelen a) en b) worden bepaald:

(a) Gemiddelde specifieke groeisnelheid: deze responsvariabele wordt berekend op basis van de logaritmische toename van de biomassa gedurende de testperiode, uitgedrukt per dag;

(b) Opbrengst: dit is de biomassa aan het eind van de test verminderd met de biomassa aan het begin.

47. Er moet worden opgemerkt dat de met behulp van deze twee responsvariabelen berekende waarden voor de toxiciteit niet vergelijkbaar zijn, en bij gebruik van de resultaten van de test moet met dit verschil rekening worden gehouden. Vanwege de mathematische grondslagen van de respectieve benaderingen zullen de EC_x -waarden op basis van de gemiddelde specifieke groeisnelheid (E_rC_x) in het algemeen hoger zijn dan de resultaten op basis van de opbrengst (E_yC_x) als de testomstandigheden van deze testmethode worden aangehouden. Dit moet niet worden opgevat als een verschil in gevoeligheid tussen de twee responsvariabelen, maar zuiver als een mathematisch verschil tussen de waarden. Het begrip gemiddelde specifieke groeisnelheid is gebaseerd op het algemene exponentiële groeipatroon van algen in niet-beperkte culturen, waarbij de toxiciteit wordt geschat op basis van de effecten op de groeisnelheid, zonder dat deze afhankelijk is van het absolute niveau van de specifieke groeisnelheid van de controle, van de helling van de concentratie-responscurve of van de duur van de test. De resultaten op basis van de responsvariabele opbrengst zijn daarentegen afhankelijk van al deze andere variabelen. De E_yC_x is afhankelijk van de specifieke groeisnelheid van de bij elke test gebruikte algensoort en van de maximale specifieke groeisnelheid die van soort tot soort en zelfs van stam tot stam kan verschillen. Deze responsvariabele moet niet worden gebruikt om de gevoeligheid voor toxische stoffen te vergelijken tussen algensoorten en zelfs niet tussen verschillende stammen. De wetenschap geeft weliswaar de voorkeur aan het gebruik van de gemiddelde specifieke groeisnelheid om de toxiciteit te schatten, maar in deze testmethode wordt ook de bepaling van de toxiciteit op basis van de opbrengst opgenomen om te voldoen aan de vereisten in de huidige regelgeving in bepaalde landen.

Gemiddelde groeisnelheid

48. De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een bepaalde periode wordt voor elk testvat (controle of behandeld) met de volgende vergelijking berekend als de logaritmische toename van de biomassa [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dag}^{-1}) \qquad [1],$$

waarbij

μ_{i-j} de gemiddelde specifieke groeisnelheid van tijdstip i tot tijdstip j;

X_i de biomassa op tijdstip i;

X_j de biomassa op tijdstip j.

Voor elke dosisgroep en controlegroep wordt een gemiddelde waarde voor de groeisnelheid berekend en een waarde voor de variantie.

49. Bereken de gemiddelde specifieke groeisnelheid over de hele duur van de test (normaal gesproken dagen 0-3) met de nominaal geënte biomassa als startwaarde en niet een gemeten startwaarde, omdat op deze manier meestal een grotere precisie wordt bereikt. Als de voor de meting van de biomassa gebruikte apparatuur een voldoende precieze bepaling van de geringe biomassa in het inoculum mogelijk maakt (bv. een flowcytometer), kan de gemeten aanvankelijke biomassaconcentratie worden gebruikt. Bepaal tevens de partiële groeisnelheid, berekend als de specifieke groeisnelheden voor elke dag gedurende de test (dagen 0-1, 1-2 en 2-3) en ga na of de controlegroeisnelheid constant blijft (zie de geldigheidscriteria in punt 11). Wanneer de specifieke groeisnelheid op dag 1 significant lager is dan de totale gemiddelde specifieke groeisnelheid, wijst dit op een lag-fase. Een lag-fase kan in controleculturen worden beperkt en vrijwel geëlimineerd door een juiste vermeerdering van de voorcultuur, maar een lag-fase bij behandelde culturen kan wijzen op herstel na aanvankelijke toxische stress of een verminderde blootstelling door verlies van de teststof (bijvoorbeeld door sorptie aan de algenbiomassa) na de aanvankelijke blootstelling. Dit betekent dat de partiële groeisnelheid kan worden bepaald om de effecten van de teststof gedurende de blootstellingsperiode te evalueren. Aanzienlijke verschillen tussen de partiële groeisnelheid en de gemiddelde groeisnelheid wijzen erop dat de groei niet voortdurend exponentieel is en dat de groeicurven grondig moeten worden bestudeerd.

50. De procentuele remming van de groeisnelheid wordt voor elk dosisreplicaat berekend met de volgende vergelijking [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

waarbij

$\%I_r$ procentuele remming van de gemiddelde specifieke groeisnelheid;

μ_C gemiddelde waarde van de gemiddelde specifieke groeisnelheid (μ) in de controlegroep;

μ_T gemiddelde specifieke groeisnelheid in de dosisgroep.

51. Wanneer oplosmiddelen worden gebruikt om de teststof in oplossing te brengen, moeten bij de berekening van de procentuele remming niet de controles zonder oplosmiddel maar de oplosmiddelcontroles worden gebruikt.

Opbrengst

52. De opbrengst wordt voor elk testvat van de dosis- en controlegroepen berekend als de biomassa aan het eind van de test verminderd met de biomassa aan het begin. Voor elke testconcentratie en controle wordt een gemiddelde waarde voor de opbrengst berekend en een waarde voor de variantie. De procentuele remming van de opbrengst ($\%I_y$) kan voor elk dosisreplicaat als volgt worden berekend:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

waarbij

$\%\ I_y$ procentuele remming van de opbrengst;

Y_C gemiddelde waarde van de opbrengst in de controlegroep;

Y_T waarde voor de opbrengst in de dosisgroep.

Uitzetting van de concentratie-responscurve

53. De procentuele remming wordt uitgezet tegen de logaritme van de concentratie van de teststof en de curve wordt zorgvuldig bestudeerd, waarbij elk punt dat in de eerste fase als uitbijter is beschouwd, niet wordt gebruikt. Trek op het oog of met behulp van computerinterpolatie een vloeiende lijn door de punten om een eerste indruk te krijgen van de concentratie-responsrelatie en gebruik daarna een gedetailleerdere methode, bij voorkeur een gecomputeriseerde statistische methode. Afhankelijk van het beoogde gebruik van de gegevens, de kwaliteit (precisie) van de gegevens en de hoeveelheid gegevens alsmede de beschikbaarheid van instrumenten voor gegevensanalyse kan worden besloten (soms volledig terecht) de gegevensanalyse in deze fase te beëindigen en de kerncijfers EC_{50} en EC_{10} (en/of EC_{20}) simpelweg uit de op het oog getrokken curve af te lezen (zie ook de onderstaande tekst over stimulerende effecten). Geldige redenen om niet gebruik te maken van een statistische methode kunnen bijvoorbeeld zijn:

— De gegevens zijn niet geschikt voor gecomputeriseerde methoden om betrouwbaarder resultaten te verkrijgen dan op grond van een deskundig oordeel mogelijk is — in dergelijke situaties is het mogelijk dat sommige computerprogramma's zelfs geen betrouwbare oplossing opleveren (iteraties die wellicht niet convergeren enz.).

— Een respons waarbij de groei wordt gestimuleerd, kan met de beschikbare computerprogramma's niet afdoende worden verwerkt (zie hieronder).

Statistische procedures

54. Het is de bedoeling om met behulp van regressieanalyse een kwantitatieve concentratie-responsrelatie te verkrijgen. Het is mogelijk een gewogen lineaire regressie te gebruiken nadat op de responsgegevens een lineariserende transformatie is uitgevoerd, bijvoorbeeld naar probit-, logit- of Weibull-eenheden (8), maar de voorkeur wordt gegeven aan niet-lineaire regressieprocedures, die beter omgaan met onvermijdelijke onregelmatigheden in gegevens en afwijkingen van uniforme verdelingen. In de buurt van het nulpunt of totale remming kunnen dergelijke onregelmatigheden door de transformatie worden uitvergroot en kunnen ze de analyse storen (8). Er moet worden opgemerkt dat standaardmethoden voor analyses met behulp van probit-, logit- of Weibull-transformaties bedoeld zijn voor gebruik bij een binaire respons (bv. sterfte of overleven) en moeten worden aangepast om voor groei- of biomassadata te kunnen worden gebruikt. Specifieke procedures voor de bepaling van EC_x-waarden uit continue data zijn te vinden in (9), (10) en (11). Het gebruik van niet-lineaire regressieanalyse wordt in aanhangsel 5 nader beschreven.

55. Voor elke te analyseren responsvariabele wordt de concentratie-responsrelatie gebruikt voor de berekening van puntschattingen van EC_x-waarden. Waar mogelijk moeten voor elke schatting de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen worden bepaald. De kwaliteit van de fitting van de responsgegevens op het regressiemodel moet grafisch of statistisch worden bepaald. De regressieanalyse moet met responsen van individuele replicaten worden uitgevoerd en niet met gemiddelden van dosisgroepen. Als niet-lineaire fitting van de

▼M6

curve echter moeilijk is of niet lukt vanwege een te grote spreiding in de gegevens, kan het probleem worden omzeild door de regressie uit te voeren op groepsgemiddelden om zo op praktische wijze de invloed van vermoedelijke uitbijters te beperken. Wanneer deze mogelijkheid wordt gebruikt, moet dit in het testverslag worden vermeld als een afwijking van de normale procedure, omdat fitting van de curve met individuele replicaten geen goede resultaten opleverde.

56. Als de beschikbare regressiemodellen/methoden niet geschikt zijn voor de gegevens, kunnen de EC_{50} en de betrouwbaarheidsgrenzen ook worden bepaald met behulp van lineaire interpolatie met bootstrapping (13).

57. Voor de bepaling van de LOEC en daaruit de NOEC, voor de effecten van de teststof op de groeisnelheid, moeten de gemiddelden van de dosisgroepen worden vergeleken met behulp van variantieanalyse-technieken (ANOVA). Het gemiddelde voor elke concentratie moet dan worden vergeleken met het gemiddelde van de controlegroep met behulp van een geschikte methode voor meervoudige vergelijking of trendtoets. Hiervoor kan de Dunnett- of Williams-toets geschikt zijn (12) (14) (15) (16) (17). Er moet worden bepaald of de ANOVA-aanname van homogeniteit van variantie opgaat. Deze bepaling kan grafisch worden uitgevoerd of met een formele toets (17). Hiervoor kan de Levene- of Bartlett-toets worden gebruikt. Wanneer de aanname van homogeniteit van variantie niet opgaat, kan dit soms worden gecorrigeerd door logaritmische transformatie van de gegevens. Als de heterogeniteit van variantie extreem is en niet door transformatie kan worden gecorrigeerd, moet een analyse met methoden als de stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere worden overwogen. Aanvullende richtsnoeren voor het bepalen van de NOEC zijn te vinden in (11).

58. Recente wetenschappelijke ontwikkelingen hebben geleid tot een aanbeveling om het begrip NOEC niet langer te gebruiken en te vervangen door op regressie gebaseerde puntschattingen van EC_x. Voor deze algentest is geen geschikte waarde voor x vastgesteld. Een interval van 10 tot 20 % lijkt geschikt (afhankelijk van de gekozen responsvariabele) en bij voorkeur moeten zowel de EC_{10} als de EC_{20} worden gerapporteerd.

Groeistimulering

59. Soms wordt bij lage concentraties groeistimulering (negatieve remming) waargenomen. Dit kan een gevolg zijn van hormese („toxische stimulering”) of van de toevoeging van stimulerende groeifactoren met het testmateriaal aan het gebruikte minimale medium. De toevoeging van anorganische nutriënten zou geen directe effecten mogen hebben omdat het testmedium gedurende de hele test een overschot aan nutriënten zou moeten bevatten. Stimulering bij lage dosis kan bij EC_{50}-berekeningen meestal worden genegeerd, tenzij deze stimulering extreem is. Als de stimulering extreem is of als een EC_x-waarde voor een lage x moet worden berekend, kunnen echter speciale procedures nodig zijn. Schrapping van een respons met stimulering uit de gegevensanalyse moet indien mogelijk worden vermeden en als de beschikbare software voor fitting van de curve een lichte stimulering niet accepteert, kan lineaire interpolatie met bootstrapping worden gebruikt. Als de stimulering extreem is, kan gebruik van een hormese-model worden overwogen (18).

Niet-toxische groeiremming

60. Wanneer het testmateriaal licht absorbeert, kan dit tot een verlaging van de groeisnelheid leiden omdat schaduwwerking de beschikbare hoeveelheid licht vermindert. Dergelijke fysische effecten moeten door aanpassing van de testomstandigheden van toxische effecten worden gescheiden en apart worden gerapporteerd. Een leidraad hiervoor is te vinden in (2) en (3).

TESTVERSLAG

61. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

▼**M6**

Teststof:

— fysische aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen, waaronder de oplosbaarheidsgrens in water;

— chemische identificatiegegevens (bv. CAS-nummer), waaronder de zuiverheid (verontreinigingen).

Geteste soort:

— stam, leverancier of herkomst en de gebruikte kweekomstandigheden.

Testomstandigheden:

— begindatum en duur van de test;

— beschrijving van de testopzet: testvaten, cultuurvolumes, dichtheid van de biomassa aan het begin van de test;

— samenstelling van het medium;

— testconcentraties en replicaten (bv. aantal replicaten, aantal testconcentraties en reden van de gebruikte meetkundige reeks);

— beschrijving van de bereiding van testoplossingen met vermelding van het gebruik van oplosmiddelen enz.;

— kweekapparatuur;

— intensiteit en eigenschappen van het licht (bron, homogeniteit);

— temperatuur;

— geteste concentraties: de nominale testconcentraties en eventuele resultaten van analyses om de concentratie van de teststof in de testvaten te bepalen. De recovery van de methode en de kwantificeringsgrens in de testmatrix moeten worden gerapporteerd;

— alle afwijkingen van deze testmethode;

— de methode voor de bepaling van de biomassa en bewijsmateriaal voor de correlatie tussen de gemeten parameter en het drooggewicht.

Resultaten:

— de pH aan het begin en het eind van de test voor alle dosisgroepen;

— de biomassa voor elke kolf bij elk meetpunt en de methode voor het meten van de biomassa;

— de groeicurven (biomassa uitgezet tegen de tijd);

— de berekende responsvariabelen voor elk dosisreplicaat, met het gemiddelde en de variatiecoëfficiënt voor de replicaten;

— een grafische weergave van de concentratie-effectrelatie;

▼M6

— toxiciteitsschattingen voor responsvariabelen, zoals EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} en de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen. De LOEC en de NOEC, indien deze zijn berekend, en de voor de bepaling daarvan gebruikte statistische methoden;

— als ANOVA is gebruikt, de grootte van het effect dat kan worden gedetecteerd (bv. het minst significante verschil);

— een eventuele stimulering van de groei, als deze bij een behandeling is geconstateerd;

— andere waargenomen effecten, zoals morfologische veranderingen van de algen;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van een eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.

(2) International Organisation for Standardisation (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, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and 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. and 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. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., 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. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D. and 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. Organisation for Economic Co-operation and Development, 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. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Aanhangsel 1

Definities

De volgende definities en afkortingen zijn voor deze testmethode relevant:

Biomassa: het drooggewicht van het levende materiaal in een populatie per volume-eenheid, bv. mg algen/liter testoplossing. Meestal wordt „biomassa" als massa gedefinieerd, maar in de context van deze test wordt de eenheid massa per volume gebruikt. Bovendien wordt de biomassa bij deze test meestal gemeten in vervangende eenheden, zoals aantal cellen of fluorescentie, en ook deze eenheden kunnen onder de term „biomassa" worden verstaan.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Variatiecoëfficiënt: een dimensieloze maat voor de variabiliteit van een parameter, gedefinieerd als het quotiënt van standaardafwijking en gemiddelde. Dit quotiënt kan ook als percentage worden uitgedrukt. De gemiddelde variatiecoëfficiënt van de gemiddelde specifieke groeisnelheid in replicaten van controleculturen moet als volgt worden berekend:

1. bereken de procentuele variatiecoëfficiënt van de gemiddelde specifieke groeisnelheid uit de dagelijkse/partiële groeisnelheid in de verschillende replicaten;

2. bereken de gemiddelde waarde van alle onder punt 1 berekende waarden; dit geeft de gemiddelde variatiecoëfficiënt van de dagelijkse/partiële specifieke groeisnelheid in replicaten van controleculturen.

EC_x: de concentratie van de in het testmedium opgeloste teststof die binnen een bepaalde blootstellingsperiode (die expliciet moet worden vermeld als deze afwijkt van de volledige of normale duur van de test) leidt tot een afname van de groei van het testorganisme met x % (bv. 50 %). Om ondubbelzinnig aan te geven of een EC-waarde gebaseerd is op de groeisnelheid ('growth rate') of de opbrengst ('yield'), worden respectievelijk de symbolen „E_rC" en „E_yC" gebruikt.

Groeimedium: het volledige kunstmatige kweekmedium waarin de algen gedurende de blootstelling aan de teststof groeien. De teststof wordt normaal gesproken in het medium opgelost.

Groeisnelheid: (gemiddelde specifieke groeisnelheid): de logaritmische toename van de biomassa gedurende de blootstellingsperiode.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): de laagste geteste concentratie waarbij wordt waargenomen dat de stof binnen een bepaalde blootstellingstijd in vergelijking met de controle tot een statistisch significante afname van de groei ($p < 0,05$) leidt. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat ten minste gelijk is aan het bij de LOEC waargenomen effect. Wanneer niet aan deze twee voorwaarden kan worden voldaan, moet een volledige toelichting worden gegeven op de wijze waarop de LOEC (en dus de NOEC) is bepaald.

NOEC (No Observed Effect Concentration): de testconcentratie die direct onder de LOEC ligt.

Responsvariabele: een variabele voor de bepaling van de toxiciteit, met uiteenlopende berekeningsmethoden afgeleid van de gemeten parameters voor de biomassa. Voor deze testmethode worden de responsvariabelen groeisnelheid en opbrengst afgeleid van de direct gemeten biomassa of een van de vermelde vervangende eenheden.

▼**M6**

Specifieke groeisnelheid: een responsvariabele die wordt gedefinieerd als het quotiënt van het verschil tussen de natuurlijke logaritmen van een observatieparameter (in deze testmethode de biomassa) en de betrokken tijdsduur.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

Opbrengst: de waarde van een meetvariabele aan het eind van de blootstellingstijd, verminderd met de waarde van de meetvariabele aan het begin van de blootstellingstijd, waarmee de toename van de biomassa gedurende de test wordt uitgedrukt.

▼M6

Aanhangsel 2

Stammen waarvan is aangetoond dat ze geschikt zijn voor de test

Groene algen

Pseudokirchneriella subcapitata (voorheen bekend als *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (voorheen bekend als *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Diatomeeën

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobacteriën

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Bronnen van stammen

De aanbevolen stammen zijn in culturen met één algensoort verkrijgbaar bij de volgende collecties (in alfabetische volgorde):

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
Verenigd Koninkrijk

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Inst. Plant Physiology
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
DUITSLAND

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
V.S.

▼M6

Uiterlijk en kenmerken van de aanbevolen soorten

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Uiterlijk	Gekromde, gedraaide losse cellen	Ovale, meestal losse cellen	Staafjes	ketens van ovale cellen	Staafjes
Grootte (L × W) in µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Celvolume (μm^3/cel)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2.5 (2)
Drooggewicht cel (mg/cel)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Groeisnelheid (3) (dag^{-1})	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0 - 2,4

(1) Gemeten met elektronische deeltjesteller.
(2) Berekend op grond van grootte.
(3) Meest frequent waargenomen groeisnelheid in OESO-medium bij een lichtintensiteit van ongeveer 70 $\mu^{-2} \cdot s^{-1}$ en 21 °C.

Specifieke aanbevelingen voor het kweken en behandelen van de voor de test aanbevolen soorten

Pseudokirchneriella subcapitata en Desmodesmus subspicatus

Deze groene algen zijn in het algemeen gemakkelijk in verschillende kweekmedia te kweken. Bij de cultuurcollecties is informatie verkrijgbaar over geschikte media. De cellen zijn normaal gesproken solitair en de celdichtheid kan gemakkelijk worden gemeten met behulp van een elektronische deeltjesteller of een microscoop.

Anabaena flos-aquae

Voor het bewaren van een stamcultuur kunnen verschillende groeimedia worden gebruikt. Het is vooral belangrijk te voorkomen dat de groei in de log-fase voorbij is voordat de batchcultuur wordt overgezet, omdat herstel op dit punt moeilijk is.

Anabaena flos-aquae ontwikkelt klonten met geneste ketens van cellen. De omvang van deze klonten is afhankelijk van de kweekomstandigheden. Het kan nodig zijn deze klonten in stukken te breken wanneer voor de bepaling van biomassa telling met een microscoop of een elektronische deeltjesteller wordt gebruikt.

Ultrasoonbehandeling van submonsters kan worden gebruikt om ketens in stukken te breken teneinde de variabiliteit bij het tellen te verminderen. Als deze behandeling langer duurt dan nodig is om de ketens in stukken te breken, kunnen de cellen uiteenvallen. De intensiteit en de duur van de behandeling moeten voor elke dosisgroep identiek zijn.

Tel genoeg velden op de hemocytometer (ten minste 400 cellen) om de variabiliteit te compenseren. Dit zal de betrouwbaarheid van bepaling van de dichtheid met een microscoop verhogen.

Voor de bepaling van het totale celvolume van Anabaena kan, nadat de celketens door voorzichtig ultrasoon behandelen in stukken zijn gebroken, een elektronische deeltjesteller worden gebruikt. De ultrasoon-energie moet worden aangepast om uiteenvallen van de cellen te voorkomen.

Gebruik een vortex-mixer of soortgelijke geschikte methoden om ervoor te zorgen dat de voor het beënten van de testvaten gebruikte algensuspensie goed gemengd en homogeen is.

▼M6

De testvaten worden op een schudtafel (draaiend of heen-en-weer-gaand) met ongeveer 150 bewegingen per minuut geplaatst. Ook periodiek schudden kan worden gebruikt om de neiging van Anabaena om samen te klonteren tegen te gaan. Als er klonten ontstaan, moet erop worden gelet dat de monsters voor de meting van de biomassa representatief zijn. Krachtig schudden vóór de bemonstering kan nodig zijn om klonten met algen uiteen te laten vallen.

Synechococcus leopoliensis

Voor het bewaren van een stamcultuur kunnen verschillende groeimedia worden gebruikt. Bij de cultuurcollecties is informatie verkrijgbaar over geschikte media.

Synechococcus leopoliensis groeit als solitaire staafvormige cellen. De cellen zijn heel klein en dit compliceert het gebruik van een microscoop voor celtellingen om de biomassa te meten. Elektronische deeltjestellers die geschikt zijn voor het tellen van deeltjes vanaf een grootte van ongeveer 1 μm, zijn nuttig. Ook in vitro fluorimetrische bepaling is bruikbaar.

Navicula pelliculosa

Voor het bewaren van een stamcultuur kunnen verschillende groeimedia worden gebruikt. Bij de cultuurcollecties is informatie verkrijgbaar over geschikte media. Let op dat het medium silicaat moet bevatten.

Navicula pelliculosa kan onder bepaalde groeiomstandigheden klonten vormen. Door de vorming van lipiden hebben de algencellen soms de neiging zich in de oppervlaktelaag op te hopen. Onder deze omstandigheden moeten er bij het nemen van submonsters voor de bepaling van de biomassa speciale maatregelen worden genomen om representatieve monsters te krijgen. Krachtig schudden, bijvoorbeeld met een vortex-mixer, kan nodig zijn.

▼**M6**

Aanhangsel 3

Groeimedia

Een van de volgende twee groeimedia kan worden gebruikt:

— OESO-medium: oorspronkelijk medium van OESO TG 201, tevens overeenkomstig ISO 8692

— U.S. EPA-medium AAP, tevens overeenkomstig ASTM.

Bij de bereiding van deze media moeten reagentia van p.a.-kwaliteit en gedeïoniseerd water worden gebruikt.

Samenstelling van het AAP-medium (US. EPA) en het medium van OESO TG 201

Component	AAP		OESO	
	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	

De molaire verhouding EDTA/ijzer is iets hoger dan 1. Dit voorkomt dat ijzer neerslaat en beperkt tevens chelaatvorming van ionen van zware metalen tot een minimum.

In de test met het diatomee *Navicula pelliculosa* moeten beide media worden aangevuld met $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ tot een concentratie van 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

De pH van het medium wordt verkregen bij evenwicht tussen het carbonaatsysteem van het medium en de partiële druk van CO_2 in de lucht. Een bruikbare relatie tussen de pH bij 25 °C en de molaire bicarbonaat-concentratie is:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

Bij 15 mg $NaHCO_3$/l is pH_{eq} = 7,5 (U.S. EPA-medium) en bij 50 mg $NaHCO_3$/l is pH_{eq} = 8,1 (OESO-medium).

Samenstelling in elementen van de testmedia

Element	AAP	OESO
	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

Bereiding van het OESO-medium

Nutriënt	Concentratie in de stamoplossing
Stamoplossing 1: macronutriënten	
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
Stamoplossing 2: ijzer	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Stamoplossing 3: spoorelementen	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Nutriënt	Concentratie in de stamoplossing
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Stamoplossing 4: bicarbonaat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Steriliseer de stamoplossingen door membraanfiltratie (gemiddelde poriediameter 0,2 μm) of in de autoclaaf (120 °C, 15 min). Bewaar de oplossingen in het donker bij 4 °C.

Stamoplossingen 2 en 4 mogen niet in de autoclaaf worden gesteriliseerd; steriliseer ze door middel van membraanfiltratie.

Bereid een groeimedium door toevoeging van de benodigde volumes van stamoplossingen 1-4 aan water:

Voeg aan 500 ml gesteriliseerd water toe:

10 ml stamoplossing 1

1 ml stamoplossing 2

1 ml stamoplossing 3

1 ml stamoplossing 4

Vul met gesteriliseerd water aan tot 1 000 ml.

Laat het medium lang genoeg staan om het evenwicht met CO_2 in de lucht zich te laten instellen, indien nodig door enkele uren steriele gefilterde lucht door te leiden.

Bereiding van U.S. EPA-medium

1. Voeg 1 ml van elke stamoplossing in *2.1–2.7* toe aan ongeveer 900 ml gedeïoniseerd of gedestilleerd water en vul aan tot 1 liter.

2. De macronutriënten-stamoplossingen worden bereid door de volgende reagentia op te lossen in 500 ml gedeïoniseerd of gedestilleerd water. De reagentia *2.1, 2.2, 2.3,* en *2.4* kunnen in één stamoplossing worden gecombineerd.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2,205 g.
2.4	Micronutriënten-stamoplossing (zie 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	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Zie opmerking 1.

▼**M6**

Opmerking 1: Alleen voor diatomeeën-testsoorten gebruiken. Kan rechtstreeks worden toegevoegd (202,4 mg) of als stamoplossing tot een uiteindelijke concentratie van 20 mg Si/l in het medium.

3. De micronutriënten-stamoplossing wordt bereid door de volgende reagentia op te lossen in 500 ml gedeïoniseerd of gedestilleerd water:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.	
3.3	$NaNO_2$	1,635 mg.	
3.4	$MgCl_3 \cdot 6H_2O$	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(ethyleendinitrilo) tetraacetaat].
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	Zie opmerking 2.

Opmerking 2: Alleen in medium voor stamculturen van diatomeeënsoorten gebruiken

4. Breng de pH op 7,5 ± 0,1 met 0,1 *N* of 1,0 *N* NaOH of HCl.

5. Filtreer de media in een steriele fles over een 0,22 μm membraanfilter (als een deeltjesteller wordt gebruikt) of een 0,45 μm filter als er geen deeltjesteller wordt gebruikt.

6. Bewaar het medium in het donker bij ongeveer 4 °C tot het wordt gebruikt.

▼M6

Aanhangsel 4

Voorbeeld van een procedure voor het kweken van algen

Algemene opmerkingen

Het doel van het kweken op basis van de volgende procedure is het verkrijgen van algenculturen voor toxiciteitstesten.

Gebruik geschikte methoden om ervoor te zorgen dat de algenculturen niet met bacteriën worden besmet. Axenische culturen kunnen wenselijk zijn, maar er moeten culturen met één algensoort worden gemaakt en gebruikt.

Alle handelingen dienen onder steriele omstandigheden te worden uitgevoerd om besmetting met bacteriën of andere algen te voorkomen.

Apparatuur en materiaal

Zie in de testmethode onder Apparatuur.

Procedure voor het verkrijgen van algenculturen

Bereiding van de nutriëntenoplossingen (media):

Alle nutriëntzouten van het medium worden bereid als geconcentreerde stamoplossing en koel en in het donker bewaard. Deze oplossingen worden door filtratie of in een autoclaaf gesteriliseerd.

Het medium wordt bereid door de juiste hoeveelheid stamoplossing aan steriel gedestilleerd water toe te voegen, waarbij moet worden opgelet dat besmetting wordt voorkomen. Voor vast medium wordt 0,8 % agar toegevoegd.

Stamculturen:

Stamculturen zijn kleine algenculturen die regelmatig op vers medium worden overgezet om zo als nieuw uitgangsmateriaal voor tests te dienen. Indien de culturen niet regelmatig worden gebruikt, worden zij uitgestreken in schuine agarbuizen. Deze worden ten minste éénmaal per twee maanden overgebracht op vers medium.

De stamculturen worden gekweekt in erlenmeyers met het geschikte medium (volume ongeveer 100 ml). Wanneer de algen bij 20 °C met continue verlichting worden geïncubeerd, is wekelijks overzetten vereist.

Bij het overzetten wordt een hoeveelheid „oude” cultuur met steriele pipetten zodanig overgebracht naar een kolf met vers medium dat de beginconcentratie van de snel groeiende soort ongeveer 100 maal kleiner is dan in de oude cultuur.

De groeisnelheid van een soort kan uit de groeicurve worden bepaald. Indien bekend, is het mogelijk de dichtheid te schatten waarbij de cultuur moet worden overgezet naar het nieuwe medium. Dit dient te geschieden voordat de cultuur de afstervingsfase bereikt.

Voorcultuur:

De voorcultuur is bedoeld om een aantal algen te krijgen dat geschikt is voor het beënten van de testculturen. De voorcultuur wordt geïncubeerd onder de testomstandigheden en wordt gebruikt terwijl deze nog exponentieel groeit, normaal gesproken na een incubatieperiode van 2 tot 4 dagen. Wanneer de algenculturen misvormde of abnormale cellen bevatten, moeten ze worden afgekeurd.

▼M6

Aanhangsel 5

Gegevensanalyse door niet-lineaire regressie

Algemene overwegingen

De respons bij tests met algen en andere groeitests met micro-organismen (groei van biomassa) is van nature een continue of metrische variabele — een processnelheid als de groeisnelheid wordt gebruikt en de integraal over tijd als voor de hoeveelheid biomassa wordt gekozen. Beide worden vergeleken met de corresponderende gemiddelde respons van niet-blootgestelde controles waar de respons voor de gebruikte omstandigheden maximaal is, waarbij licht en temperatuur in de algentest de primaire bepalende factoren zijn. Het systeem is gedistribueerd of homogeen en de biomassa kan als een continuüm worden beschouwd zonder naar individuele cellen te kijken. De variantieverdeling van het type respons voor een dergelijk systeem houdt uitsluitend verband met experimentele factoren (meestal beschreven als lognormale of normale foutverdeling). Bij een karakteristieke binaire bioassay-respons wordt de tolerantie (meestal binomiaal verdeeld) van individuele organismen daarentegen vaak als de belangrijkste variantie-component beschouwd. In dit geval is de controlerespons nul of het achtergrondniveau.

In de ongecompliceerde situatie neemt de genormaliseerde of relatieve respons r monotoon af van 1 (geen remming) tot 0 (100 % remming). Hierbij dient te worden opgemerkt dat elke respons een bijbehorende fout heeft en dat een schijnbare negatieve remming uitsluitend ten gevolge van een toevalsfout kan worden berekend.

Regressieanalyse

Modellen:

Een regressieanalyse is gericht op een kwantitatieve beschrijving van de concentratie/responscurve in de vorm van een mathematische regressiefunctie $Y = f(C)$ of in de meeste gevallen $F(Z)$ waarbij $Z = \log C$. Met de inverse $C = f^{-1}(Y)$ kunnen EC_x-waarden, zoals de EC_{50}, de EC_{10} en de EC_{20}, en hun 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen worden berekend. Van verschillende eenvoudige mathematische functionele vormen is gebleken dat ze met succes kunnen worden gebruikt voor de beschrijving van het verband tussen concentratie en respons bij groeiremmingstests met algen. Hierbij gaat het bijvoorbeeld om de logistische vergelijking, de asymmetrische Weibull-vergelijking en de lognormale verdelingsfunctie; dit zijn allemaal sigmoïde curves die asymptotisch tot 1 naderen voor $C \rightarrow 0$ en tot 0 voor $C \rightarrow \infty$.

Het gebruik van continue drempelfunctiemodellen (bv. het model van Kooijman voor remming van de populatiegroei, Kooijman et al., 1996) is recent voorgesteld als alternatief voor asymptotische modellen. Dit model gaat uit van het ontbreken van effecten bij concentraties beneden een bepaald drempelwaarde, EC_0+, die wordt bepaald door extrapolatie van de concentratie/responscurve tot de concentratie-as met behulp van een eenvoudige continue functie die in het beginpunt niet differentieerbaar is.

Er moet worden opgemerkt dat de analyse een eenvoudige minimumbepaling van residuele kwadratensommen kan zijn (uitgaande van constante variantie) of van gewogen kwadratensommen als heterogeniteit van de variantie wordt gecompenseerd.

Procedure

De procedure kan als volgt worden geschetst: Kies een geschikte functionele vergelijking $Y = f(C)$ en fit deze met behulp van niet-lineaire regressie op de gegevens. Gebruik bij voorkeur de metingen van elke kolf afzonderlijk en niet de gemiddelden van de replicaten om zo veel mogelijk informatie uit de gegevens te

▼M6

kunnen halen. Anderzijds heeft de praktijk geleerd dat als de variantie hoog is, de gemiddelde waarden van de replicaten wellicht een robuustere mathematische bepaling opleveren, die minder wordt beïnvloed door toevallige fouten in de gegevens, dan wanneer elk datapunt afzonderlijk wordt gebruikt.

Teken de gefitte curve en de gemeten gegevens en kijk of de fitting van de curve geschikt is. Analyse van de residuen kan hiervoor een zeer geschikt instrument zijn. Als het gekozen functionele verband om de concentratie/responscurve te fitten niet de hele curve beschrijft of een bepaald essentieel deel niet goed beschrijft, zoals de respons bij lage concentraties, moet in plaats van een symmetrische een andere optie voor fitting van de curve worden gekozen, bijvoorbeeld een asymmetrische curve zoals de Weibull-functie. Negatieve remming kan problemen opleveren bij bijvoorbeeld de lognormale verdelingsfunctie en ook in dat geval is een andere regressiefunctie nodig. Er wordt niet aanbevolen aan dergelijke negatieve waarden de waarde 0 of een kleine positieve waarde toe te kennen, omdat dit de foutverdeling verstoort. Het kan nuttig zijn een aparte fitting van de curve voor bepaalde delen van de curve te maken, bijvoorbeeld het deel met een geringe remming voor de bepaling van $EC_{lage\ x}$-waarden. Bereken uit de gefitte vergelijking — door „inverse bepaling", $C = f^{-1}(Y)$ — karakteristieke puntramingen EC_x en rapporteer minimaal de EC_{50} en een of twee $EC_{lage\ x}$-waarden. De praktijk heeft geleerd dat de precisie van de algentest normaal gesproken een redelijk nauwkeurige bepaling bij 10 % remming mogelijk maakt als de datapunten volstaan, tenzij stimulering bij lage concentraties als storende factor optreedt. De precisie van een EC_{20}-waarde is vaak aanzienlijk beter dan die van een EC_{10}, omdat de EC_{20} meestal op het ongeveer lineaire deel van de centrale concentratie/responscurve ligt. Soms kan de EC_{10} vanwege groeistimulering moeilijk te interpreteren zijn. Dit betekent dat de EC_{10} weliswaar normaal gesproken met een afdoende nauwkeurigheid te bepalen is, maar dat toch wordt aanbevolen altijd ook de EC_{20} te rapporteren.

Wegingsfactoren

De toevallige variantie is in het algemeen niet constant en heeft meestal een evenredige component, zodat het de voorkeur verdient standaard een gewogen regressie uit te voeren. Meestal wordt aangenomen dat de wegingsfactoren voor een dergelijke analyse omgekeerd evenredig zijn met de variantie:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Veel regressieprogramma's bieden de mogelijkheid om een gewogen regressieanalyse uit te voeren, waarbij de wegingsfactoren in een tabel worden opgenomen. Wegingsfactoren moeten liefst worden genormaliseerd door ze met $n/\Sigma w_i$ te vermenigvuldigen (n is het aantal datapunten), zodat de som gelijk aan 1 is.

Normalisering van de respons

Normalisering met de gemiddelde controlerespons levert bepaalde principeproblemen op en leidt tot een nogal gecompliceerde variantiestructuur. Door de respons te delen door de gemiddelde controlerespons om de procentuele remming te berekenen wordt een extra fout geïntroduceerd, die wordt veroorzaakt door de fout in het controlegemiddelde. Tenzij deze fout te verwaarlozen is, moeten de wegingsfactoren in de regressie en betrouwbaarheidsgrenzen worden gecorrigeerd voor de covariantie met de controle (Draper en Smith, 1981). Er moet worden opgemerkt dat een hoge precisie bij de bepaalde gemiddelde controlerespons belangrijk is om de algehele variantie voor de relatieve respons tot een minimum te beperken. Deze variantie is

(subscript i verwijst naar concentratie i en subscript 0 naar de controles):

$$Yi = \text{Relatieve respons} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

met variantie: $Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

Aangezien $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$ and $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$

wordt met een normale datadistributie en m_i en m_0-replicaten: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

de totale variantie van de relatieve respons Y_i:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

De fout in het controlegemiddelde is omgekeerd evenredig met de vierkantswortel van het gemiddelde aantal controleduplicaten en soms kan het gerechtvaardigd zijn om historische gegevens mee te nemen en zo de fout sterk te verlagen. Het is ook mogelijk de gegevens niet te normaliseren en de absolute respons, inclusief de controlerespons, te fitten maar de controlerespons als extra parameter te introduceren voor de fitting met niet-lineaire regressie. Bij een gebruikelijke regressievergelijking met twee parameters moeten met deze methode drie parameters worden gefit, zodat er meer datapunten nodig zijn dan bij niet-lineaire regressie met gegevens die met een vooraf bepaalde controlerespons worden genormaliseerd.

Inverse betrouwbaarheidsintervallen

De berekening van betrouwbaarheidsintervallen voor niet-lineaire regressie met behulp van inverse bepaling is vrij gecompliceerd en meestal niet als standaardoptie beschikbaar in normale statistische computerprogrammapakketten. Benaderde betrouwbaarheidsgrenzen kunnen worden verkregen met behulp van standaardprogramma's voor niet-lineaire regressie met herparametrisering (Bruce en Versteeg, 1992), hetgeen inhoudt dat de mathematische vergelijking moet worden herschreven met de gewenste puntbepalingen, bijvoorbeeld de EC_{10} en de EC_{50} als de te bepalen parameters. (Neem als functie I = f (α, β, concentratie) en gebruik de definitierelaties f (α, β, EC_{10}) = 0,1 en f (α, β, EC_{50}) = 0,5 om f (α, β, concentratie) te substitueren door een gelijkwaardige functie g (EC_{10}, EC_{50}, concentratie).

Een directere berekening (Andersen et al, 1998) wordt uitgevoerd door de oorspronkelijke vergelijking te houden en een Taylor-expansie rond het gemiddelde van r_i en r_0 te gebruiken.

De laatste tijd zijn „bootstrap-methoden” populair geworden. Deze methoden gebruiken de gemeten gegevens en een door een aselecte getallengenerator bepaalde frequent herhaalde steekproeftrekking voor de bepaling van een empirische variantieverdeling.

LITERATUUR

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D. and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.*11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & 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. BEPALING VAN DE GEMAKKELIJKE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

DEEL I. ALGEMENE BESCHOUWINGEN

1.1. INLEIDING

Voor het testen van de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid van chemische stoffen in een aëroob watermedium worden zes testmethoden beschreven:

a) DOC (opgeloste organische koolstof) Afvlakkingstest (Methode C.4-A)

b) Gewijzigde OESO-Screening test — Afvlakking DOC (Methode C.4-B)

c) Kooldioxyde (CO_2) Ontwikkelingstest (Gewijzigde Sturm-test) (Methode C.4-C)

d) Manometrische respirometrie (Methode C.4-D)

e) Gesloten-flestest (Methode C.4-E)

f) MITI (Ministerie voor Internationale Handel en Industrie — Japan) (Methode C.4-F)

In deel I van de methode worden zowel de algemene aanwijzingen als de op alle zes tests betrekking hebbende aanwijzingen gegeven. In de Delen II tot en met VII worden bijzonderheden over de afzonderlijke methoden vermeld. De bijlagen bevatten definities, formules en nadere toelichting.

Bij een vergelijkend onderzoek tussen laboratoria in OESO-verband in 1988 bleek dat de methoden overeenstemmende resultaten geven. Afhankelijk van de fysische kenmerken van de te onderzoeken stof kan echter de voorkeur naar de ene of de andere methode gaan.

1.2. KEUZE VAN DE GESCHIKTE METHODE

Voor een keuze van de meest in aanmerking komende methode is informatie over de oplosbaarheid, de dampdruk en de adsorptie-eigenschappen van de stof van wezenlijk belang. Voor het berekenen van theoretische waarden en/of het controleren van gemeten waarden voor parameters, bv. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (zie Bijlagen I en II) moet de scheikundige structuur of de brutoformule bekend zijn.

Teststoffen die tot ten minste 100 mg/l in water oplosbaar zijn kunnen met alle methoden worden bepaald, mits ze niet-vluchtig en niet-adsorberend zijn. Voor stoffen die slecht in water oplosbaar, vluchtig of adsorberend zijn, worden in Tabel 1 geschikte methoden aangegeven. De wijze waarop slecht in water oplosbare stoffen en vluchtige stoffen kunnen worden behandeld wordt beschreven in Bijlage III. Matig vluchtige stoffen kunnen worden onderzocht met behulp van de DOC-afvlakkingsmethode, indien er voldoende gasruimte in de proefvaten is (deze zouden goed afgesloten moeten worden). In dat geval dient een niet-biologische controle te worden toegepast voor het verdisconteren van een eventueel fysisch verlies.

▼B

Tabel 1

Bruikbaarheid van testmethoden

Test	Analytische methode	Geschiktheid voor de volgende stoffen:		
		Slecht absorberend	Vluchtig	Oplosbaar
DOC Afvlakking	Opgeloste organische koolstof	—	—	+/–
Gew. OESO Afvlakking	Opgeloste organische koolstof	—	—	+/–
Ontwikkeling CO_2	Respirometrie: CO_2-ontwikkeling	+	—	+
Manometrische respirometrie	Manometrische respirometrie: zuurstofverbruik	+	+/–	+
Gesloten fles	Respirometrie: opgeloste zuurstof	+/-	+	+
MITI	Respirometrie: zuurstofverbruik	+	+/-	+

Informatie over de zuiverheid of de relatieve hoeveelheden van belangrijke componenten van het testmateriaal is nodig voor een interpretatie van de verkregen resultaten, vooral wanneer de uitkomsten gering of marginaal zijn.

Informatie over de giftigheid van de teststof voor bacteriën (Bijlage IV) kan zeer nuttig zijn voor het kiezen van de juiste testconcentraties en kan essentieel zijn voor een juiste interpretatie van een geringe waarde voor de biologische afbraak.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Voor een controle op de procedure worden referentiestoffen die aan de criteria voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid voldoen, onderzocht door een geschikte proefvolume referentiestof parallel met de gewone testuitvoeringen te behandelen.

Geschikte chemische stoffen zijn aniline (vers gedistilleerd), natriumacetaat en natriumbenzoaat. Deze referentiestoffen worden bij de onderhavige methoden alle afgebroken, zelfs wanneer niet bewust entmateriaal wordt toegevoegd.

Voorgesteld is een referentiestof te zoeken die wel gemakkelijk biologisch afbreekbaar is maar de toevoeging van een entmateriaal vereist. Daartoe is kaliumwaterstoftalaat voorgesteld, maar de geschiktheid moet nog worden aangetoond voordat deze stof als referentiestof aangenomen kan worden.

In de respirometrische testen kunnen stikstof bevattende verbindingen als gevolg van nitrificatie van invloed zijn op de opgenomen hoeveelheid zuurstof (zie Bijlagen II en V).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Een oplossing of suspensie van de teststof in een anorganisch medium wordt geënt en onder aërobe omstandigheden in het donker of in gedempt licht bebroed. De hoeveelheid DOC in de testoplossing die het gevolg is van het entmateriaal dient zo laag mogelijk te zijn in vergelijking met de hoeveelheid DOC tengevolge van de teststof.

Voor de endogene activiteit van het entmateriaal wordt een correctie aangebracht door middel van parallelle blanco proeven met entmateriaal maar zonder teststof, ofschoon de endogene activiteit van cellen in aanwezigheid van een teststof niet volledig overeenstemt met die van de endogene controle. De werking van de procedures wordt gecontroleerd door een parallelle test met een referentiestof uit te voeren.

▼B

In het algemeen wordt de afbraak gevolgd door de bepaling van parameters, zoals DOC, CO_2-produktie en opgenomen zuurstof en worden op voldoende frequente tijdstippen metingen gedaan om het begin en het einde van de biologische afbraak vast te stellen. Bij automatische respirometers is de meting continu. Soms wordt de DOC gemeten naast een andere parameter, maar gewoonlijk wordt dit slechts bij het begin en bij de afloop van de test gedaan. Voor het bepalen van de primaire afbraak van de teststof en voor het bepalen van de concentratie van eventuele gevormde tussenproducten (verplicht bij de MITI-test) kan ook een specifieke chemische analyse worden uitgevoerd.

Gewoonlijk duurt de test 28 dagen. De proeven kunnen echter ook eerder dan na 28 dagen, en wel zodra de kromme voor de biologische afbraak gedurende ten minste 3 bepalingen een plateau vertoont, worden beëindigd. De proeven kunnen ook langer dan 28 dagen worden voortgezet, wanneer uit de kromme blijkt dat de biologische afbraak wel begonnen is, maar dat op dag 28 nog geen plateau is bereikt.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

1.5.1. **Reproduceerbaarheid**

In verband met de aard van de biologische afbraak en van de als entmateriaal gebruikte gemengde bacteriepopulaties dienen bepalingen ten minste in tweevoud te worden uitgevoerd.

De ervaring leert in het algemeen dat hoe hoger de aanvankelijk aan het testmedium toegevoegde concentratie micro-organismen is, hoe geringer de afwijking tussen herhaalde bepalingen is. Uit ringtests is ook gebleken dat er tussen de resultaten van verschillende laboratoria grote verschillen kunnen zijn, maar gewoonlijk wordt met gemakkelijk biologische afbreekbare stoffen een goede overeenstemming verkregen.

1.5.2. **Geldigheid van de test**

Een test wordt geldig beschouwd indien het verschil tussen de uiterste waarden van de in de test meermalen uitgevoerde metingen van de verwijdering van teststof op het plateauniveau, aan het einde van de test of aan het einde van het venster van 10 dagen, minder is dan 20 % en indien het percentage afbraak van de referentiestof na 14 dagen het niveau voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid heeft bereikt. Indien aan een van deze voorwaarden niet is voldaan, dient de test te worden herhaald. Wegens de strengheid van de methoden behoeven lage waarden nog niet te betekenen dat de teststof onder milieu-omstandigheden niet biologisch afbreekbaar is, maar wel dat meer onderzoek nodig is om de biologische afbreekbaarheid vast te stellen.

Indien in een toxiciteitstest waarbij zowel de teststof als een referentiestof aanwezig is, in 14 dagen minder dan 35 % afbraak (gebaseerd op DOC) of minder dan 25 % afbraak (gebaseerd op ThOD of $ThCO_2$) is opgetreden, kan worden aangenomen dat de teststoffen remmend werken (zie ook Bijlage IV). De testreeks dient dan te worden herhaald, zo mogelijk met een lagere concentratie teststof en/of een hogere concentratie entmateriaal, maar niet meer dan 30 mg vaste stof per liter.

1.6. ALGEMENE WERKWIJZEN EN BEREIDINGEN

Algemene omstandigheden die van toepassing zijn op de test zijn in Tabel 2 samengevat. Apparatuur en overige experimentele omstandigheden die op afzonderlijke tests betrekking hebben worden verderop in het hoofdstuk voor die test beschreven.

▼B

Tabel 2

Testomstandigheden

Test	DOC Afvlakking	CO_2-ontwikkeling	Manometrische respirometrie	Gewijzigde OECD-test	Gesloten fles	MITI (I)
Concentratie teststof als						
in mg/l			100		2-10	100
mg DOC/1	10-40	10-20	10-40			
mg ThOD/1			50-100		5-10	
Concentratie entmateriaal (in cellen/l, bij benadering)	≤ 30 mg/l SS of ≤ 100 ml effluent/l (10^7- 10^8)			0,5 ml secundair effluent/l (10^5)	≤ 5 ml effluent/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Concentratie elementen in anorganisch medium (in mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					bij voorkeur 7,0
Temperatuur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = opgeloste organische koolstof ThOD = theoretisch zuurstofverbruik SS = gesuspendeerde vaste stof

1.6.1. **Verdunningswater**

Gedeïoniseerd of gedistilleerd water, dat vrij is van remmende concentraties giftige stoffen (bv. Cu^{++}-ionen) wordt gebruikt. Het mag niet meer dan 10 % van de hoeveelheid organische koolstof die met het restmateriaal wordt geïntroduceerd bevatten. De grote zuiverheid van het testwater is nodig om hoge waarden van de blanco-proeven te vermijden. Besmetting kan het gevolg zijn van aanwezige verontreinigingen en ook van de ionenuitwisselende harsen en van de lysis van bacteriën en algen. Voor elke reeks tests dient slechts gebruik te worden gemaakt van een enkele voorraad water, die vooraf door middel van DOC-analyse is gecontroleerd. Zo'n controle is niet nodig voor de gesloten flestest, maar het zuurstofverbruik van het water moet laag blijven.

▼B

1.6.2. **Voorraadoplossingen van anorganische componenten**

Voor het bereiden van testoplossingen worden voorraadoplossingen met geschikte concentraties van anorganische componenten aangemaakt. Voor de methoden DOC-afvlakking, gewijzigde OESO-test, CO_2-ontwikkeling, manometrische respirometrie en gesloten fles kunnen de onderstaande voorraadoplossingen worden gebruikt (met verschillende verdunningsfactoren).

De verdunningsfactoren en, voor de MITI-test, de specifieke bereiding van het anorganische medium, worden in de hoofdstukken van de afzonderlijke tests beschreven.

Voorraadoplossingen:

De onderstaande voorraadoplossingen worden bereid met gebruikmaking van reagentia van analytische kwaliteit.

a)	Monokaliumdiwaterstoforthosfaat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliummonowaterstoforthofosfaat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriummonowaterstoforthofosfaat-dihydraat, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$	33,40 g
	Ammoniumchloride, NH_4Cl	0,50 g
	Oplossen in water en tot 1 liter aanvullen. De pH van de oplossing moet 7,4 zijn.	
b)	Calciumchloride, watervrij, $CaCl_2$ of	27,50 g
	Calciumchloride-dihydraat, $CaCl_2 . 2 H_2O$	36,40 g
	In water oplossen en tot 1 liter aanvullen	
c)	Magnesiumsulfaat-heptahydraat, $MgSO_4 . 7 H_2O$	22,50 g
	In water oplossen en tot 1 liter aanvullen	
d)	IJzer(III)chloride-hexahydraat, $FeCl_3 . 6 H_2O$	0,25 g
	In water oplossen en tot 1 liter aanvullen	

Opmerking: Teneinde deze oplossing d) niet onmiddellijk voor gebruik te behoeven te bereiden, wordt één druppel geconcentreerde HCl of 0,4 g ethyleendiaminetetra-azijnzuur-dinatriumzout (EDTA) per liter toegevoegd.

1.6.3. **Voorraadoplossingen van chemicaliën**

Indien de oplosbaarheid meer dan 1 g/l bedraagt, wordt bijvoorbeeld 1-10 g, zoals toepasselijk is, aan teststof of referentiestof in gedeïoniseerd water opgelost en tot 1 liter aangevuld. In andere gevallen worden voorraadoplossingen in het anorganische medium bereid of wordt de stof rechtstreeks aan het anorganische medium toegevoegd. Voor het bewerken van minder goed oplosbare stoffen wordt verwezen naar Bijlage III, maar in de MITI-test (Methode C.4-F) dienen noch oplosmiddelen noch emulgatoren te worden gebruikt.

▼B

1.6.4. **Entmateriaal**

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, (chloorvrij) behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan. Indien bij de DOC-afvlakking, de CO_2-ontwikkeling en de manometrische respirometrie actief slib wordt gebruikt, dient dit te worden onttrokken aan een behandelingsinstallatie of installatie op laboratoriumschaal die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater verwerkt. Gebleken is dat entmateriaal van andere bronnen een grotere spreiding van resultaten geeft. Voor de gewijzigde OESO-test en de gesloten-flestest is een meer verdund entmateriaal zonder slibvlokken nodig en bij voorkeur wordt dan als bron een secundair effluent van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of van een laboratoriuminstallatie met huishoudelijk afvalwater genomen. Voor de MITI-test is het entmateriaal afkomstig van een mengsel van bronnen. Het wordt in het hoofdstuk van die test beschreven.

1.6.4.1. *Entmateriaal uit actief slib*

Uit de beluchtingstank van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afval verwerkt, wordt een vers monster actief slib verzameld. Grove deeltjes worden zo nodig door filtratie door een fijne zeef verwijderd; daarna wordt het slib aëroob gehouden.

In plaats daarvan kan na verwijdering van eventuele grove deeltjes worden bezonken of gecentrifugeerd (bv. 10 min bij 1 100 g). De bovenstaande vloeistof wordt weggeworpen. Het geconcentreerde slib kan in het mineraal medium gewassen worden; daarna wordt het in anorganisch medium gesuspendeerd tot een concentratie van 3-5 g gesuspendeerde vaste stof/l en belucht tot het tijdstip van gebruik.

Slib moet afkomstig zijn van een correct werkend zuiveringsstation. Als slib afkomstig is van een installatie met hoge omloopsnelheid, of geacht wordt remmers te bevatten, dient het te worden gewassen. Het opnieuw gesuspendeerde slib wordt na grondig mengen bezonken of gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof wordt weggeworpen en het gewassen slib wordt in een volgend volume anorganisch medium opnieuw gesuspendeerd. Deze procedure wordt herhaald totdat het slib geacht wordt vrij te zijn van overmaat substraat of remmer.

Nadat het slib volledig opnieuw is gesuspendeerd, of bij niet-behandeld slib direct, wordt vlak voor gebruik een monster getrokken voor de bepaling van het droog gewicht aan gesuspendeerde vaste stoffen.

Een andere mogelijkheid is het homogeniseren van actief slib (3-5 g gesuspendeerde vaste stof per l). Het slib wordt 2 min bij matige snelheid in een mechanische menger behandeld. Het gemengde slib wordt gedurende 30 min of zoveel langer als nodig bezonken en de vloeistof wordt afgeschonken en gebruikt als entmateriaal in een hoeveelheid van 10 ml anorganisch medium.

1.6.4.2. *Andere bronnen van entmateriaal*

Dit kan worden betrokken van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Er wordt een vers monster verzameld en dit wordt tijdens transport aëroob gehouden. Na 1 uur bezinken of filtreren door een grof filterpapier wordt het afgeschonken effluent of het filtraat aëroob gehouden zolang als nodig is. Tot 100 ml van dit soort entmateriaal per liter mineraal medium kan gebruikt worden.

▼B

Een verdere bron van entmateriaal is oppervlaktewater. In dit geval wordt een monster van een geschikt oppervlaktewater, bv. rivieren, plassen, verzameld en aëroob gehouden tot het nodig is. Zonodig wordt het entmateriaal door filtreren of centrifugeren geconcentreerd.

1.6.5. **Preconditionering van entmateriaal**

Entmateriaal kan op de proefomstandigheden worden gepreconditioneerd, maar mag niet vooraf aan de teststof worden aangepast. Preconditionering bestaat uit het beluchten van actief slib gedurende 5-7 dagen in anorganisch medium of secundaire effluent bij de testtemperatuur. Door preconditionering wordt de nauwkeurigheid van de testmethode soms verbeterd doordat de blancowaarden worden verlaagd. Het wordt niet nodig geacht het entmateriaal voor de MITI-test te preconditioneren.

1.6.6. **Niet-biologische controles**

Zonodig wordt gecontroleerd op mogelijke niet-biologische afbraak van de teststof door het bepalen van de verwijdering van DOC, de zuurstofopname of de kooldioxyde-ontwikkeling in steriele controles die geen entmateriaal bevatten. Het testmateriaal wordt gesteriliseerd door filtratie door een membraan (0,2 - 0,45 micrometer) of door toevoeging van een geschikte giftige stof met een geschikte concentratie. Indien gebruik gemaakt wordt van membraanfiltratie, moeten de monsters aseptisch verzameld worden, om de steriliteit ervan te behouden. De adsorptie van de teststof moet op voorhand uitgesloten worden. Is dit niet het geval, en is het entmateriaal uit actief slib afkomstig, moeten tests waarbij de biologische afbreekbaarheid als DOC-verwijdering bepaald wordt, een abiotische controle bevatten, die geënt en vergiftigd wordt.

1.6.7. **Aantal kolven**

Het aantal kolven in een doorsnee proef wordt in de betreffende hoofdstukken voor elke test beschreven.

Kolven van het volgende soort kunnen gebruikt worden:

— testsuspensie: met teststof en entmateriaal;

— entmateriaalblanco: met entmateriaal alleen;

— procedurecontrole: met referentiestof en entmateriaal;

— abiotische steriele controle: met teststof — steriel (zie 1.6.6.);

— adsorptiecontrole: met teststof, entmateriaal en steriliserend middel;

— toxiciteitscontrole: met teststof, referentiestof en entmateriaal.

Het is beslist nodig de bepalingen in de testsuspensie en entmateriaalblanco parallel uit te voeren. Het is raadzaam de bepalingen in de andere kolf parallel te volgen.

Dit is echter wellicht niet altijd mogelijk. Men dient zich er van te vergewissen dat er voldoende monsters worden genomen of afgelezen om een bepaling van het percentage verwijdering in het venster van 10 dagen mogelijk te maken.

▼B

1.7. GEGEVENS EN EVALUATIE

Bij de berekening van D_t, percentage afbraak, worden de gemiddelde waarden van duplometingen van de parameter zowel in de testvaten als van de entmateriaalblanco gebruikt. De formules daarvoor zijn vermeld in de onderstaande hoofdstukken die op de afzonderlijke tests betrekking hebben. Het verloop van de afbraak wordt grafisch weergegeven en het 10-dagenvenster wordt aangegeven. Het percentage verwijdering dat na afloop van het 10-dagenvenster is bereikt en de waarde van het plateau of, indien van toepassing, aan het eind van de test, worden berekend en gerapporteerd.

Bij de respirometrische tests kunnen stikstof bevattende verbindingen door nitrificatie van invloed zijn op de opgenomen hoeveelheid zuurstof (zie Bijlagen II en V).

1.7.1. **Afbraak gemeten door middel van DOC-bepaling**

Op elk tijdstip van monsterneming moet het percentage afbraak (D_t) voor de kolven met teststof apart, aan de hand van gemiddelden van in duplo gemeten DOC-waarden, berekend worden; het doel hiervan is, de validiteit van de test te bevestigen (zie 1.5.2). Het percentage afbraak wordt met de volgende formule berekend:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

waarin:

D_t = % afbraak op tijdstip t,

C_o = gemiddelde beginconcentratie van DOC in het geënte kweekmedium dat de teststof bevat (mg DOC/1),

C_t = gemiddelde concentratie DOC in het geënte kweekmedium dat de teststof bevat op tijdstip t (mg DOC/l),

C_{bo} = gemiddelde beginconcentratie van DOC in het blanco geënte anorganische medium (mg DOC/1),

C_{bt} = gemiddelde concentratie van DOC in het blanco geënte anorganische medium op tijdstip t (mg DOC/1).

Alle concentraties worden experimenteel gemeten.

1.7.2. **Afbraak gemeten door middel van specifieke analyse**

Wanneer de specifieke analytische gegevens beschikbaar zijn, wordt de primaire biologische afbraak berekend:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

waarin:

D_t = % afbraak op tijdstip t, gewoonlijk 28 dagen,

S_a = overblijvende hoeveelheid teststof in het entmedium aan het eind van de test (mg),

S_b = overblijvende hoeveelheid teststof in de blanco test met water/medium waaraan alleen de teststof was toegevoegd (mg).

▼B

1.7.3. **Niet-biologische afbraak**

Indien gebruik wordt gemaakt van een abiotische steriele controle, wordt het percentage niet-biologische afbraak berekend:

$$\% \text{ niet} - \text{biologische afbraak} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

waarin:

$C_{s(o)}$ = DOC concentratie in de steriele controle op dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC concentratie in de steriele controle op dag t

1.8. RAPPORTAGE

Het testrapport bevat, voorzover mogelijk, de volgende gegevens:

— teststof en referentiestof en zuiverheid daarvan;

— testomstandigheden;

— entmateriaal: aard en plaats(en) van bemonstering, concentratie en eventuele preconditionering;

— indien bekend, hoeveelheid en aard van industrieel afval dat in rioolwater aanwezig is;

— testduur en testtemperatuur;

— in geval van slecht oplosbare teststoffen, de uitgevoerde behandeling;

— toegepaste testmethode; voor elke wijziging van de procedure dienen wetenschappelijke gronden en een toelichting te worden gegeven;

— gegevensformulier;

— alle eventueel waargenomen remmingsverschijnselen;

— eventueel waargenomen niet-biologische afbraak;

— specifieke analytisch-chemische gegevens, indien beschikbaar;

— analytische gegevens over tussenproducten, indien beschikbaar;

— de grafiek van het percentage afbraak tegen de tijd voor de teststof en de referentiestof; de aanloopfase, de afbraakfase, het 10-dagenvenster en de helling dienen duidelijk te zijn aangegeven (Bijlage I); indien de test aan de validiteitscriteria heeft voldaan, kan het gemiddelde van de percentages afbraak van de teststof bevattende kolven voor de grafiek gebruikt worden.

— percentage verwijdering na het 10-dagenvenster, alsmede op het plateau of aan het eind van de test.

DEEL II. **DOC-AFVLAKKINGSTEST** (Methode C.4-A)

II.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume aan geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie van de teststof (10-40 mg DOC/1) als de enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt bij 22 ± 2 °C in het donker of in gedempt licht belucht.

▼B

De afbraak wordt door middel van DOC-analyse met regelmatige tussenpozen gedurende 28 dagen gevolgd. De mate van biologische afbraak wordt berekend doordat de concentratie aan verwijderde DOC (gecorrigeerd voor de DOC in de blanco-entmateriaalcontrole) als percentage van de aanvankelijk aanwezige concentratie wordt uitgedrukt. De mate van primaire biologische afbraak kan ook worden berekend uit een aanvullende chemische analyse die bij het begin en het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

II.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

II.2.1. **Apparatuur**

a) Erlenmeyerkolven, bv. 250 ml tot 2 l, afhankelijk van het voor DOC-analyse benodigde volume;

b) Schudmachine geschikt voor de erlenmeyers, hetzij met automatische temperatuurregeling, hetzij gebruikt in een kamer met constante temperatuur, en met een voldoende vermogen voor het in stand houden van aërobe omstandigheden in alle kolven;

c) Filtratie-apparatuur met geschikte membranen;

d) DOC-analyse-apparaat;

e) Apparatuur voor het bepalen van opgeloste zuurstof;

f) Centrifuge.

II.2.2. **Bereiding van anorganisch medium**

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing 1.6.2.

10 ml oplossing a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen b) t/m d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

II.2.3. **Bereiding en preconditionering van entmateriaal**

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie 1.6.4, 1.6.4.1, 1.6.4.2 en 1.6.5.

II.2.4. **Bereiding van de proefoplossingen**

Bij wijze van voorbeeld worden porties van 800 ml anorganisch medium in erlenmeyers van 2 liter gebracht en wordt in afzonderlijke kolven telkens een zodanig volume aan voorraadoplossingen van teststof en referentiestof gebracht dat een concentratie met een chemisch equivalent aan 10-40 mg DOC/l wordt verkregen. De pH wordt gecontroleerd en, zonodig, op 7,4 bijgesteld. De kolven worden geënt met actief slib of een andere bron van entmateriaal (zie 1.6.4) tot een uiteindelijke concentratie van niet meer dan 30 mg gesuspendeerde vaste stof per liter wordt verkregen. Tevens worden controles van entmateriaal in anorganisch medium, maar zonder test- of referentiestof, bereid.

Zo nodig wordt één kolf gebruikt om de eventuele remmende werking van een teststof te controleren door het enten van een oplossing die in het anorganische medium vergelijkbare concentraties van zowel de teststof als de referentiestof bevat.

Tevens wordt, indien nodig, een volgende steriele kolf ingericht voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof door toepassing van een niet-geënte oplossing van de stof (zie 1.6.6).

▼B

Indien het vermoeden bestaat dat de teststof in belangrijke mate op glas, slib o.i.d. wordt geadsorbeerd, wordt bovendien in een voorafgaand onderzoek de waarschijnlijke mate van adsorptie en daarmee de geschiktheid van de test voor de desbetreffende stof bepaald (zie Tabel 1). Hiertoe wordt een kolf met de teststof, het entmateriaal en het steriliserend middel bereid.

In alle kolven wordt het volume met anorganisch medium tot 1 l aangevuld en na mengen wordt uit elke kolf een monster genomen ter bepaling van de beginconcentratie aan DOC (zie Bijlage II.4). De openingen van de kolven worden afgedekt, bij voorbeeld met aluminiumfolie, zodanig dat er een ongehinderde uitwisseling van lucht tussen de kolf en de omgevende atmosfeer kan plaatsvinden. Vervolgens worden de kolven op de schudmachine geplaatst en kan de test beginnen.

II.2.5. **Aantal kolven in een doorsneeproef**

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: abiotische steriele controle

Kolf 7: adsorptiecontrole

Kolf 8: toxiciteitscontrole

Zie ook I.6.7.

II.2.6. **Uitvoering van de test**

Gedurende de test worden met bepaalde tussenpozen de concentraties aan DOC in elke kolf in duplo bepaald, en wel zo vaak dat het begin van het 10-dagenvenster en het percentage verwijdering aan het eind van het 10-dagenvenster kunnen worden bepaald. Er wordt geen groter volume aan testsuspensie genomen dan voor elke bepaling nodig is.

Voordat een monster wordt genomen worden zo nodig verliezen door verdamping uit de kolven aangevuld door toevoeging van verdunningswater (1.6.1) in de vereiste hoeveelheid. Voordat een monster wordt onttrokken, wordt het kweekmedium grondig vermengd en wordt er zorg voor gedragen dat aan de wanden van de kolf hechtend materiaal wordt opgelost of gesuspendeerd.

Onmiddellijk nadat het monster is genomen wordt het met een membraan gefiltreerd of gecentrifugeerd (zie Bijlage II.4). De afgefiltreerde of gecentrifugeerde monsters worden op dezelfde dag geanalyseerd dan wel gedurende maximaal 48 uur bij 2-4 °C of langere tijd beneden - 18 °C bewaard.

II.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

II.3.1. **Verwerking van resultaten**

Het percentage afbraak op tijdstip t wordt berekend zoals aangegeven bij 1.7.1 (DOC-bepaling) en, eventueel, bij 1.7.2 (specifieke analyse).

Alle resultaten worden op de daartoe bestemde gegevensformulieren ingevuld.

▼B

II.3.2. **Geldigheid van de resultaten**

Zie I.5.2.

II.3.3. **Rapportage**

Zie I.8.

II.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

DOC-AFVLAKKINGSTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST**

3. **TESTSTOF**

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: … mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, t_0: …mg/l als teststof

4. **ENTMATERIAAL**

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Preconditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l

5. **KOOLSTOFBEPALINGEN**

Koolstofanalyse-apparaat:

	Kolf nr.		DOC na n dagen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Teststof plus entmateriaal	1	a_1					
		a_2					
		a, gem. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, gem. $C_{b(t)}$					

▼B

	Kolf nr.		DOC na n dagen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Blanco entmateriaal, zonder teststof	3	c_1					
		c_2					
		c, gem. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, gem. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUATIE VAN VERKREGEN GEGEVENS**

Kolf nr.		% afbraak na n dagen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
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				
Gem. (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Indien D_1 en D_2 te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

Opmerking: soortgelijke formules kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en toxiciteitscontroles.

7. **NIET-BIOLOGISCHE CONTROLE** (facultatief)

	Tijd (dagen)	
	0	t
DOC.conc. (mg/l) in steriele controle	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ Niet} - \text{biologische afbraak} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIEKE SCHEIKUNDIGE ANALYSE** (facultatief)

	resthoeveelheid teststof aan her einde van de test (mg/l)	% primaire afbraak
Steriele controle	S_b	

▼B

	resthoeveelheid teststof aan her einde van de test (mg/l)	% primaire afbraak
Geënt testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEEL III. **GEWIJZIGDE OESO-SCREENING TEST** (Methode C.4-B)

III.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (10-40 mg DOC/1) als enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt geënt met 0,5 ml effluent per liter medium. Het mengsel wordt in het donker of in gedempt licht bij 22 ± 2 °C belucht.

De afbraak wordt gedurende 28 dagen met regelmatige tussenpozen gevolgd door middel van DOC-analyse. De mate van biologische afbraak wordt berekend doordat de concentratie verwijderde DOC (gecorrigeerd voor de waarde in de blanco-entmateriaalcontrole) wordt uitgedrukt als percentage van de aanvankelijk aanwezige concentratie. De mate van primaire biologische afbraak kan ook worden berekend aan de hand van een aanvullende chemische analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

III.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

III.2.1. Apparatuur

a) Erlenmeyerkolven, bv. 250 ml tot 2 l, afhankelijk van het voor DOC-analyse benodigde volume;

b) Schudmachine — geschikt voor de erlenmeyers, hetzij met een automatische temperatuurregeling, hetzij gebruikt in een kamer met constante temperatuur, en met een zodanig vermogen dat in alle kolven aërobe omstandigheden kunnen worden gehandhaafd;

c) Filtratie-apparatuur met geschikte membranen;

d) DOC-analyse-apparaat;

e) Apparatuur voor het bepalen van opgeloste zuurstof;

f) Centrifuge.

III.2.2. **Bereiding van anorganisch medium**

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing I.6.2.

10 ml van oplossing a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen b) t/m d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

Bij deze methode wordt slechts 0,5 ml effluent/liter als entmateriaal gebruikt en daarom kan het nodig zijn het medium te versterken met spoorelementen en groeifactoren. Dit geschiedt door toevoeging van 1 ml van elk van de onderstaande oplossingen per liter uiteindelijk medium:

▼B

Spoorelementoplossing:

Mangaansulfaat-tetrahydraat, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Boorzuur, H_3BO_3	57,2 mg
Zinksulfaat-heptahydraat, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdaat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-chelaat ($FeCl_3$-ethyleendiaminetetraazijnzuur)	100,0 mg

Deze stoffen worden opgelost in verdunningswater en de oplossing wordt tot 1 000 ml met verdunningswater aangevuld.

Vitamine-oplossing:

Gistextract	15,0 mg

Het gistextract wordt opgelost in 100 ml verdunningswater De oplossing wordt gesteriliseerd door filtratie door een membraan van 0,2 micron of vers bereid.

III.2.3. **Bereiding en preconditionering van entmateriaal**

Het entmateriaal is afkomstig van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Zie I.6.4.2 en I.6.5.

Hiervan wordt 0,5 ml per liter mineraal medium gebruikt.

III.2.4. **Bereiding van de proefoplossingen**

Bij wijze van voorbeeld worden porties van 800 ml anorganisch medium in erlenmeyers van 2 liter gebracht en wordt in de afzonderlijke kolven telkens een zodanig volume aan voorraadoplossingen van teststof en referentiestof toegevoegd dat een concentratie met een chemisch equivalent van 10-40 mg DOC/1 wordt verkregen. De pH-waarden worden gecontroleerd en, zonodig, op 7,4 bijgesteld. De kolven worden geënt met rioolwaterzuiveringseffluent in een hoeveelheid van 0,5 ml/liter (zie I.6.4.2). Tevens worden controles voor entmateriaal in het anorganische medium bereid zonder test- of referentiestof.

Zo nodig wordt één kolf gebruikt om de eventuele remmende werking van een teststof te controleren door het enten van een oplossing die in het anorganische medium vergelijkbare concentraties van zowel de teststof als de referentiestof bevat.

Tevens wordt, indien nodig, een volgende steriele kolf ingericht voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof door toepassing van een niet-geënte oplossing van de stof (zie I.6.6).

Indien het vermoeden bestaat dat de teststof in belangrijke mate op glas, slib o.i.d. wordt geadsorbeerd, wordt bovendien in een voorafgaand onderzoek de waarschijnlijke mate van adsorptie en daarmee de geschiktheid van de test voor de desbetreffende stof bepaald (zie Tabel 1). Hiertoe wordt een kolf met de teststof, het entmateriaal en het steriliserend middel bereid.

In alle kolven wordt het volume met anorganisch medium tot 1 l aangevuld en na mengen wordt uit elke kolf een monster genomen ter bepaling van de beginconcentratie aan DOC (zie Bijlage II.4). De openingen van de kolven worden afgedekt, bijvoorbeeld met aluminiumfolie, zodanig dat er een ongehinderde uitwisseling van lucht tussen de kolf en de omgevende atmosfeer kan plaatsvinden. Vervolgens worden de kolven op de schudmachine geplaatst en kan de test beginnen.

▼B

III.2.5. **Aantal kolven in een doorsneeproef**

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

en bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: abiotische steriele controle

Kolf 7: adsorptiecontrole

Kolf 8: toxiciteitscontrole

Zie ook I.6.7.

III.2.6. **Uitvoering van de test**

Gedurende de test worden met bepaalde tussenpozen de concentraties aan DOC in elke kolf in duplo bepaald, en wel zo vaak dat het begin van het 10-dagenvenster en het percentage verwijdering aan het eind van het 10-dagenvenster kunnen worden bepaald. Er wordt geen groter volume aan testsuspensie genomen dan voor elke bepaling nodig is.

Voordat een monster wordt genomen worden zo nodig verliezen door verdamping uit de kolven aangevuld door toevoeging van verdunningswater (I.6.1) in de vereiste hoeveelheid. Voordat een monster wordt onttrokken wordt het kweekmedium grondig vermengd en wordt er zorg voor gedragen dat aan de wanden van de kolf hechtend materiaal wordt opgelost of gesuspendeerd. Onmiddellijk nadat het monster is genomen wordt het met een membraan gefiltreerd of gecentrifugeerd (zie Bijlage II.4). De afgefiltreerde of gecentrifugeerde monsters worden op dezelfde dag geanalyseerd dan wel gedurende maximaal 48 uur bij 2-4 ^{o}C of langere tijd beneden - 18 ^{o}C bewaard.

III.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

III.3.1. **Verwerking van de resultaten**

Het percentage afbraak op tijdstip t wordt berekend zoals aangegeven bij I.7.1 (DOC-bepaling) en, eventueel, bij I.7.2. (specifieke analyse).

Alle resultaten worden op de daartoe bestemde gegevensformulieren ingevuld.

III.3.2. **Geldigheid van de resultaten**

Zie I.5.2.

III.3.3. **Rapportage**

Zie I.8.

III.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder wordt een voorbeeld van een gegevensformulier gegeven.

GEWIJZIGDE OESO-SCREENING TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST**

▼B

3. **TESTSTOF**

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, t_0: mg/l als teststof

4. **ENTMATERIAAL**

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Preconditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l

5. **KOOLSTOFBEPALINGEN**

Koolstofanalyse-apparaat:

	Kolf nr.		DOC na n dagen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Teststof plus entmateriaal	1	a_1					
		a_2					
		a, gem. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, gem. $C_{b(t)}$					
Blanco entmateriaal, zonder teststof	3	c_1					
		c_2					
		c, gem. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, gem. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUATIE VAN VERKREGEN GEGEVENS**

Kolf nr.		% afbraak na n dagen				
		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

Kolf nr.		% afbraak na n dagen				
		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				
Gem. (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Indien D_1 en D_2 te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

Opmerking: soortgelijke formules kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en toxiciteitscontroles.

7. **NIET-BIOLOGISCHE CONTROLE** (facultatief)

	Tijd (dagen)	
	0	t
DOC-conc. (mg/l) in steriele controle	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ \text{niet} - \text{biologische afbraak} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIEKE SCHEIKUNDIGE ANALYSE** (facultatief)

	resthoeveelheid teststof aan her einde van de test (mg/l)	% primaire afbraak
Steriele controle	S_b	
Geënt testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEEL IV. KOOLDIOXYDE CO_2-ONTWIKKELINGTEST. (Methode C.4-C)

IV.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (10-20 mg DOC of TOC/l) als enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt belucht door doorleiden van kooldioxydevrije lucht met een geregelde snelheid, in het donker of in gedempt licht. De afbraak wordt gedurende 28 dagen gevolgd door bepaling van het geproduceerde kooldioxyde dat in barium- of natriumhydroxyde wordt afgevangen en door titratie van het resterende hydroxyde of als anorganische koolstof wordt gemeten. De hoeveelheid geproduceerd kooldioxyde uit de teststof (gecorrigeerd voor datgene dat afkomstig is van het blanco entmateriaal) wordt uitgedrukt als een percentage van $ThCO_2$. De mate van biologische afbraak kan ook worden berekend aan de hand van een aanvullende DOC-analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

▼B

IV.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

IV.2.1. **Apparatuur**

a) Kolven, inhoud 2-5 liter, elk voorzien van een beluchtingsbuis die tot onder in de kolf reikt en een uitgang;

b) Magneetroerders, indien slecht oplosbare stoffen worden bepaald;

c) Gas-absorptieflessen;

d) Inrichting voor het regelen en meten van de luchtstroom;

e) Apparatuur voor het uitwassen van kooldioxyde, voor het bereiden van lucht die vrij is van kooldioxyde; in plaats daarvan kan een mengsel van CO_2-vrije zuurstof en CO_2-vrije stikstof uit gascilinders in de juiste verhouding (20 % O_2: 80 % N_2) worden gebruikt;

f) Inrichting voor het bepalen van kooldioxyde, hetzij titrimetrisch hetzij met behulp van een of ander analyse-apparaat voor anorganische koolstof;

g) Inrichting voor membraanfiltratie (facultatief);

h) DOC-analyse-apparaat (facultatief).

IV.2.2. **Bereiding van anorganisch medium**

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossingen, I.6.2.

10 ml van oplossing a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen b) t/m d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

IV.2.3. **Bereiding en preconditionering van entmateriaal**

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie I.6.4,I.6.4.1, I.6.4.2 en I.6.5.

IV.2.4. **Bereiding van de proefoplossingen**

Bij wijze van voorbeeld geven de onderstaande volumes en gewichten de waarden aan voor 5-literkolven die 3 1 suspensie bevatten. Indien kleinere volumes worden gebruikt, worden de waarden dienovereenkomstig aangepast, maar er dient op te worden toegezien dat het gevormde kooldioxyde nauwkeurig kan worden gemeten.

In elke 5-literkolf wordt 2 400 ml anorganisch medium gebracht. Daaraan wordt een zodanig volume van het bereide actieve slib (zie I.6.4.1 en I.6.5) toegevoegd dat een concentratie aan gesuspendeerde deeltjes van niet meer dan 30 mg/l in het uiteindelijke 3 1 geënt mengsel wordt verkregen. In plaats daarvan kan eerst het bereide slib worden verdund tot een suspensie van 500-1 000 mg/l in het anorganische medium voordat een berekende hoeveelheid daarvan aan de 2 400 ml anorganisch medium in de 5-literkolf wordt toegevoegd om een concentratie van 30 mg/l in het uiteindelijke 3 1 proefvolume te verkrijgen. Dit gaat gepaard met een grotere nauwkeurigheid. Ook andere bronnen van entmateriaal kunnen worden gebruikt (zie I.6.4.2).

De geënte mengsels worden gedurende een nacht belucht met CO_2-vrije lucht zodat kooldioxyde uit het systeem wordt verwijderd.

▼B

In telkens een aantal gelijke kolven worden afzonderlijk testmateriaal en referentiestof als gekende volumes voorraadoplossingen toegevoegd tot concentraties als gevolg van de toegevoegde stoffen van 10 tot 20 mg DOC of TOC/1; enkele kolven blijven zonder toevoeging van chemicaliën en dienen als controle op het entmateriaal. Slecht oplosbare teststoffen worden rechtstreeks in de kolven gebracht op basis van gewicht of volume of worden behandeld als beschreven in Bijlage III.

Zo nodig wordt één kolf gebruikt voor de controle op het eventuele remmende effect van de teststof waarbij zowel de teststof als de referentiestof in dezelfde concentraties als in de andere kolven worden toegevoegd.

Tevens wordt indien nodig een steriele kolf gebruikt voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof, waarbij een niet-geënte oplossing van de stof wordt gebruikt (zie I.6.6). Steriliseren door toevoeging van een giftige stof met de geschikte concentratie.

Het volume van de suspensies wordt in alle kolven aangevuld tot 3 l door toevoeging van anorganisch medium dat vooraf met CO_2-vrije lucht is belucht. Eventueel kunnen monsters worden getrokken voor analyse van DOC (zie Bijlage II.4) en/of specifieke analyse. De absorptieflessen worden aangesloten op de luchtuitgangen van de kolven.

Indien bariumhydroxyde wordt gebruikt, worden drie absorptiekolven, die elk 100 ml 0,0125 M bariumhydroxyde-oplossing bevatten, in serie op elke 5-literkolf aangesloten. De oplossing moet vrij van neergeslagen sulfaat en carbonaat zijn en de concentratie moet vlak voor gebruik worden bepaald. Indien natriumhydroxyde wordt gebruikt, worden twee vallen aangesloten, waarbij de tweede dient als controle om aan te tonen dat alle kooldioxyde in de eerste is geabsorbeerd. Bruikbaar zijn absorptiekolven die zijn voorzien van sluitingen voor serumflessen. In elke kolf wordt 200 ml 0,05 M natriumhydroxyde gebracht, welke hoeveelheid voldoende is voor het absorberen van de totale hoeveelheid kooldioxyde die bij volledige afbraak van de teststof wordt ontwikkeld. De natriumhydroxyde-oplossing zal echter, zelfs indien deze vers is bereid, sporen carbonaten bevatten; dit wordt gecorrigeerd door aftrek van het carbonaat in de blanco.

IV.2.5. **Aantal kolven in een doorsneeproef**

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

en bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: abiotische steriele controle

Kolf 7: toxiciteitscontrole

Zie ook I.6.7.

IV.2.6. **Uitvoering van de test**

De test wordt gestart doordat CO_2-vrije lucht met een snelheid van 30-100 ml/min door de suspensies wordt geborreld. Van tijd tot tijd worden monsters van het kooldioxyde absorberende materiaal genomen voor analyse van het CO_2-gehalte. Tijdens de eerste tien dagen verdient het aanbeveling elke tweede of derde dag analyses uit te voeren en vervolgens elke vijfde dag tot de 28stc dag zodat het 10-dagenvenster kan worden vastgesteld.

▼B

Op de 28ste dag worden (indien van toepassing) monsters getrokken voor DOC-analyse en/of specifieke analyse, wordt de pH van de suspensies gemeten en wordt aan elke kolf 1 ml geconcentreerd zoutzuur toegevoegd; de kolven worden gedurende een nacht belucht teneinde het in de testsuspensies aanwezige kooldioxyde te verdrijven. Op dag 29 wordt de laatste analyse van vrijgekomen kooldioxyde gemaakt.

Op de dagen van CO_2-meting wordt de absorptiefles voor bariumhydroxyde die het dichtst bij de kolf staat, losgekoppeld en wordt de hydroxyde-oplossing getitreerd met 0,05 M HC1 met fenolftaleïne als indicator. De overige absorptieflessen worden een plaats dichter bij de kolf gebracht en er wordt een nieuwe absorptiefles met daarin 100 ml vers 0,0125 M bariumhydroxyde aan het eind van de reeks geplaatst. De titraties worden uitgevoerd wanneer dat nodig is, bijvoorbeeld wanneer in de eerste val een aanzienlijke hoeveelheid neerslag wordt waargenomen en voordat er in de tweede val een duidelijke neerslag is, of ten minste wekelijks. In het andere geval wordt, wanneer NaOH absorptiemiddel is, met een spuit een klein monster (afhankelijk van de kenmerken van de gebruikte koolstofanalysator) van de natriumhydroxyde-oplossing in de absorptiefles die het dichtst bij de kolf staat, getrokken. Het monster wordt in het IC-gedeelte van het koolstofanalyse-apparaat gespoten en rechtstreeks geanalyseerd op ontwikkelde kooldioxyde.

De inhoud van de tweede val wordt alleen aan het eind van de test geanalyseerd ter correctie van eventuele overdracht van kooldioxyde.

IV.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

IV.3.1. **Verwerking van de resultaten**

De hoeveelheid in een absorptiefles afgevangen CO_2 die wordt getitreerd komt overeen met:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

waarin:

V = volume HCl dat is gebruikt voor het titreren van de 100 ml in de absorptiefles (ml),

C_B = concentratie bariumhydroxyde-oplossing (M),

C_A = concentratie zoutzuuroplossing (M),

en, indien C_B0,0125 M en C_A0,05 M is, is de getitreerde hoeveelheid voor 100 ml bariumhydroxyde 50 ml en wordt het gewicht aan CO_2 gegeven door:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl getitreerd} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

In dit geval bedraagt dus de factor voor het herleiden van het getitreerde volume HCl tot geproduceerde mg $CO_2$1,1.

Het CO_2-gewicht dat afkomstig is uit alleen het entmateriaal en dat wat afkomstig is van het entmateriaal plus de teststof worden berekend met de desbetreffende titratiewaarden en het verschil is het gewicht aan CO_2 dat alleen door de teststof is geproduceerd.

Indien bijvoorbeeld het entmateriaal alleen een titratie van 48 ml en het entmateriaal plus teststof 45 ml geeft, dan geldt:

$$CO_2 \text{ uit entmateriaal} = 1{,}1 \times (50\text{-}48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 uit entmateriaal plus teststof = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

en derhalve bedraagt het gewicht aan CO_2 dat door teststof is produceerd 3,3 mg.

Het percentage biologische afbraak wordt berekend uit:

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ geproduceerd} \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg toegevoegde teststof}}$$

of,

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ geproduceerd} \times 100}{\text{mg TOC toegevoegd in test} \times 3{,}67}$$

waarbij 3,67 de omrekeningsfactor (44/12) van koolstof naar kooldioxyde is.

Het percentage afbraak na elk tijdsinterval wordt verkregen door optellen van het percentage van $ThCO_2$-waarden dat voor elk van de dagen, tot het tijdstip waarop het is gemeten, is berekend.

Voor natriumhydroxyde-absorptieflessen wordt de hoeveelheid geproduceerd kooldioxyde berekend en uitgedrukt als IC (mg) door vermenigvuldiging van de concentratie IC in het absorptiemiddel met het volume van het absorptiemiddel.

Het percentage afbraak wordt berekend uit:

$$\% \text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC uit testkolf} - \text{mg IC uit blanco}}{\text{MG TOC toegevoegd als teststof}} \times 100$$

De verwijdering van DOC (indien van toepassing) wordt berekend zoals beschreven onder 1.7. Deze en alle andere resultaten worden op het beschikbare gegevensformulier vermeld.

IV.3.2. **Geldigheid van de resultaten**

Het IC-gehalte van de suspensie van teststof in het anorganische medium aan het begin van de test moet minder dan 5 % bedragen van de TC en de totale CO_2-ontwikkeling in de entmateriaal-blanco aan het eind van de test mag doorgaans niet meer dan 40 mg/l medium bedragen. Indien waarden van meer dan 70 mg CO_2/l worden verkregen, dienen de gegevens en de proefopzet kritisch te worden onderzocht.

Zie ook I.5.2.

IV.3.3. **Rapportage**

Zie I.8.

IV.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

KOOLDIOXYDE (CO_2) -ONTWIKKELINGTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST**

3. **TESTSTOF**

   Naam:

   Concentratie voorraadoplossing: mg/l als teststof

▼B

Beginconcentratie in het milieu: mg/l als teststof

Totale C aan kolf toegevoegd: mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **ENTMATERIAAL**

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Preconditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l

5. **KOOLDIOXYDEPRODUKTIE EN AFBREEKBAARHEID:**

Methode: $Ba(OH)_2$/NaOH/andere

Tijd (dag)	Gevormde CO_2 test (mg)		Gevormde CO_2 blanco (mg)		Gevormde CO_2 cumulatief (mg) (test minus blanco gem.)		% $ThCO_2$ $\frac{\text{Cumulatief}CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	gem	3 / 4	gem.	1	2	1	2	gem.
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Opmerking: soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en voor toxiciteitscontroles.

6. **KOOLSTOFANALYSE** (facultatief)

Koolstofanalyse-apparaat:

Tijd (dag)	Blanco mg/l	Teststof mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) of aan het eind van de incubatie

▼B

$$\% \text{ DOC verwijderd} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK** (facultatief)

$$\% \text{ niet} - \text{biologische afbraak} = \frac{CO_2 \text{ vorming in steriele kolf na 28 dagen (mg)}}{ThCO_2(mg)} \times 100$$

DEEL V. **MANOMETRISCHE RESPIROMETRIETEST** (Methode C.4-D)

V.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (100 mg/l teststof die ten minste 50-100 mg ThOD/l geeft) als enige nominale bron van organische koolstof bevat, wordt gedurende ten hoogste 28 dagen in een gesloten kolf bij een constante temperatuur (± 1 °C of minder) geroerd. Het gebruik aan zuurstof wordt bepaald hetzij door meten van hoeveelheid zuurstof (elektrolytisch geproduceerd) die nodig is om in de respirometerkolf een constant gasvolume te behouden, hetzij op grond van de verandering van het volume of van de druk (of een combinatie daarvan) in de apparatuur. Ontwikkelde kooldioxyde wordt geabsorbeerd in een oplossing van kaliumhydroxyde of een ander geschikt absorptiemiddel. De hoeveelheid door de teststof opgenomen zuurstof (gecorrigeerd voor opneming door de parallel behandelde blanco-entstof) wordt uitgedrukt als percentage ThOD of COD. Facultatief kan de primaire biologische afbraak worden berekend uit de aanvullende specifieke analyse die aan het begin en aan het einde van de incubatie wordt uitgevoerd, en de totale afbraak door DOC-analyse.

V.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

V.2.1. **Apparatuur**

a) geschikte respirometer;

b) temperatuurregeling, constant op ± 1 °C of beter;

c) membraan-filtratie-inrichting (facultatief);

d) koolstof analyse-apparaat (facultatief).

V.2.2. **Bereiding van anorganisch medium**

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossingen I.6.2.

10 ml van oplossing a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen b) t/m d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

V.2.3. **Bereiding en preconditionering van entmateriaal**

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. en I.6.5.

V.2.4. **Bereiding van de proefoplossingen**

Oplossingen van de teststof en referentiestof worden afzonderlijk in anorganisch medium, uitgaande van voorraadoplossingen, bereid in een hoeveelheid die doorgaans overeenkomt met een concentratie van 100 mg chemische stof/l (overeenkomend met ten minste 50-100 mg ThOD/1),

▼B

Het ThOD wordt berekend op basis van de vorming van ammoniumzouten, tenzij nitrificatie moet worden verwacht, in welk geval de berekening moeten worden gebaseerd op nitraatvorming (zie Bijlage II.2).

De pH-waarden worden bepaald en zonodig bijgesteld op 7,4 ± 0,2.

Slecht oplosbare stoffen dienen pas in een later stadium te worden toegevoegd (zie hieronder).

Indien de giftigheid van de teststof moet worden bepaald, wordt nog een oplossing in anorganisch medium bereid welke zowel de teststof als de referentiestof in dezelfde concentraties als in de afzonderlijke oplossingen bevat.

Indien meting van de fysisch-chemische zuurstofopname nodig is, wordt een oplossing van de teststof die door toevoeging van een geschikte giftige stof gesteriliseerd is (zie I.6.6) in een hoeveelheid van gewoonlijk 100 mg ThOD/1 bereid.

Het benodigde volume van oplossingen van de teststof en de referentiestof wordt ten minste in duplo in kolven gebracht. In volgende kolven wordt alleen anorganisch medium gebracht (voor entstof controles) en, zo nodig, de gemengde oplossing van teststof en referentiestof en de steriele oplossing.

Indien de teststof slecht oplosbaar is wordt deze in dit stadium rechtstreeks toegevoegd op basis van gewicht of volume of wordt deze behandeld als beschreven in Bijlage III. Aan de compartimenten van het CO_2-absorptie-apparaat worden kaliumhydroxyde, natronkalkpillen of een ander absorptiemiddel toegevoegd.

V.2.5. **Aantal kolven in een doorsnee-proef**

Kolven 1 en 2: testsuspensie

Kolven 3 en 4: entmateriaalblanco

Kolf 5: procedurecontrole

bij voorkeur en zo nodig:

Kolf 6: steriele controle

Kolf 7: toxiciteitscontrole

Zie I.6.7.

V.2.6. **Uitvoering van de test**

De kolven worden op de gewenste temperatuur gebracht en de daartoe bestemde kolven worden geënt met bereid actief slib of een andere bron van entmateriaal tot een concentratie aan gesuspendeerde vaste stof van niet meer dan 30 mg/l. De apparatuur wordt in gereedheid gebracht, de roerder wordt aangezet, het geheel wordt gecontroleerd op luchtdichtheid en de meting van de zuurstofopname wordt gestart. Gewoonlijk is dan geen verdere aandacht nodig behalve voor de nodige aflezingen en voor de dagelijkse controle op de juiste temperatuur en het juiste roeren.

De zuurstofopname wordt met behulp van de door de fabrikant van de apparatuur verstrekte methoden berekend uit de met regelmatige tussenpozen verrichte aflezingen. Aan het eind van de incubatie, gewoonlijk na 28 dagen, wordt de pH van de inhoud van de kolven gemeten, in het bijzonder indien de opgenomen hoeveelheid zuurstof lager is danwel hoger is dan $ThOD_{NH4}$ (voor stikstof bevattende verbindingen).

▼B

Indien nodig worden aan het begin en aan het eind monsters uit de respirometerkolven genomen voor analyse van DOC of specifieke chemische stof (zie Bijlage II.4). Bij monsterneming aan het begin dient er voor te worden gezorgd dat het volume van de in de kolf achterblijvende testsuspensie bekend is. Wanneer door een N-bevattende teststof zuurstof wordt opgenomen, wordt de toename van de concentratie nitriet en nitraat in 28 dagen bepaald en wordt de correctie voor de door nitrificatie verbruikte zuurstof berekend (Bijlage V).

V.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

V.3.1. **Verwerking van de resultaten**

De opgenomen hoeveelheid zuurstof (mg) van de teststof na een bepaalde tijd (die is gecorrigeerd voor de blanco entstofcontrole na dezelfde tijd) wordt gedeeld door het gewicht van de onderzochte teststof. Dit geeft het BOD die is uitgedrukt als mg zuurstof/mg teststof, d.w.z.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ opname door teststof} - \text{mg } O_2 \text{ opname door blanco})}{(\text{mg teststof in kolf})}$$

= mg O_2 per mg teststof.

Het percentage biologische afbraak wordt berekend hetzij uit:

$$\%\ \text{biologische afbraak} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg stof})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ stof})} \times 100$$

hetzij uit

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg stof})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ stof})} \times 100$$

Opgemerkt dient te worden dat deze twee methoden niet noodzakelijk dezelfde waarde geven; bij voorkeur wordt de eerstgenoemde methode gebruikt.

Voor teststoffen die stikstof bevatten wordt het geschikte ThOD (NH_4 of NO_3) gebruikt, afhankelijk van hetgeen bekend is of verwacht wordt omtrent het optreden van nitrificatie (Bijlage II.2). Indien nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt uit de verandering in concentraties nitriet en nitraat een correctie berekend voor de door de nitrificatie verbruikte zuurstof (Bijlage V).

Wanneer facultatieve bepalingen van organische koolstof en/of specifieke chemische stof worden uitgevoerd, wordt het percentage afbraak berekend zoals beschreven is onder I.7.

Alle resultaten worden op de bijgevoegde gegevensformulieren vermeld.

V.3.2. **Geldigheid van de resultaten**

De hoeveelheid opgenomen zuurstof van de entmateriaalblanco bedraagt normaal 20-30 mg O_2/l en mag in 28 dagen niet groter zijn dan 60 mg/l. Waarden hoger dan 60 mg/l nopen tot een kritisch onderzoek van de gegevens en de experimentele technieken. Indien de pH-waarde buiten het gebied 6-8,5 ligt en het zuurstofverbruik door de reststof minder dan 60 % bedraagt, dient de test te worden herhaald met een lagere concentratie teststof.

Zie ook I.5.2.

▼B

V.3.3. **Rapportage**

Zie I.8.

V.4. **GEGEVENSFORMULIER**

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

MANOMETRISCHE RESPIROMETRIETEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST**

3. **TESTSTOF**

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: … mg/l

Beginconcentratie in het milieu, C_o: … mg/l

Volume in de testkolf (V): … ml

ThOD stof/COD stof: … mg O_2/mg (NH_4, NO_3)

4. **ENTMATERIAAL**

Herkomst:

Uitgevoerde behandeling:

Preconditionering, indien van toepassing:

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel: mg/l

5. **ZUURSTOFOPNAME: BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID**

		Zeit (Tage)											
		0		7		14			21			28	
O_2 opname (mg) teststof	1												
	2												
	a, gem.												
O_2 opname (mg) blanco	3												
	4												
	b, gem.												
Gecorrigeerde BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD per mg teststof	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Zeit (Tage)											
		0		7		14			21			28	
% afbraak	D_1 (a_1)												
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_2 (a_2)												
	gem. (*)												

V = volume medium in testkolf.
(*) Indien D_1 en D_2 te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en de toxiciteitscontroles.

6. **CORRECTIE VOOR NITRIFICATIE** (zie Bijlage V)

Dag		0	28	Verschil
(i)	Concentratie nitraat (mg N/l)			(N)
(ii)	Zuurstofequivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Concentratie nitriet (mg N/l)			(N)
(iv)	Zuurstofequivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Totaal zuurstofequivalent	—	—	

7. **KOOLSTOFANALYSE** (facultatief)

Koolstofanalyseapparaat:

Tijd (dag)	Blanco mg/l	Teststof mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) of aan het eind van de incubatie

$$\% \text{ DOC verwijderd} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIEKE CHEMISCHE ANALYSE** (facultatief)

S_b = concentratie in fysisch-chemische (steriele) controle na 28 dagen.

S_a = concentratie in de geënte kolf na 28 dagen.

$$\% \text{ biologische afbraak} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK** (facultatief)

a = zuurstofverbruik in steriele kolven na 28 dagen, (mg)

$$\text{Zuurstofverbruik per mg teststof} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(zie afdelingen 1 en 3)

$$\% \text{ niet} - \text{biologische afbraak} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

DEEL VI. **GESLOTEN-FLESTEST** (Methode C.4-E)

VI.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

De oplossing van de teststof in anorganisch medium, doorgaans met een concentratie van 2-5 mg/l, wordt geënt met een betrekkelijk gering aantal micro-organismen uit een gemengde populatie en wordt bij constante temperatuur in het donker in volledig gevulde, afgesloten flessen gehouden. De afbraak wordt gevolgd door analyse van opgeloste zuurstof gedurende 28 dagen. De door de teststof opgenomen hoeveelheid zuurstof, die wordt gecorrigeerd voor de opname door de parallel onderzochte blanco voor het entmateriaal, wordt uitgedrukt als percentage ThOD of COD.

VI.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

VI.2.1. **Apparatuur**

a) BOD-flessen met glazen stoppen, bv. 250-350 ml;

b) Waterbad of broedapparaat, voor het op constante temperatuur (± 1 °C of beter) houden van de flessen, met uitsluiting van licht;

c) Grote glazen flessen (2-5 l) voor de bereiding van medium en voor het aanvullen van de BOD-flessen;

d) Zuurstofelektrode en meter, of apparatuur en reagentia voor Winkler-titratie.

VI.2.2. **Bereiding van anorganisch medium**

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing I.6.2.

1 (een) ml van oplossingen a) t/m d) wordt gemengd en het mengsel wordt met verdunningswater tot 11 aangevuld.

VI.2.3. **Bereiding van het entmateriaal**

Het entmateriaal is normaal afkomstig van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Een alternatieve bron van entmateriaal is oppervlaktewater. Gewoonlijk wordt één druppel (0,05 ml) tot 5 ml filtraat per liter medium gebruikt; voorafgaandelijke proeven kunnen nodig zijn om het optimaal volume voor een gegeven effluent te bepalen (zie I.6.4.2 en I.6.5).

VI.2.4. **Bereiding van de proefoplossingen**

Anorganisch medium wordt gedurende ten minste 20 min krachtig belucht. Elke testreeks wordt met uit dezelfde voorraad afkomstig mineraal medium uitgevoerd. In het algemeen is het medium na 20 uur staan bij de testtemperatuur voor gebruik gereed. Ter controle wordt de concentratie opgeloste zuurstof bepaald; de waarde dient bij 20 °C ongeveer 9 mg/l te zijn. Alle overbreng- en aanvulhandelingen van het met lucht verzadigde medium dienen zonder bellen, bijvoorbeeld door gebruik van hevels, te worden uitgevoerd.

▼B

Voor de bepaling van de teststof en referentiestof in gelijktijdige proefseries worden parallelle groepen van BOD-flessen bereid. Een voldoende aantal BOD-flessen, waaronder entmateriaalblanco's worden gereed gemaakt zodat op de gewenste tijdstippen, bijvoorbeeld na 0, 7, 14, 21 en 28 dagen, ten minste duplo-metingen van het zuurstofgebruik kunnen worden gedaan. Om het 10-dagen venster met zekerheid te kunnen vaststellen kunnen meer flessen nodig zijn.

In grote flessen wordt volledig belucht anorganisch medium gebracht, zodanig dat de flessen voor ongeveer een derde gevuld zijn. Vervolgens wordt in afzonderlijke grote flessen zoveel van de voorraadoplossingen van de teststof en referentiestof gebracht dat de uiteindelijke concentratie van de stoffen niet meer dan ongeveer 10 mg/l is. Aan het blancocontrolemedium dat in een andere grote fles aanwezig is, wordt geen chemische stof toegevoegd.

Teneinde zekerheid te geven dat de activiteit van het entmateriaal niet beperkend is, mag de concentratie opgeloste zuurstof in de BOD-flessen niet lager dan 0,5 mg/l zijn. Dit beperkt de concentratie van de teststof tot ongeveer 2 mg/l. Van slecht afbreekbare teststoffen en van teststoffen met een lage ThOD kan echter 5-10 mg/l worden gebruikt. In sommige gevallen kan het raadzaam zijn twee parallelle reeksen van de teststof bij twee verschillende concentraties, bijvoorbeeld 2 en 5 mg/l uit te voeren. Als regel wordt de ThOD op grond van de vorming van ammoniumzouten berekend, maar indien verwacht wordt of bekend is dat nitrificatie optreedt, wordt de berekening uitgevoerd op basis van de vorming van nitraat ($ThOD_{NO3}$: zie Bijlage II.2). Indien nitrificatie evenwel niet volledig is of niet optreedt, wordt gecorrigeerd voor de veranderingen in concentratie nitriet en nitraat, zoals door analyse is vastgesteld (zie Bijlage V).

Indien de toxiciteit van de teststof moet worden onderzocht (bijvoorbeeld in het geval dat eerder een lage waarde voor de biologische afbreekbaarheid is gevonden) is een volgende reeks flessen nodig.

Een volgende grote fles wordt gevuld met belucht anorganisch medium (tot ongeveer een derde van het volume) plus teststof en referentiestof met uiteindelijke concentraties die als regel dezelfde zijn als die in de andere grote flessen.

De oplossingen in de grote flessen worden met secundair effluent (een druppel of ongeveer 0,05 ml, tot 5 ml/l) of met een andere bron, zoals rivierwater geënt (zie I.6.4.2). Tenslotte worden de oplossingen met belucht anorganisch medium tot het eindvolume aangevuld met behulp van een hevel die met het oog op een voldoende menging tot op de bodem van de fles reikt.

VI.2.5. **Aantal kolven in een doorsneeproef**

In een doorsneebepaling worden de volgende flessen gebruikt:

— ten minste 10 die teststof en entmateriaal bevatten (testsuspensie),

— ten minste 10 met alleen entmateriaal (entmateriaalblanco),

— ten minste 10 met referentiestof en entmateriaal (procedurecontrole),

▼B

— en, zonodig 6 flessen met teststof, referentiestof en entmateriaal (toxiciteitscontrole). Om zekerheid te geven dat het 10-dagen venster kan worden vastgesteld zal ongeveer het dubbele aantal flessen nodig zijn.

VI.2.6. Uitvoering van de test

Elke bereide oplossing wordt met behulp van een hevel uit het onderste kwart (niet de bodem) van de desbetreffende grote fles onmiddellijk in de bijbehorende groep BOD-flessen overgebracht, zodat alle BOD-flessen volledig gevuld zijn. Er wordt zachtjes op de kolven geklopt om eventuele luchtbellen te verwijderen. De flessen van het tijdstip nul worden onmiddellijk op opgeloste zuurstof onderzocht met behulp van de Winkler-methode of met elektrodemethoden. De inhoud van de flessen kan met het oog op latere analyse via de Winkler-methode worden bewaard door toevoeging van mangaan(II)sulfaat en natriumhydroxyde (het eerste Winkler-reagens). De zorgvuldig afgesloten flessen die de zuurstof als bruin gehydrateerd mangaan(III)oxyde gefixeerd bevatten, worden gedurende niet langer dan 24 uur bij 10-20 ^{o}C in het donker bewaard, voordat de overige stappen van de Winkler-methode worden uitgevoerd. De overige herhalingsflessen worden afgesloten zodanig dat er geen luchtbellen worden opgesloten en worden in het donker bij 20 ^{o}C geïncubeerd. Elke reeks moet vergezeld gaan van een volledige parallelreeks voor de bepaling van het geënte blanco-medium. Voor analyse van opgelost zuurstof op gezette tijden (ten minste wekelijks) gedurende de bebroeding van 28 dagen wordt van elke reeks ten minste één duplofles genomen.

Wekelijkse monsterneming is voldoende voor de bepaling van het percentage verwijdering in een 14-dagenvenster, terwijl een bemonstering om de 3-4 dagen het vaststellen van een 10-dagenvenster mogelijk maakt, waarbij ongeveer tweemaal zoveel flessen nodig zijn.

Voor stikstof bevattende teststoffen moeten correcties voor de door eventueel optredende nitrificatie veroorzaakte zuurstofopname worden uitgevoerd. Hiertoe wordt de methode met de O_2-elektrode toegepast voor de bepaling van de concentratie opgeloste zuurstof, waarna uit de BOD-fles een monster wordt genomen voor analyse van nitriet en nitraat. Uit de toename van de concentratie nitriet en nitraat wordt de gebruikte hoeveelheid zuurstof berekend (zie Bijlage V).

VI.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

VI.3.1. **Verwerking van de resultaten**

Allereerst wordt het BOD dat na elk tijdstip is opgetreden berekend door aftrekken van de zuurstofafname (mg O_2/l) van de entmateriaalblanco van de afname als gevolg van de teststof. Deze gecorrigeerde afname wordt gedeeld door de concentratie (mg/l) van de teststof waarbij het specifieke BOD als mg zuurstof per mg teststof wordt verkregen. Het percentage biologische afbreekbaarheid wordt berekend door het specifieke BOD door het specifieke ThOD (dat is berekend volgens Bijlage II.2) of COD (door analyse bepaald, zie Bijlage II.3) te delen, dus:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ opname door teststof} - \text{mg } O_2 \text{ opname door blanco})}{(\text{mg teststof in kolf})}$$

▼B

= mg O_2 per mg teststof.

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{BOD } (\text{mg } O_2/\text{mg teststof})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg teststof})} \times 100$$

ofwel

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{BOD } (\text{mg } O_2/\text{mg teststof})}{\text{COD}(\text{mg } O_2/\text{mg teststof})} \times 100$$

Opgemerkt dient te worden dat deze twee methoden niet dezelfde uitkomst behoeven te geven; het gebruik van de eerste methode heeft de voorkeur.

Voor teststoffen die stikstof bevatten wordt het geschikte ThOD (NH_4 of NO_3) gebruikt, afhankelijk van hetgeen bekend is of verwacht wordt omtrent het optreden van nitrificatie (Bijlage II.2). Indien nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt uit de verandering in concentraties nitriet en nitraat een correctie berekend voor de door nitrificatie verbruikte zuurstof (zie Bijlage V).

VI.3.2. **Geldigheid van de resultaten**

De afname van de hoeveelheid zuurstof in de entmateriaal-blanco mag na 28 dagen niet meer dan 1,5 mg opgeloste zuurstof/l bedragen. Bij hogere waarden dan deze moeten de experimentele technieken worden doorgelicht. De restconcentratie zuurstof in de testflessen mag nooit minder dan 0,5 mg/l worden. Dergelijke lage zuurstofconcentraties zijn slechts geldig, indien met de methode waarmee opgeloste zuurstof wordt bepaald dergelijke concentraties nauwkeurig kunnen worden gemeten.

Zie ook I.5.2.

VI.3.3. **Rapportage**

Zie I.8.

VI.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier

GESLOTEN-FLESTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST**

3. **TESTSTOF**

   Naam:

   Concentratie voorraadoplossing: … mg/l

   Beginconcentratie in de fles: … mg/l

   ThOD/COD: … mg O_2/mg teststof

4. **ENTMATERIAAL**

   Herkomst:

   Uitgevoerde behandeling:

▼B

Preconditionering, indien van toepassing:

Concentratie in reactiemengsel: ml/l

5. **DO-BEPALING**

Methode: Winkler/elektrode

Analyses kolven

Duur van incubatie (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blanco (zonder stof)	1	C_1				
	2	C_2				
Gem.	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Teststof	1	a_1				
	2	a_2				
Gem.	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentie-stof en de toxiciteitscontroles.

6. **CORRECTIE VOOR NITRIFICATIE** (zie Bijlage V)

Duur van incubatie (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Concentratie nitraat (mg N/I)				
(ii)	Verandering in nitraatconcentr. (mg N/l)	—			
(iii)	Zuurstofequivalent (mg/l)	—			
(iv)	Concentratie nitriet (mg N/l)				
(v)	Verandering in nitrietconcentr. (mg N/l)	—			
(vi)	Zuurstofequivalent (mg/l)	—			
(iii + vi)	Totaal zuurstofequivalent (mg/l)	—			

7. **DO-AFNAME: % AFBRAAK**

	Afname na n dagen (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
FLES 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
FLES 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Afname na n dagen (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
FLES 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{ThOD stof}}$				
FLES 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{ThOD stof}}$				
$\%\ D\ \text{gem.}\ (*) = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Indien D_1 en D_2 te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

m_{to} = waarde in de testkolf op tijdstip 0

m_{tX} = waarde in de testkolf op tijdstip x

m_{bo} = gem. blanco waarde op tijdstip 0

m_{bx} = gem. blanco waarde op tijdstip x

Ook de correctie voor nitrificatie uit iii + vi in afdeling 6 dient te worden toegepast.

8. **BLANCO DO — AFNAME**

Zuurstofverbruik door blanco: (m_{bo} — m_{b28}) mg/l. Dit verbruik is van belang voor de geldigheid van de test. Het dient minder dan 1,5 mg/l te zijn.

DEEL VII. **M.I.T.I.-TEST** (Methode C.4-F)

VII.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

De zuurstofopname door een geroerde oplossing of suspensie van de teststof in een anorganisch medium dat met speciaal gekweekte, niet-aangepaste micro-organismen is geënt, wordt automatisch gedurende 28 dagen bij 25 ± 1 °C in een verduisterde, afgesloten respirometer automatisch gemeten. Het vrijkomende kooldioxyde wordt door natronkalk geabsorbeerd. De biologische afbreekbaarheid wordt uitgedrukt als het percentage zuurstofopname (gecorrigeerd voor opname door de blanco) van de theoretische opname (ThOD). Het percentage primaire biologische afbreekbaarheid wordt ook berekend uit een aanvullende specifieke chemische analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd en verder, naar keuze, door middel van DOC-analyse.

VII.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

VII.2.1. **Apparatuur**

a) Automatische elektrolytische BOD-meter of respirometer, doorgaans uitgerust met 6 flessen, met elk 300 ml en voorzien van kommetjes die het absorptiemiddel voor CO_2 bevatten;

▼B

b) Kamer met constante temperatuur en/of waterbad van 25 °C ± 1 °C of beter;

c) Membraanfiltratie-eenheid (facultatief);

d) Koolstof-analysator (facultatief).

VII.2.2. **Bereiding van anorganisch medium**

De volgende voorraadoplossingen worden uitgaande van reagentia van analytische kwaliteit en water (I.6.1) bereid:

a) Monokaliumdiwaterstoforthofosfaat, KH_2PO_4 8,50 g

Dikaliummonowaterstoforthofosfaat, K_2HPO_4 21,75 g

Dinatriummonowaterstoforthofosfaat-dodecahydraat $Na_2HPO_4 12\ H_2O$ 44,60 g

Ammoniumchloride, NH_4Cl 1,70 g

Deze stoffen worden in water opgelost en de oplossingwordt tot 1 liter aangevuld.

De pH-waarde van de oplossing dient 7,2 te zijn.

b) Magnesiumsulfaat-heptahydraat, $MgSO_4 7\ H_2O$ 22,50 g

wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld.

c) Calciumchloride, watervrij, $CaCl_2$ 27,50 g

wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld

d) IJzer(III)chloride-hexahydraat, $FeCl_3.\ 6\ H_2O$ 0,25 g

wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld

Van elke oplossing a), b), c) en d) wordt 3 ml genomen en er wordt tot 1 liter aangevuld.

VII.2.3. **Bereiding van entmateriaal**

Verse monsters worden verzameld op niet minder dan 10 locaties, voornamelijk in gebieden waar uiteenlopende chemicaliën worden gebruikt en geloosd. Van plaatsen zoals rioolwaterzuiveringsinstallaties, behandelingsinstallaties voor industrieel afvalwater, rivieren, plassen en zeeën worden monsters van 1 liter slib, oppervlaktebodem, water e.d. verzameld en grondig dooreen gemengd. Na verwijdering van drijvend materiaal en bezinking wordt de bovenstaande vloeistof met nutriumhydroxyde of fosforzuur op pH 7 ± 1 gebracht.

Van de gefiltreerde bovenstaande vloeistof wordt een voldoende volume genomen voor het vullen van een actief-slibtank van het vul-en-loop-type en de vloeistof wordt ongeveer 23,5 uur belucht. Dertig minuten na beëindigen van de beluchting wordt ongeveer eenderde van het gehele volume van de bovenstaande vloeistof verwijderd en wordt een gelijk volume van een oplossing (pH 7) die telkens 0,1 % glucose, pepton en monokaliumorthofosfaat bevat aan het bezonken materiaal toegevoegd waarna de beluchting wordt hervat. Deze procedure wordt eenmaal per dag herhaald. De slibeenheid dient volgens een verantwoorde praktijk te worden gebruikt: effluenten moeten helder zijn, de temperatuur bedraagt 25 ± 2 °C, de pH 7 ± 1, slib bezinkt goed, er is voldoende beluchting om het mengsel te allen tijde aëroob te houden, er zijn protozoën aanwezig en de activiteit van het slib wordt ten minste elke drie maanden ten opzichte van een referentiestof getest. Het slib wordt niet eerder als entmateriaal gebruikt dan na een werking van ten minste één maand, maar ook niet meer dan na vier maanden. Daarna wordt op gezette tijden, elke drie maanden, een monster van ten minste 10 locaties genomen.

▼B

Teneinde vers en oud slib op dezelfde activiteit te houden wordt de gefiltreerde bovenstaande vloeistof van een in gebruik zijnd actief slib gemengd met een gelijk volume van de gefiltreerde bovenstaande vloeistof van een vers uit tien bronnen verzameld mengsel en wordt de verenigde vloeistof als boven gekweekt. 18-24 uur nadat de eenheid is gevoed wordt slib als entmateriaal genomen.

VII.2.4. **Bereiding van de proefoplossingen**

De volgende zes kolven worden bereid:

Nr. 1: teststof in verdunningswater, 100 mg/l

Nr. 2, 3 en 4: teststof in anorganisch medium, 100 mg/l

Nr. 5: referentiestof (bv. aniline) in anorganisch medium, 100 mg/l

Nr. 6: alleen anorganisch medium

Slecht oplosbare teststoffen worden rechtstreeks op basis van gewicht of volume toegevoegd of behandeld als beschreven in Bijlage III, met dien verstande dat er geen oplosmiddelen of emulgeermiddelen worden gebruikt. In alle kolven wordt in daarvoor bestemde kommetjes absorptiemiddel voor CO_2 gebracht. De pH in de kolven nrs. 2, 3 en 4 wordt op 7,0 ingesteld.

VII.2.5. **Uitvoering van de test**

De kolven nrs. 2, 3 en 4 (testsuspensies), nr. 5 (activiteitscontrole) en nr. 6 (entmateriaal-blanco) worden geënt met een klein volume entmateriaal tot een concentratie van 30 mg/l gesuspendeerde vaste stof. Aan de kolf 1, die dient als niet-biologische controle, wordt geen entmateriaal toegevoegd. De apparatuur wordt gemonteerd, de luchtdichtheid wordt gecontroleerd, de roerders worden aangezet en de meting van de zuurstofopname in het donker wordt begonnen. De temperatuur, de roerder en het coulometrische registratieapparaat voor zuurstofopname worden dagelijks gecontroleerd en eventuele kleurverandering van de inhoud van de kolven wordt genoteerd. De opgenomen hoeveelheid zuurstof voor de zes kolven wordt rechtstreeks, met een geschikte methode afgelezen, bv. van het zespuntspapierregistratieapparaat, waaruit een BOD-kromme voortkomt. Aan het eind van de incubatie, gewoonlijk 28 dagen, wordt de pH van de inhoud van de kolven gemeten en worden de concentraties van de resterende teststof en van eventueel tussenproduct en, in geval van wateroplosbare teststof, de concentratie DOC bepaald (Bijlage II.4). In geval van vluchtige stoffen wordt bijzondere zorgvuldigheid betracht. Indien nitrificatie wordt verwacht, worden zo mogelijk de nitraat- en nitrietconcentratie bepaald.

VII.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

VII.3.1. **Verwerking van de resultaten**

De door de teststof na een gegeven tijdsduur opgenomen hoeveelheid zuurstof (mg), die is gecorrigeerd voor de door de blancocontrole van het entmateriaal in dezelfde tijd opgenomen hoeveelheid, wordt gedeeld door het gewicht van de gebruikte teststof. Dit geeft het BOD, uitgedrukt als mg zuurstof/mg teststof, d.w.z.:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ opname door teststof} - \text{mg } O_2 \text{ opname door blanco})}{(\text{mg teststof in kolf})}$$

$$= \text{mg } O_2/\text{mg teststof}$$

▼B

Het percentage biologische afbraak wordt dan verkregen uit:

$$\%\ \text{biologische afbraak} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg stof)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg stof)}} \times 100$$

Voor mengsels wordt het ThOD berekend uit elementairanalyse, net als voor een eenvoudige verbinding. Al naar gelang nitrificatie afwezig dan wel volledig is (Bijlage II.2) wordt het bijbehorende ThOD ($ThOD_{NH4}$ of $ThOD_{NO3}$) gebruikt. Indien echter nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt een correctie aangebracht voor de door nitrificatie verbruikte hoeveelheid zuurstof die is berekend uit de veranderingen in concentraties nitriet en nitraat (Bijlage V).

Het percentage primaire biologische afbraak wordt berekend uit het verlies aan specifieke (moeder)stof (zie I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Indien er in kolf nr. 1, waar fysisch-chemische verwijdering wordt gemeten, een verlies aan teststof is geweest, wordt dit gerapporteerd en wordt de concentratie teststof (S_b) na 28 dagen in deze kolf gebruikt voor het berekenen van het percentage biologische afbraak.

Wanneer bepalingen van de DOC worden uitgevoerd (naar keuze), wordt het percentage uiteindelijke biologische afbraak berekend uit:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

zoals beschreven onder punt I.7.1. Als er verlies aan DOC in kolf nr. 1, waarin fysisch-chemische verwijdering wordt gemeten, is geweest, wordt de DOC-concentratie in deze kolf gebruikt voor het berekenen van het percentage biologische afbraak.

Alle resultaten worden op de bijgaande gegevensformulieren geregistreerd.

VII.3.2. **Geldigheid van de resultaten**

De zuurstofopname door de entmateriaal-blanco bedraagt normaal 20-30 mg O_2/l en mag over 28 dagen niet meer zijn dan 60 mg/l. Hogere waarden dan 60 mg/l betekenen dat de gegevens en experimentele technieken moeten worden getoetst. Indien de pH-waarde buiten het gebied van een 6-8,5 ligt en het zuurstofverbruik door de teststof minder dan 60 % bedraagt, dient de test met een lagere concentratie teststof te worden herhaald.

Zie ook I.5.2.

Indien het percentage afbraak van aniline dat is berekend uit het zuurstofgebruik na 7 dagen niet meer dan 40 % en na 14 dagen niet meer dan 65 % bedraagt, wordt de test als ongeldig beschouwd.

VII.3.3. **Rapportage**

Zie I.8.

VII.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier

MITI (I) TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST**

▼B

3. **TESTSTOF**

Naam:

Concentratie voorraadoplossing: mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, C_o: mg/l als teststof

Volume reactiemengsel, V: ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **ENTMATERIAAL**

Verzamelingsplaatsen van slib:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Concentratie gesuspendeerde vaste stof in actief slib na acclimatisering met synthetisch rioolwater = ... mg/l

Volume actief slib per liter eindmedium = ...ml

Concentratie slib in eindmedium = ... mg/l

5. **ZUURSTOFOPNAME: BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID**

Gebruikt type respirometer:

			Tijd (dagen)				
			0	7	14	21	28
O_2 opname (mg) teststof	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 opname (mg) blanco	b						
Gecorrigeerde O_2 opname (mg)	(a_1 - b) (a_2 - b) (a_3 - b)						
BOD per mg teststof	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Kolf 1					
		Kolf 2					
		Kolf 3					
% afbraak $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Gem. (*)					

(*) Indien D_1 en D_2 te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

▼B

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en de toxiciteitscontroles.

6. **KOOLSTOFANALYSE** (facultatief)

Koolstofanalyseapparaat:

Kolf	DOC				% DOC verwijd.	Gemiddelde
	Gemeten		Gecorrig			
Water + teststof	a				—	—
Slib + teststof	b_1		b_1-c			
Slib + teststof	b_2		b_2-c			
Slib + teststof	b_3		b_3-c			
Blancocontrole	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC verwijderd} : \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **GEGEVENS UIT DE SPECIFIEKE CHEMISCHE ANALYSE**

	Resthoeveelheid teststof bij einde test	% afbraak
blancotest met water	S_b	
geënt medium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ afbraak} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Berekend wordt het % afbraak, respectievelijk voor kolven a_1, a_2 en a_3.

8. **OPMERKING**

De kromme van het BOD tegen de tijd wordt, indien beschikbaar, bijgevoegd.

▼B

Bijlage I

AFKORTINGEN EN DEFINITIES

DO: Opgeloste zuurstof (mg/l) is de concentratie zuurstof die is opgelost in een waterig medium.

BOD: (BZV), biochemisch zuurstofverbruik (g) is de hoeveelheid zuurstof die door micro-organismen wordt verbruikt bij het metaboliseren van een testverbinding; wordt ook uitgedrukt als g zuurstofopname per g testverbinding (zie methode C.5).

COD: (CZV), chemisch zuurstofverbruik (g) is de hoeveelheid zuurstof die tijdens oxydatie van een tesrverbinding met warm, zuur dichromaat wordt verbruikt; het biedt een maat van de aanwezige hoeveelheid oxydeerbaar materiaal; wordt ook uitgedrukt als g zuurstof verbruikt per g testverbinding (zie methode C.6).

DOC: Opgeloste organische koolstof is de organische koolstof die in de oplossing aanwezig is of die of door een filter van 0,45 micrometer gaat of na centrifugeren bij 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) gedurende 15 min in de vloeistof blijft.

ThOD: Theoretisch zuurstofverbruik (mg) is de totale hoeveelheid zuurstof die nodig is om een chemische stof volledig te oxyderen; het wordt berekend op basis van de molecuulformule (zie Bijlage II.2) en wordt ook uitgedrukt als mg zuurstof die nodig is per mg testverbinding.

$ThCO_2$: Theoretische hoeveelheid kooldioxyde (mg) is de hoeveelheid kooldioxyde die volgens berekening uit het bekende of gemeten koolstofgehalte van de testverbinding wordt geproduceerd, wanneer deze volledig wordt gemineraliseerd; wordt ook uitgedrukt als mg kooldioxyde ontwikkeld per mg testverbinding.

TOC: Totale organische koolstof van een monster is de som van de hoeveelheid organische koolstof in oplossing en in suspensie.

IC: Anorganische koolstof.

TC: Totale koolstof is de som van de in een monster aanwezige organische en anorganische koolstof.

Primaire biologische afbraak:

is de wijziging in de chemische structuur van een stof als gevolg van een biologisch proces, hetgeen leidt tot verlies van een bepaalde eigenschap van de stof.

Uiteindelijke biologische afbraak (aëroob):

is de mate van afbraak die wordt verkregen wanneer de testverbinding volledig door micro-organismen wordt omgezet tot kooldioxyde, water, anorganische zouten en nieuwe microbiële celbestanddelen (biomassa).

Gemakkelijk biologisch afbreekbaar:

een arbitraire indeling van chemische stoffen die bepaalde schiftingsproeven op uiteindelijke biologische afbreekbaarheid hebben doorstaan; deze proeven zijn zo streng dat geacht wordt dat dergelijke verbindingen in aquatisch milieu onder aërobe omstandigheden snel en volledig biologisch worden afgebroken.

▼B

Inherent biologisch afbreekbaar:

een indeling van chemische stoffen waarvoor welke erkende proef op biologische afbreekbaarheid dat ook een ondubbelzinnig bewijs van biologische afbraak (primair of uiteindelijk) levert.

Behandelbaarheid:

is de geschiktheid van verbindingen tot verwijdering gedurende biologische afvalwaterbehandeling zonder nadelige invloed op de normale werking van de behandelingsprocessen. In het algemeen zijn gemakkelijk biologische afbreekbare verbindingen behandelbaar, maar geldt dat niet voor alle inherent biologisch afbreekbare verbindingen. Niet-biologische processen kunnen ook optreden.

Aanlooptijd

is de duur vanaf de enting in een afvlakkingstest, totdat het percentage afbraak tot ten minste 10 % is gestegen. De aanlooptijd is vaak sterk variabel en slecht reproduceerbaar.

Afbraaktijd

is de tijd van het eind van de aanlooptijd tot het tijdstip dat 90 % van de maximale afbraak is bereikt.

10-dagenvenster

is de periode van 10 dagen onmiddellijk na het bereiken van 10 % afbraak.

▼B

Bijlage II

BEREKENING EN BEPALING VAN GESCHIKTE TOTAAL PARAMETERS

Afhankelijk van de gekozen methode zijn bepaalde totaalparameters nodig. In dit gedeelte wordt de herleiding van deze waarden beschreven. Het gebruik van deze parameters wordt bij de afzonderlijke methoden beschreven.

1. **Koolstofgehalte**

Het koolstofgehalte wordt berekend uit de bekende elementaire samenstelling of bepaald aan de hand van elementair analyse van de teststof.

2. **Theoretisch zuurstofverbruik (ThOD)**

Het theoretische zuurstofverbruik (ThOD) kan worden berekend indien de elementaire samenstelling bekend is of door elementair analyse is bepaald. Voor de verbinding met samenstelling:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

is dit zonder nitrificatie,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

of net nitrificatie,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Chemisch zuurstofverbruik (COD)**

Het chemisch zuurstofverbruik (COD) wordt bepaald volgens methode C.6.

4. **Opgeloste organische koolstof (DOC)**

Opgeloste organische koolstof (DOC) is per definitie de organische koolstof van een chemische stof of een mengsel in water dat door een filter van 0,45 micrometer gaat.

Uit de testvaten worden monsters getrokken en deze worden onmiddellijk met een geschikt membraanfilter in het filtreerapparaat gefiltreerd. De eerste 20 ml (bij gebruik van kleine filters kan deze hoeveelheid worden verminderd) van het filtraat wordt verwijderd. Hoeveelheden van 10-20 ml, of minder in geval van injectie (volume afhankelijk van de voor de koolstof analysator benodigde hoeveelheid), worden apart gehouden voor koolstofanalyse. De DOC-concentratie wordt bepaald met behulp van een analyseapparaat voor organische koolstof, waarmee een koolstofconcentratie die overeenkomt met of kleiner is dan 10 % van de oorspronkelijke, in de test gebruikte DOC-concentratie nauwkeurig kan worden gemeten.

Gefiltreerde monsters die niet op dezelfde werkdag kunnen worden geanalyseerd kunnen worden bewaard, gedurende 48 uur in een koelkast bij 2-4 °C, of gedurende langere tijden beneden –18 °C.

Opmerkingen:

Membraanfilters zijn met het oog op hydrofilisering vaak geïmpregneerd met oppervlakteactieve stoffen. Een dergelijk filter kan derhalve enkele mg oplosbare organische koolstof bevatten die kunnen storen bij de bepalingen van de biologische afbreekbaarheid. Oppervlakteactieve stoffen en andere oplosbare organische verbindingen worden uit de filters verwijderd doordat deze driemaal telkens een uur in gedeïoniseerd water worden uitgekookt. De filters kunnen dan gedurende een week in water worden bewaard. Indien er eenmalige filterpatronen worden gebruikt, moet elke partij worden gecontroleerd op het niet-afgeven van oplosbare organische koolstof.

▼B

Afhankelijk van het type membraanfilter kan de teststof door adsorptie worden vastgehouden. Het kan daarom raadzaam zijn na te gaan dat de teststof niet door het filter wordt vastgehouden.

Centrifugeren bij 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) gedurende 15 min kan worden toegepast in plaats van filtratie, voor het onderscheid tussen TOC en DOC. Bij een beginconcentratie van < 10 mg DOC/l is in deze methode niet betrouwbaar, omdat dan niet alle bacteriën worden verwijderd of koolstof als deel van het bacteriële plasma opnieuw in oplossing gaat.

LITERATUUR

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngroβen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuβ Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol 13 (1), 169.

▼B

Bijlage III

BEOORDELING VAN DE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN SLECHT OPLOSBARE STOFFEN

Bij tests op de biologische afbreekbaarheid van slecht oplosbare stoffen dient aan de volgende aspecten bijzondere aandacht te worden geschonken.

Terwijl homogene vloeistoffen zelden bemonsteringsproblemen opleveren, verdient het aanbeveling dat vaste stoffen op geschikte wijze worden gehomogeniseerd opdat fouten als gevolg van het niet-homogeen zijn worden voorkomen. Bijzondere nauwkeurigheid moet worden betracht wanneer representatieve monsters van een aantal milligrammen uit mengsels van chemicaliën of stoffen met grote hoeveelheden verontreinigingen nodig zijn.

Tijdens de tests kunnen uiteenlopende vormen van dooreenmenging worden toegepast. Er moet op worden gelet dat er slechts voldoende wordt geroerd om de stof gedispergeerd te houden, en dat er geen oververhitting, overmatige schuimvorming of overmatige afschuifkrachten optreden.

Er kan een emulgator worden gebruikt die een stabiele dispersie van de stof geeft. Deze dient niet giftig te zijn voor bacteriën en mag niet biologisch worden afgebroken of onder de testomstandigheden schuimvorming veroorzaken.

Dezelfde criteria zijn zowel op oplosmiddelen als op de emulgatoren van toepassing.

Het gebruik van vaste dragers wordt voor vaste teststoffen niet aanbevolen, maar zij kunnen wel geschikt zijn voor olieachtige stoffen.

Wanneer hulpstoffen zoals emulgatoren, oplosmiddelen en dragers worden gebruikt, dient een blancoproef waarin de hulpstof aanwezig is te worden uitgevoerd.

De drie respirometrische tests CO_2, BOD en MITI kunnen alle worden gebruikt voor het bestuderen van de biologische afbreekbaarheid van slecht oplosbare verbindingen.

LITERATUUR

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol 16, 833.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds, Chemosphere, 1984, Vol 13, 169.

▼B

Bijlage IV

BEOORDELING VAN DE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN STOFFEN DIE VAN GIFTIGHEID VOOR HET ENTMATERIAAL WORDEN VERDACHT

Wanneer een chemische stof wordt onderworpen aan onderzoek op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid en niet biologisch afbreekbaar blijkt te zijn, wordt de volgende procedure aanbevolen indien onderscheid tussen remming en inertheid wordt gewenst (Reynolds et al., 1987).

Voor de toxiciteitsproef en de biologische afbraakproef moet hetzelfde of een soortgelijk entmateriaal worden gebruikt.

Voor het bepalen van de toxiciteit van chemicaliën die in tests op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid worden onderzocht komt de toepassing van de remming van de slibademhalingssnelheid (test op de remming van de ademhaling van actief slib — Richtlijn 87/302/EEG), BOD en/of groeiremming of een combinatie daarvan in aanmerking.

Indien remming als gevolg van giftigheid moet worden voorkomen, kan het aanbeveling verdienen dat de concentraties teststof die in het onderzoek op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid worden gebruikt minder dan 1/10 van de EC_{50}-waarden (of minder dan de EC_{20}-waarden) die zijn verkregen bij de toxiciteitstest bedragen. Verbindingen met een EC_{50}-waarde van meer dan 300 mg/l hebben waarschijnlijk geen toxische effecten bij het onderzoek op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.

EC_{50}-waarden van minder dan 20 mg/l geven waarschijnlijk wel ernstige problemen bij het navolgende onderzoek. Er dienen dan lage testconcentraties te worden toegepast en gebruik dient dan te worden gemaakt van de strenge en gevoelige gesloten-flesproef of van met ^{14}C gemerkt materiaal. Anderzijds kunnen met een geacclimatiseerd entmateriaal hogere concentraties teststof worden gebruikt. In het laatste geval gaat echter het specifieke criterium van de test op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid verloren.

LITERATUUR

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol 16, 2259.

▼B

Bijlage V

CORRECTIE VAN ZUURSTOFOPNAME VOOR HET OPTREDEN VAN NITRIFICATIE

Fouten die het gevolg zijn van het niet in aanmerking nemen van nitrificatie bij de bepaling door middel van de zuurstofopname van de biologische afbreekbaarheid van teststoffen die geen stikstof bevatten zijn zeer gering (niet meer dan 5 %), zelfs indien oxydatie van de ammonium-N in het medium ongeregeld voorkomt tussen test- en blancovaten. Bij teststoffen die stikstof bevatten kunnen echter aanzienlijke fouten ontstaan.

Indien nitrificatie is opgetreden maar niet volledig is, kan de waargenomen zuurstofopname door het reactiemengsel worden gecorrigeerd voor de hoeveelheid zuurstof die is gebruikt voor het oxyderen van ammonium tot nitriet en nitraat, indien de veranderingen in de concentratie tijdens incubatie van nitriet en nitraat worden bepaald met inachtneming van de volgende vergelijkingen:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Totaal:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Uit vergelijking (1) volgt dat de zuurstofopname door 28 g stikstof in ammoniumchloride (NH_4Cl) die wordt geoxydeerd tot nitriet 96 g bedraagt, d.w.z. een factor van 3,43 (96/28). Op dezelfde wijze volgt uit vergelijking (3) dat de zuurstofopname door 28 g stikstof bij oxydatie tot nitraat 128 g bedraagt, d.w.z. een factor 4,57 (128/28).

Aangezien de reacties na elkaar verlopen, en worden bewerkstelligd door afzonderlijke en verschillende bacteriesoorten, is het mogelijk dat de concentratie nitriet toeneemt of afneemt, in het laatste geval zal een overeenkomstige concentratie nitraat worden gevormd. De bij de vorming van nitraat verbruikte hoeveelheid zuurstof bedraagt dus 4,57 maal.de toename van de nitraatconcentratie, terwijl de hoeveelheid zuurstof die samenhangt met de vorming van nitriet 3,43 maal de toename van de nitrietconcentratie is of bij afname van de concentratie het zuurstofverlies - 3,43 is maal de afname in de concentratie.

Dus:

O_2 verbruikt bij nitraatvorming = 4,57 × toename N-nitraatconcentratie (4)

en

O_2 verbruikt bij nitrietvorming = 3,43 × toename N-nitrietconcentratie (5)

en

O_2 verloren bij verdwijning nitriet = - 3,43 × afname N-nitrietconcentratie (6)

zodat

O_2-opname als gevolg van nitrificatie = ± 3,43 × wijziging in N-nitrietconcentratie + 4,57 × toename N-nitraatconcentratie (7)

en dus

O_2-opname als gevolg van C-oxydatie = totaal waargenomen opname — opname als gevolg van nitrificatie (8)

Anderzijds kan, indien alleen totaal geoxydeerde N wordt bepaald, de zuurstofopname als gevolg van nitrificatie in eerste benadering worden gesteld op 4,57 × toename van geoxydeerde N.

De correctiewaarde voor zuurstofverbruik als gevolg van C-oxydatie wordt vervolgens vergeleken met $ThOD_{NH4}$, zoals berekend in Bijlage II.

▼B

C.5. AFBRAAK — BIOCHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van de proef is de meting van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) van vaste of vloeibare organische stoffen.

De gegevens die in deze test zijn verwerkt, hebben betrekking op in water oplosbare verbindingen; vluchtige verbindingen en verbindingen die slechts in geringe mate in water oplosbaar zijn, kunnen echter in principe ook worden getest.

De methode is alleen van toepassing op die organische teststoffen die bij de in de test gebruikte concentratie niet remmend werken op bacteriën. Als de teststof niet oplosbaar is bij de te onderzoeken concentratie, kunnen speciale maatregelen zoals de toepassing van ultrasone dispersie nodig zijn om de teststof goed te dispergeren.

Gegevens over de toxiciteit van de stof kunnen van nut zijn bij de interpretatie van lage gevonden waarden en bij de keuze van geschikte concentraties.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het BZV is gedefinieerd als de massa opgeloste zuurstof die onder voorgeschreven omstandigheden nodig is voor de biochemische oxydatie van een bepaald volume van een oplossing van de stof.

De resultaten worden weergegeven als g BZV per g geteste stof.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het gebruik van referentiestoffen om de activiteit van het inoculum te controleren, is wenselijk.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een van tevoren bepaalde hoeveelheid van de stof wordt opgelost of gedispergeerd in een geschikt, goed belucht medium, geënt met micro-organismen en bij een constante vastgestelde omgevingstemperatuur in het donker geïncubeerd.

Het BZV wordt bepaald door het verschil in de hoeveelheid opgeloste zuurstof bij het begin en bij het einde van de test. De testduur mag niet minder dan 5 dagen en niet meer dan 28 dagen bedragen.

Parallel wordt een blanco proef uitgevoerd zonder teststof.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De bepaling van het BZV geldt niet zonder meer als bepaling van de biologische afbreekbaarheid van de stof. Deze test is alleen te beschouwen als oriënterende proef.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Eerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid om een BZV-concentratie te verkrijgen die verenigbaar is met de gebruikte methode. Vervolgens wordt het BZV bepaald volgens een geschikte nationaal of internationaal genormaliseerde methode.

▼B

2. **GEGEVENS EN EVALUATIE**

Het BZV van de oplossing wordt berekend volgens de gekozen genormaliseerde methode en herleid naar gram BZV per gram teststof.

3. **RAPPORTAGE**

De gebruikte methode moet worden vermeld.

Het biochemisch zuurstofverbruik moet het gemiddelde zijn van ten minste drie geldige metingen.

Alle informatie en opmerkingen die van belang kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, vooral wat betreft verontreinigingen, fysische toestand, toxische effecten en de oorspronkelijke samenstelling van de stof welke van invloed zouden kunnen zijn op de resultaten.

Indien een stof is toegevoegd om de biologische nitrificatie te remmen, moet dit worden vermeld.

4. LITERATUUR

Lijst van genormaliseerde methoden, bij voorbeeld:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. AFBRAAK — CHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van de methode is de meting van het chemisch zuurstofverbruik (CZV) van vaste en vloeibare organische stoffen onder vaste laboratoriumomstandigheden op een genormaliseerde manier, die identiek is voor alle organische stoffen.

Informatie betreffende de formule van de stof is nuttig voor de uitvoering van deze test en de interpretatie van de resultaten (bijvoorbeeld halogeenzouten, ijzer(II)zouten van organische verbindingen, organochloorverbindingen).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het chemisch zuurstofverbruik is een maat voor de oxydeerbaarheid van een stof, uitgedrukt als de door de stof onder vaste laboratoriumomstandigheden verbruikte equivalente hoeveelheid zuurstof van een oxyderend reagens.

Het resultaat wordt uitgedrukt in gram CZV per gram geteste stof.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de methode te ijken en om de resultaten te kunnen vergelijken als een andere methode wordt gebruikt.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een bekende in water opgeloste of gedispergeerde hoeveelheid van de stof wordt geoxydeerd met kaliumdichromaat in sterk zwavelzuur met zilversulfaat als katalysator; deze laat men gedurende 2 uur „refluxen”. Het resterende dichromaat wordt bepaald door titratie met gestandaardiseerd ijzer(II) ammoniumsulfaat.

Bij chloorhoudende stoffen wordt kwik(II)sulfaat ([1]) toegevoegd om de storing door chloride te verminderen.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Aangezien de bepaling identiek is voor alle organische stoffen, is de CZV-waarde een „oxydeerbaarheidsindicator” en wordt als zodanig gebruikt als een practische methode om de hoeveelheid organische stof te meten.

Deze test kan worden gestoord door chloride; ook kan de CZV-bepaling worden gestoord door anorganische reducerende of oxyderende agentia.

Enkele cyclische verbindingen en vele vluchtige stoffen (bijvoorbeeld lagere vetzuren) worden niet volledig geoxydeerd in deze test.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Allereerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid met een CZV tussen 250 en 600 mg/l.

([1]) Na gebruik dienen oplossingendie kwikzouten bevatten te worden nabehandeld om verspreiding van kwik in het milieu te voorkomen.

▼B

„Opmerkingen”:

Van slecht oplosbare en niet-dispergeerbare stoffen kan een hoeveelheid fijn verpulverde stof of een hoeveelheid vloeistof worden afgewogen die overeenkomt met ongeveer 5 mg CZV. Dit wordt met water in de opstelling voor het experiment gebracht.

Het CZV wordt vaak, en speciaal bij moeilijk oplosbare stoffen, beter bepaald met een variant van de methode, bij voorbeeld in een gesloten systeem met drukregulator (H. Kelkenberg, 1975). Met deze wijziging kunnen stoffen die met de conventionele methode slechts moeizaam bepaald kunnen worden — bij voorbeeld azijnzuur — vaak met succes worden gemeten. Ook deze methode faalt echter met pyridine. Indien de kaliumdichromaatconcentratie, zoals beschreven in referentie (1) wordt verhoogd tot 0,25 N (0,0416 M), kan het directe afwegen van 5 tot 10 mg stof vereenvoudigd worden, hetgeen essentieel is voor de CZV-bepaling van slecht in water oplosbare stoffen (referentie (2)).

Anders wordt vervolgens het CZV bepaald aan de hand van een geschikte nationaal of internationaal genormaliseerde methode.

2. **GEGEVENS EN EVALUATIE**

Het CZV van de inhoud van het testvat wordt berekend aan de hand van de gekozen genormaliseerde methode en omgerekend tot gram CZV per gram geteste stof.

3. **RAPPORTAGE**

De gehanteerde referentiemethode moet worden vermeld.

Het chemisch zuurstofverbruik moet een gemiddelde van ten minste drie metingen zijn. Alle informatie en opmerkingen die van belang zijn voor de inrerpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, met name wat betreft verontreinigingen, fysische toestand en de oorspronkelijke samenstelling van de stof (indien bekend) die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

Het gebruik van kwik(II)sulfaat om de storing door chloride te verminderen, moet worden vermeld.

4. **LITERATUUR**

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146,

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Enkele gestandaardiseerde methoden:

NBN T 91-201: Determination of the Chemical Oxygen Demand.

ISBN 0 11 7512454: Chemical Oxygen Demand (Dichromate Value) of Polluted and Waste Waters — 1977.

NF T 90-101: Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = Water analysis. Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41: Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15mg/l.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO DP 6060: Water quality: Chemical Oxygen Demand — Dichromate Methods.

▼B

C.7. **AFBRAAK — NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK: Hydrolyse in AFHANKELIJKHEID VAN DE pH**

1. **METHODE**

Deze testmethode komt overeen met OESO TG 111 (2004).

1.1. INLEIDING

Chemische stoffen kunnen bijvoorbeeld rechtstreeks, door overwaaien bij het spuiten, door afspoeling, door drainage, door afvalverwijdering, in industrieel, huishoudelijk of agrarisch afvalwater of door depositie uit de lucht in oppervlaktewateren terechtkomen en in die wateren via chemische (bijvoorbeeld hydrolyse of oxidatie), fotochemische en/of microbiologische processen worden omgezet. In deze testmethode wordt een laboratoriumprocedure beschreven voor de bepaling van de niet-biologische hydrolytische omzetting van chemische stoffen in aquatische systemen bij pH-waarden die normaal gesproken in het milieu worden aangetroffen (pH 4-9), die op bestaande richtsnoeren is gebaseerd (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

De experimenten worden uitgevoerd ter bepaling van i) de hydrolysesnelheid van de teststof in afhankelijkheid van de pH en ii) de identiteit of aard en vormings- en afbraaksnelheid van de hydrolyseproducten waaraan organismen kunnen worden blootgesteld. Dit onderzoek kan nodig zijn voor chemische stoffen die rechtstreeks in het water terechtkomen of die wellicht via de andere bovengenoemde routes in het milieu terecht kunnen komen.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Zie bijlage 2.

1.3. TOEPASBAARHEID VAN DE METHODE

De methode kan in het algemeen worden gebruikt voor (al dan niet gelabelde) chemische stoffen waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid en gevoeligheid beschikbaar is. Enigszins vluchtige en niet-vluchtige verbindingen met een afdoende oplosbaarheid in water kunnen worden getest. De test mag niet worden gebruikt voor chemische stoffen die vanuit water zeer vluchtig zijn (bv. fumigatiemiddelen of organische oplosmiddelen) die daardoor onder de experimentele omstandigheden tijdens deze test niet in oplossing kunnen worden gehouden. De test kan moeilijk uitvoerbaar zijn voor stoffen met een minimale oplosbaarheid in water (8).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt toegevoegd aan steriele bufferoplossingen in water met verschillende pH-waarden (pH 4, 7 en 9), die vervolgens in het donker onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden (bij constante temperatuur) worden geïncubeerd. Op geschikte tijdstippen worden de bufferoplossingen geanalyseerd op de teststof en op hydrolyseproducten. Voor een (bijvoorbeeld met ^{14}C) gelabelde teststof kan er gemakkelijker een massabalans worden bepaald.

Deze testmethode heeft een gefaseerde aanpak die in bijlage 1 wordt vermeld en verklaard. Elke fase wordt geïnitieerd door de resultaten van de fase daarvoor.

▼B

1.5. INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

Voor de meting van de hydrolysesnelheid kan een al dan niet gelabelde teststof worden gebruikt. In het algemeen wordt voor de bestudering van de hydrolyseroute en de bepaling van de massabalans de voorkeur gegeven aan gelabeld materiaal; in bijzondere gevallen zal labeling echter wellicht niet absoluut noodzakelijk zijn. Labeling met ^{14}C wordt aanbevolen, maar ook het gebruik van andere isotopen zoals ^{13}C, ^{15}N of ^{3}H kan nuttig zijn. Het label moet zo veel mogelijk in het meest stabiele gedeelte of de meest stabiele gedeelten van het molecuul worden aangebracht. Als de teststof bijvoorbeeld één ring bevat, is labeling aan deze ring vereist; als de teststof twee of meer ringen bevat, kan er apart onderzoek nodig zijn om te beoordelen wat er met elke gelabelde ring gebeurt en om bruikbare informatie over de vorming van hydrolyseproducten te krijgen. De zuiverheid van de teststof moet ten minste 95 % zijn.

Vóór de uitvoering van een hydrolysetest moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn:

a) de oplosbaarheid in water [testmethode A.6];

b) de oplosbaarheid in organische oplosmiddelen;

c) de dampspanning [testmethode A.4] en/of de constante van de wet van Henry;

d) de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water [testmethode A.8];

e) de dissociatieconstante (pK_a) [OESO-richtsnoer 112] (9);

f) eventueel de directe en indirecte fotochemische omzettingssnelheid in water.

Er moeten analysemethoden beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de teststof en indien van toepassing voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de hydrolyseproducten in waterige oplossing (zie ook punt 1.7.2).

1.6. REFERENTIESTOFFEN

Waar mogelijk moeten referentiestoffen worden gebruikt voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de hydrolyseproducten met behulp van spectroscopische en chromatografische methoden of andere voldoende gevoelige methoden.

1.7. KWALITEITSCRITERIA

1.7.1. **Recovery**

Door onmiddellijk na de toevoeging van de teststof de bufferoplossingen of de extracten daarvan ten minste in duplo te analyseren wordt een eerste indicatie verkregen van de herhaalbaarheid van de analysemethode en de uniformiteit van de procedure voor het toevoegen van de teststof. In latere fasen van de experimenten wordt de recovery bepaald aan de hand van de respectieve massabalansen (wanneer gelabeld materiaal wordt gebruikt). Voor gelabelde en ongelabelde stoffen moet de recovery tussen 90 % en 110 % liggen (7). Wanneer het bereiken van dit interval technische problemen oplevert, is een recovery van 70 % voor ongelabelde chemische stoffen aanvaardbaar, maar moet er wel een motivering worden gegeven.

▼B

1.7.2. **Herhaalbaarheid en gevoeligheid van de analysemethode**

De herhaalbaarheid van de analysemethode(n) voor de kwantitatieve bepaling van de teststof en de hydrolyseproducten op latere tijdstippen kan worden gecontroleerd door dezelfde bufferoplossingen (of de extracten daarvan) in duplo te analyseren, nadat er voldoende hoeveelheden hydrolyseproducten zijn gevormd voor een kwantitatieve bepaling.

De analysemethode moet gevoelig genoeg zijn om concentraties van de teststof tot 10 % of minder van de aanvankelijke concentratie kwantitatief te bepalen. Indien van toepassing, moeten de analysemethoden ook gevoelig genoeg zijn om een hydrolyseproduct dat (op enig tijdstip gedurende de test) overeenkomt met 10 % of meer van de toegevoegde hoeveelheid teststof, tot 25 % of minder van de piekconcentratie kwantitatief te bepalen.

1.7.3. **Betrouwbaarheidsintervallen voor kinetische gegevens over de hydrolyse**

Voor alle regressiecoëfficiënten, snelheidsconstanten, halveringstijden en andere kinetische parameters (bijvoorbeeld de DT_{50}) moeten de betrouwbaarheidsintervallen worden berekend en vermeld.

1.8. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.8.1. **Uitrusting en apparatuur**

Het onderzoek moet in glazen houders (bijvoorbeeld reageerbuizen of flesjes) in het donker en indien nodig in steriele omstandigheden worden uitgevoerd, tenzij informatie vooraf (zoals de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water) erop wijst dat de teststof zich aan glas kan hechten. In dat geval moet wellicht worden overwogen een ander materiaal (zoals Teflon) te gebruiken. Hechting aan glas kan wellicht ook met behulp van een of meer van de volgende methoden worden beperkt:

— bepaling van de massa van de aan het reactievat gesorbeerde teststof en hydrolyseproducten;

— gebruik van een ultrasoon bad;

— al het glaswerk op elk bemonsteringstijdstip met oplosmiddel spoelen;

— gebruik van geformuleerde producten;

— een grotere hoeveelheid co-oplosmiddel gebruiken om de teststof aan het systeem toe te voegen; als er een co-oplosmiddel wordt gebruikt, mag dit geen hydrolyse van de teststof veroorzaken.

Normaal gesproken zijn er waterbadschudapparaten met temperatuurregulering of incubators met thermostaatregulering voor de incubatie van de verschillende testoplossingen nodig.

Verder is er standaard-laboratoriumapparatuur nodig, zoals met name:

— een pH-meter;

▼B

— analyse-apparatuur zoals GC-, HPLC- en TLC-apparatuur, met inbegrip van de nodige detectiesystemen voor de analyse van al dan niet radioactief gelabelde stoffen of de inverse isotoopverdunningsmethode;

— instrumenten voor kwalitatieve analyse (MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR enz.);

— een vloeistofscintillatieteller;

— scheitrechters voor vloeistof/vloeistof-extractie;

— instrumenten voor de concentratie van oplossingen en extracten (bijvoorbeeld een rotatie verdamper);

— een instrument voor temperatuur-regulering (bijvoorbeeld een waterbad).

Als chemicaliën worden onder andere gebruikt:

— organische oplosmiddelen, p.a., zoals hexaan en dichloormethaan;

— scintillatievloeistof;

— bufferoplossingen (zie punt 1.8.3 voor nadere bijzonderheden).

Al het glaswerk, water (p.a.) en bufferoplossingen die bij de hydrolysetests worden gebruikt, moeten worden gesteriliseerd.

1.8.2. **Toevoeging van de teststof**

De teststof moet als waterige oplossing aan de verschillende bufferoplossingen (zie bijlage 3) worden toegevoegd. Als dit nodig is om de teststof goed op te kunnen lossen, mogen kleine hoeveelheden met water mengbare oplosmiddelen (zoals acetonitril, aceton of ethanol) voor de toevoeging en verdeling van de teststof worden gebruikt, maar deze hoeveelheden mogen normaal gesproken niet groter zijn dan 1 % (v/v). Wanneer een hogere concentratie oplosmiddelen wordt overwogen (bijvoorbeeld bij een slecht oplosbare teststof), kan dit alleen worden toegestaan wanneer kan worden aangetoond dat het oplosmiddel geen effect heeft op de hydrolyse van de teststof.

Het gebruik van geformuleerde producten wordt normaal gesproken afgeraden, aangezien niet kan worden uitgesloten dat de bestanddelen van de formulering het hydrolyseproces kunnen beïnvloeden. Voor slecht in water oplosbare teststoffen of voor stoffen die zich aan glas hechten (zie punt 1.8.1), kan het gebruik van geformuleerd materiaal echter een geschikt alternatief zijn.

Er moet één concentratie van de teststof worden gebruikt; deze mag niet hoger zijn dan 0,01 M of de helft van de verzadigingsconcentratie (zie bijlage 1).

▼B

1.8.3. **Bufferoplossingen**

De hydrolysetest moet bij de pH-waarden 4, 7 en 9 worden uitgevoerd. Daartoe moeten er met behulp van p.a. chemicaliën en water bufferoplossingen worden bereid. In bijlage 3 worden enkele geschikte buffersystemen beschreven. Er dient te worden opgemerkt dat het gebruikte buffersysteem de hydrolysesnelheid kan beïnvloeden en wanneer dit wordt geconstateerd, moet er een ander buffersysteem worden gebruikt ([1]).

De pH van elke bufferoplossing moet met een gekalibreerde pH-meter tot op ten minste 0,1 nauwkeurig bij de juiste temperatuur worden gecontroleerd.

1.8.4. **Testomstandigheden**

1.8.4.1. *Temperatuur*

De hydrolyse-experimenten moeten bij constante temperatuur worden uitgevoerd. Met het oog op extrapolatie is het belangrijk de temperatuur tot op ten minste ± 0,5 °C nauwkeurig te houden.

Als het hydrolysegedrag van de teststof onbekend is, wordt er een oriënterende test (fase 1) bij een temperatuur van 50 °C uitgevoerd. Kinetische tests in latere fasen moeten bij ten minste drie temperaturen worden uitgevoerd (met inbegrip van de test bij 50 °C), tenzij bij de test van fase 1 is vastgesteld dat de teststof ongevoelig voor hydrolyse is. Als temperatuurinterval wordt 10-70 °C aanbevolen (waarvan bij voorkeur ten minste één temperatuur beneden 25 °C wordt gebruikt); de rapportagetemperatuur (25 °C) en de meeste temperaturen die men in de praktijk tegenkomt, liggen binnen dit interval.

1.8.4.2. *Licht en zuurstof*

Alle hydrolysetests moeten worden uitgevoerd met een geschikte methode om fotolyse-effecten te voorkomen. Alle nodige maatregelen moeten worden genomen om zuurstof uit te sluiten (bijvoorbeeld door vóór het bereiden van de oplossing gedurende 5 minuten helium, stikstof of argon door te leiden).

1.8.4.3. *Duur van de test*

De oriënterende test wordt gedurende 5 dagen uitgevoerd, terwijl de tests van de latere fasen gedurende 30 dagen worden uitgevoerd of, indien dit vóór die tijd het geval is, totdat 90 % van de teststof is gehydrolyseerd.

1.8.5. **Uitvoering van de test**

1.8.5.1. *Oriënterende test (fase 1)*

De oriënterende test wordt uitgevoerd bij 50 ± 0,5 °C en pH 4,0, 7,0 and 9,0. Als er na vijf dagen minder dan 10 % hydrolyse wordt waargenomen ($t_{0,5}$ (25°C) > 1 jaar), wordt de teststof als ongevoelig voor hydrolyse beschouwd en behoeven er normaal gesproken geen aanvullende tests te worden uitgevoerd. Als bekend is dat de teststof bij in het milieu relevante temperaturen instabiel is ([2]), behoeft de oriënterende test niet te worden uitgevoerd. De analysemethode moet nauwkeurig en gevoelig genoeg zijn om een daling van de aanvankelijke concentratie met 10 % te detecteren.

([1]) Mabey and Mill bevelen het gebruik van boraat- of acetaat- in plaats van fosfaatbuffers aan (11).

([2]) Deze informatie kan uit andere bronnen afkomstig zijn, zoals gegevens over de hydrolyse van qua structuur vergelijkbare verbindingen uit de literatuur of uit andere oriënterende semi-kwantitatieve tests met de teststof tijdens een eerdere ontwikkelingsfase.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolyse van instabiele stoffen (fase 2)*

De latere (geavanceerde) test moet worden uitgevoerd bij de pH-waarden waarbij is geconstateerd dat de teststof instabiel is, zoals gedefinieerd in bovenstaande oriënterende test. De gebufferde oplossingen van de teststof wordt met een thermostaat op de geselecteerde temperaturen gehouden. Om te testen of de reactie zich als eerste orde gedraagt, wordt elke reactie-oplossing geanalyseerd met intervallen die ten minste zes gespreide datapunten opleveren die normaal gesproken tussen 10 % en 90 % hydrolyse van de teststof liggen. Er wordt steeds meer dan een testmonster genomen (ten minste twee monsters in afzonderlijke reactievaten) en de inhoud wordt op elk van de ten minste zes bemonsteringstijdstippen geanalyseerd (hetgeen ten minste twaalf duplodatapunten oplevert). Het gebruik van één monster waaruit op elk bemonsteringstijdstip steeds aparte hoeveelheden van de testoplossing worden genomen, wordt onjuist geacht aangezien daarbij geen analyse van de variabiliteit van de gegevens mogelijk is en er problemen kunnen ontstaan met verontreiniging van de testoplossing. Aan het eind van de test van de tweede fase (d.w.z. bij 90 % hydrolyse of na 30 dagen) moeten tests ter bevestiging van de steriliteit worden uitgevoerd. Als er echter geen afbraak (d.w.z. omzetting) wordt waargenomen, wordt een test op steriliteit niet nodig geacht.

1.8.5.3. *Identificatie van de hydrolyseproducten (fase 3)*

Alle belangrijke hydrolyseproducten en ten minste degene die overeenkomen met > 10 % van de toegevoegde hoeveelheid teststof, moeten met geschikte analysemethoden worden geïdentificeerd.

1.8.5.4. *Facultatieve tests*

Bij een voor hydrolyse gevoelige teststof kunnen aanvullende tests bij andere pH-waarden dan 4, 7 en 9 nodig zijn. Voor fysiologische doeleinden kan bijvoorbeeld een test in een zuurder milieu (bijvoorbeeld pH 1,2) nodig zijn, waarbij één fysiologisch relevante temperatuur (37 ^{o}C) wordt gebruikt.

2. **GEGEVENS**

De hoeveelheden teststof en eventueel hydrolyseproducten moeten voor elk bemonsteringstijdstip en voor elke pH en temperatuur als percentage van de aanvankelijke concentratie teststof en, indien van toepassing, in mg/l worden vermeld. Daarnaast moet er, als er een gelabelde teststof is gebruikt, een massabalans in percentages van de aanvankelijke concentratie teststof worden vermeld.

Er dient een grafische weergave van de logaritmisch omgezette gegevens van de concentraties van de teststof, uitgezet tegen de tijd, te worden gerapporteerd. Alle belangrijke hydrolyseproducten en ten minste degene die overeenkomen met ≥10 % van de toegevoegde hoeveelheid teststof, moeten worden geïdentificeerd en hun logaritmisch omgezette concentraties moeten op dezelfde wijze als voor de oorspronkelijke stof worden uitgezet om de vormings- en afbraaksnelheid aan te geven.

▼B

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Met behulp van de benodigde kinetische modelberekeningen moeten nauwkeurigere bepalingen van halveringstijden of DT_{50}-waarden worden verkregen. De halveringstijden en/of DT_{50}-waarden (met inbegrip van de betrouwbaarheidsgrenzen) moeten samen met een beschrijving van het gebruikte model, de orde van de kinetiek en de correlatiecoëfficiënt (r^2) voor elke pH en temperatuur worden gerapporteerd. Indien van toepassing moeten de berekeningen ook op de hydrolyseproducten worden toegepast.

Wanneer het snelheidsonderzoek bij verschillende temperaturen wordt uitgevoerd, moeten de hydrolysesnelheidsconstantes van pseudo eerste orde (k_{obs}) als functie van de temperatuur worden beschreven. De berekening moet worden gebaseerd op zowel de scheiding van k_{obs} in snelheidsconstanten voor zuur-gekatalyseerde, neutrale en base-gekatalyseerde hydrolyse (respectievelijk k_H, $k_{neutral}$ en k_{OH}) en de Arrhenius-vergelijking:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

Hierbij zijn A_i en B_i regressieconstanten van respectievelijk intercept en helling van de optimaal passende lijnen die afkomstig zijn van de lineaire regressie van ln k_i tegen de reciproque waarde van de absolute temperatuur in Kelvin (T). Via de Arrhenius-relaties voor zuur-gekatalyseerde, neutrale en base-gekatalyseerde hydrolyse kunnen snelheidsconstanten voor pseudo eerste orde en derhalve halveringstijden worden berekend voor andere temperaturen, waarbij een directe experimentele bepaling van een snelheidsconstante niet uitvoerbaar is (10).

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De meeste hydrolysereacties hebben een pseudo eerste orde reactiesnelheid, zodat de halveringstijd onafhankelijk van de concentratie is (zie vergelijking 4 in bijlage 2). Dit houdt in dat het meestal mogelijk is bij 10^{-2} tot 10^{-3} M in het laboratorium bepaalde resultaten toe te passen op milieuomstandigheden ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey en Mill hebben voor uiteenlopende chemische stoffen verschillende voorbeelden gerapporteerd van een goede overeenstemming tussen de in zuiver en natuurlijk water gemeten hydrolysesnelheden (11), mits zowel de pH als de temperatuur was gemeten.

3. **RAPPORTAGE**

3.1. TESTVERSLAG

In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule (met vermelding van de plaats van het label als radioactief gelabeld materiaal wordt gebruikt) en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie punt 1.5);

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof;

— de radiochemische zuiverheid van een gelabelde stof en de molaire activiteit (indien van toepassing).

▼B

— Bufferoplossingen:

— datum van en gegevens over de bereiding;

— gebruikte buffers en gebruikt water;

— molariteit en pH van de bufferoplossingen.

Testomstandigheden:

— data waarop het onderzoek is uitgevoerd;

— toegevoegde hoeveelheid teststof;

— methode en oplosmiddelen (type en hoeveelheid) voor de toevoeging van de teststof;

— geïncubeerd volume van de gebufferde teststofoplossingen;

— beschrijving van het gebruikte incubatiesysteem;

— pH en temperatuur tijdens het onderzoek;

— bemonsteringstijdstippen;

— extractiemethode(s);

— methoden voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof en de hydrolyseproducten in de bufferoplossingen;

— aantal duplo-bepalingen.

Resultaten:

— de herhaalbaarheid en gevoeligheid van de gebruikte analysemethoden;

— de recovery (in punt 1.7.1 wordt vermeld welke percentages voor een geldig onderzoek gehaald moeten worden);

— duplo-gegevens en gemiddelden in de vorm van een tabel;

— de massabalans gedurende en aan het eind van het onderzoek (wanneer een gelabelde teststof wordt gebruikt);

— de resultaten van de oriënterende test;

— een bespreking en interpretatie van de resultaten;

— alle oorspronkelijke gegevens en figuren.

De volgende informatie is alleen vereist wanneer de hydrolysesnelheid wordt bepaald:

— figuren waarin voor de teststof en eventueel de hydrolyseproducten bij elke pH en temperatuur de concentraties tegen de tijd worden uitgezet;

— tabellen met de resultaten van de Arrhenius-vergelijking voor 20 °C/25 °C, met pH, snelheidsconstante [h^{-1} of dag^{-1}], halveringstijd of DT_{50}, temperaturen [°C] met betrouwbaarheidsgrenzen en correlatiecoëfficiënten (r^2) of vergelijkbare informatie;

— voorgestelde hydrolyseroutes.

▼B

4. **REFERENTIES**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 EC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Europese Unie (EU) (1995). Richtlijn 95/36/EG van de Commissie tot wijziging van Richtlijn 91/414/EEG van de Raad betreffende het op de markt brengen van gewasbeschermingsmiddelen. Bijlage II: Gedrag en lotgevallen in het milieu.

(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 (October 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 Nr. 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

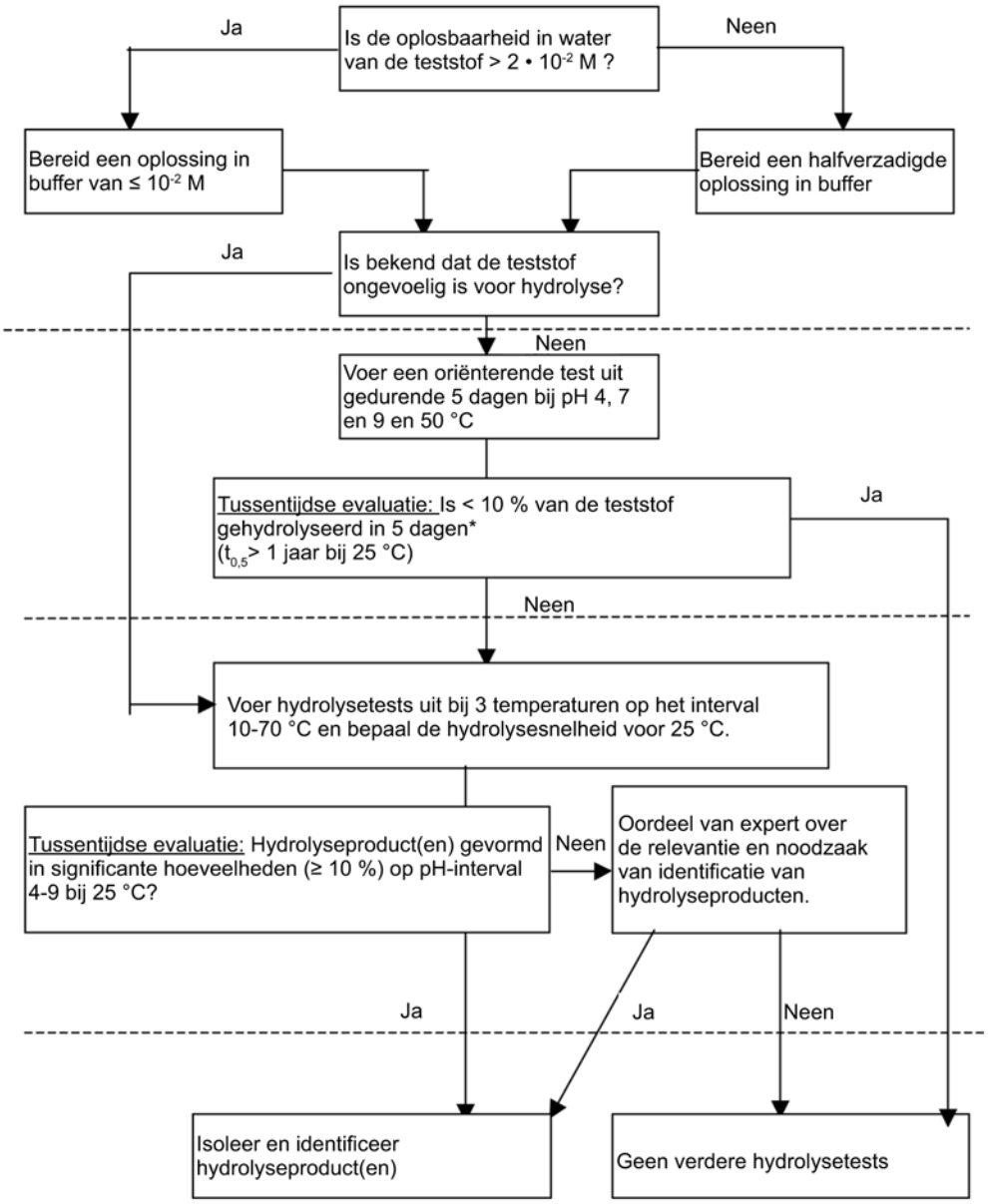
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(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

Bijlage 1

Gefaseerd testschema voor hydrolyse



* 10 % hydrolyse van een teststof bij 50 °C komt overeen met een halveringstijd van ongeveer 30 dagen, hetgeen overeenkomt met ongeveer 1 jaar bij 25 °C.

▼B

Bijlage 2

Definities en eenheden

In alle gevallen moeten eenheden van het **Internationale Eenhedenstelsel (SI-eenheden)** worden gebruikt.

Teststof: een stof, hetzij de oorspronkelijke verbinding, hetzij relevante omzettingsproducten.

Omzettingsproducten: alle stoffen die bij biotische en abiotische omzettingsreacties van de teststof ontstaan.

Hydrolyseproducten: alle stoffen die bij hydrolytische omzettingsreacties van de teststof ontstaan.

Hydrolyse: een reactie van een teststof RX met water, met als nettoresultaat de uitwisseling van de groep X met OH in het reactiecentrum:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Afhankelijk van de snelheidsbepalende stap wordt de snelheid waarmee de concentratie van RX bij dit vereenvoudigde proces afneemt, gegeven door:

snelheid = $k\ [H_2O]\ [RX]$ tweede orde reactie

of

snelheid = $k\ [RX]$ eerste orde reactie

Omdat water in vergelijking met de teststof in grote overmaat aanwezig is, wordt dit reactietype meestal beschreven als pseudo eerste orde reactie waarin de waargenomen snelheidsconstante wordt gegeven door:

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

en kan worden bepaald volgens de vergelijking (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

waarbij t = tijd

en C_o en C_t = concentraties van RX op de tijdstippen 0 en t.

Deze constante heeft als dimensie $(\text{tijd})^{-1}$ en de halveringstijd van de reactie (tijd die nodig is om 50 % van RX te laten reageren) wordt gegeven door:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Halveringstijd ($t_{0,5}$): de tijd die nodig is voor hydrolyse van 50 % van een hoeveelheid teststof, wanneer de omzetting kan worden beschreven door kinetiek van de eerste orde; deze is onafhankelijk van de aanvankelijke concentratie.

(*) Als uitzetting van de logaritmisch omgezette gegevens tegen de tijd geen lineaire functie oplevert (die overeenkomt met een eerste orde reactiesnelheid), kan vergelijking [3] niet worden gebruikt om de hydrolyse-snelheidsconstante van de teststof te bepalen.

▼B

DT_{50} (Disappearance Time 50): de tijd waarin de aanvankelijke concentratie van de teststof met 50 % daalt; deze verschilt van de halveringstijd $t_{0,5}$ wanneer de reactie niet volgens kinetiek van de eerste orde verloopt.

Bepaling van k bij een andere temperatuur

Wanneer de reactieconstante voor twee temperaturen bekend is, kan deze met behulp van de Arrhenius-vergelijking voor andere temperaturen worden berekend:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ of } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Wanneer ln k wordt uitgezet tegen 1/T, levert dit een rechte lijn op met helling -E/R.

Hierbij is:

k = snelheidsconstante, gemeten bij verschillende temperaturen;

E = activeringsenergie [kJ/mol];

T = absolute temperatuur [K];

R = gasconstante [8,314 J/mol.K].

De activeringsenergie wordt berekend met behulp van regressieanalyse of de volgende vergelijking:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

waarbij $T_2 > T_1$.

▼B

Bijlage 3

Buffersystemen

A. **CLARK EN LUBS:**

Buffermengsels van CLARK en LUBS (*)

Samenstelling	pH
0,2 N HCl + 0,2 N KCl bij 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KC1 verdunnen tot 100 ml	1,0
32,25 ml HC1 + 25 ml KC1 verdunnen tot 100 ml	1,2
20,75 ml HC1 + 25 ml KC1 verdunnen tot 100 ml	1,4
13,15 ml HC1 + 25 ml KC1 verdunnen tot 100 ml	1,6
8,3 ml HC1 + 25 ml KC1 verdunnen tot 100 ml	1,8
5,3 ml HC1 + 25 ml KC1 verdunnen tot 100 ml	2,0
3,35 ml HC1 + 25 ml KC1 verdunnen tot 100 ml	2,2
0,1 M kaliumbiftalaat + 0,1 N **HC1 bij** 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalaat tot 100 ml	3,8
0,1 M kaliumbiftalaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	4,8

(*) De in deze tabellen gerapporteerde pH-waarden zijn uit de potentiaalmetingen berekend met behulp van de standaardvergelijkingen van Sörensen (1909). De corresponderende pH-waarden zijn 0,04 eenheden hoger dan de waarden in de tabel.

▼B

Samenstelling	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaat tot 100 ml	6,0

Buffermengsels van CLARK en LUBS (vervolg)

0,1 M monokaliumfosfaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 in 0,1 M KC1 + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF EN VLEESCHHOUWER:**

Citraatbuffers van KOLTHOFF en VLEESCHHOUWER

Samenstelling	pH
0,1 M monokaliumcitraat en 0,1 N HC1 bij 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citraat tot 100 ml	3,6
0,1 M monokaliumcitraat en 0,1 N NaOH bij 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	6,0

(*) Voeg een klein kristal thymol of een vergelijkbare stof toe om de groei van schimmels te voorkomen.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Boraatmengsels van SÖRENSEN

Samenstelling		Sörensen 18 °C	Walbum, pH bij		
ml borax	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + 0,1 N HC1					
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

Fosfaatmengsels van SÖRENSEN

Samenstelling	pH
0,0667 M monokaliumfosfaat + 0,0667 M dinatriumfosfaat bij 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. TOXICITEIT VOOR REGENWORMEN

TEST MET KUNSTMATIGE GROND

1. METHODE

1.1. INLEIDING

In deze laboratoriumtests wordt de te onderzoeken stof toegevoegd aan kunstmatige grond waarin gedurende veertien dagen regenwormen worden geplaatst. Na deze veertien dagen (en naar keuze ook al na zeven dagen) wordt het letale effect van de stof op de regenwormen onderzocht. Met deze test kan betrekkelijk snel een indruk worden verkregen van het effect van chemicaliën op regenwormen bij opname via de huid en via het voedsel.

1.2. DEFINITIE EN EENHEID

LC_{50}: De geschatte concentratie van een stof die de dood van 50 % van de proefdieren gedurende de testperiode tot gevolg heeft.

1.3. REFERENTIESTOF

Op gezette tijden wordt een referentiestof getoetst om aan te tonen dat de gevoeligheid van het testsysteem niet wezenlijk is veranderd.

Als referentiestof wordt aanbevolen chlooraceetamide van analytische kwaliteit.

1.4. PRINCIPE VAN DE TEST

Grond is een variabel medium en daarom wordt voor deze proef een nauwkeurig gedefinieerde kunstmatige leemgrond gebruikt. Volwassen regenwormen van de soort *Eisenia foetida* (zie de opmerking in het aanhangsel) worden gehouden in deze kunstmatige grond, die is behandeld met verschillende concentraties van de te onderzoeken stof. De kunstgrond wordt na veertien dagen (en naar keuze ook na zeven dagen) vanaf het begin van de proef op een schaal uitgespreid en het aantal overlevende regenwormen bij elke concentratie wordt geteld.

1.5. KWALITEITSNORMEN

De opzet is zodanig dat de test ten aanzien van het testsubstraat en het organisme zo reproduceerbaar mogelijk is. Indien de sterfte in de controles aan het eind van de proef hoger is dan 10 %, is de test ongeldig.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.6.1. *Materiaal*

1.6.1.1. Testsubstraat

Als basistestsubstraat wordt goed gedefinieerde kunstmatige grond gebruikt.

a) Basissubstraat (percentages aangegeven in droog gewicht)

— 10 % veenmosturf (zo dicht mogelijk bij pH 5,5 — 6,0, zonder zichtbare plantenresten en fijngemalen);

▼B

— 20 % kaolienklei met zo mogelijk meer dan 50 % kaoliniet;

— ongeveer 69 % industrieel kwartszand (overwegend fijn zand met meer dan 50 % deeltjesgrootte 0,05 — 0,2 mm). Indien de stof onvoldoende dispergeerbaar is in water, wordt per testpot 10 g zand achtergehouden om later met de reststof te kunnen worden gemengd;

— ongeveer 1 % calciumcarbonaat ($CaCO_3$), poedervormig, chemisch zuiver, dat wordt toegevoegd om de pH op 6,0 ± 0,5 te brengen.

b) Testsubstraat

Het testsubstraat bevat het basissubstraat, de teststof en gedeïoniseerd water.

Het vochtgehalte bedraagt 25 tot 42 % van het drooggewicht van het basissubstraat. Het vochtgehalte van het substraat wordt bepaald door een monster bij 105 °C tot constant gewicht te drogen. De kunstmatige grond moet zover nat worden gemaakt dat er net geen water op blijft staan. Er moet zorgvuldig worden gemengd, zodat een gelijkmatige verdeling van de te onderzoeken stof over het substraat wordt verkregen. Aangegeven moet worden op welke wijze de te onderzoeken stof door het substraat is gemengd.

c) Controlesubstraat

Het controlesubstraat bevat het basissubstraat en water. Indien een hulpstof is gebruikt, moet een extra controle worden gedaan met daarin dezelfde hoeveelheid van de hulpstof.

1.6.1.2. Testpotten

Er wordt gebruik gemaakt van glazen potten met een inhoud van ongeveer 1 liter (afgesloten met plastic deksels, schotels of plastic folie met luchtgaten), die worden gevuld met een hoeveelheid nat test- of controlesubstraat die overeenkomt met 500 g droog substraat.

1.6.2. *Testomstandigheden*

De potten worden geplaatst in klimaatkamers bij een temperatuur van 20 ± 2 °C onder continu licht. De lichtintensiteit dient 400 tot 800 lux te bedragen.

De testduur bedraagt veertien dagen maar de sterfte kan indien gewenst ook at na zeven dagen worden bepaald.

1.6.3. *Werkwijze*

Testconcentraties

De concentraties van de te onderzoeken stof worden uitgedrukt als gewicht van de stof per drooggewicht basissubstraat (mg/kg).

Oriënterende toets

Het concentratiegebied dat leidt tot een sterfte tussen 0 tot 100 % kan worden bepaald in een oriënterende toets met behulp waarvan de reeks concentraties voor de definitieve test kan worden vastgesteld.

▼B

In de oriënterende toets wordt de te onderzoeken stof getest bij de volgende concentraties: 1 000, 100, 10, 1 en 0,1 mg stof per kg testsubstraat (drooggewicht).

Als er een volledige definitieve toets wordt uitgevoerd, kan voor de oriënterende toets worden volstaan met uitvoering in enkelvoud, dat wil zeggen met één pot per concentratie en één voor de controle zonder de te onderzoeken stof, elk met tien wormen.

Definitieve toets

De resultaten van de oriënterende toets worden gebruikt voor het kiezen van ten minste vijf concentraties in een meetkundige reeks die juist het gebied tussen 0 en 100 % sterfte bestrijken en onderling met een constante factor van ten hoogste 1,8 verschillen.

Door middel van de toets met deze reeks concentraties moeten de LC_{50}-waarde en de bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen zo nauwkeurig mogelijk kunnen worden geschat.

In de definitieve toets worden ten minste vier potten per concentratie en vier controles zonder de te onderzoeken stof, elk met tien wormen, onderzocht. De resultaten van deze parallelle toetsen worden gegeven als een gemiddelde met een standaarddeviatie.

Wanneer twee opeenvolgende concentraties, met een onderlinge verhouding van 1,8 slechts respectievelijk 0 en 100 % sterfte geven, zijn deze twee waarden voldoende om het gebied aan te geven waarbinnen de LC_{50} ligt.

Mengen van het basissubstraat en de teststof

Het testsubstraat wordt zoveel mogelijk bereid zonder andere hulpstoffen dan water. Vlak voor het begin van de test wordt een oplossing, emulsie of dispersie van de te onderzoeken stof in gedeïoniseerd water of een ander oplosmiddel met het basissubstraat gemengd of daarover gelijkmatig verdeeld met een fijne chroma to grafische of soortgelijke sproeier.

Indien de te onderzoeken stof onoplosbaar is in water, kan deze worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bijvoorbeeld hexaan, aceton of chloroform).

Alleen gemakkelijk verdampende oplosmiddelen mogen worden gebruikt voor het oplossen, dispergeren of emulgeren van de te onderzoeken stof. Het testsubstraat wordt voor het gebruik geventileerd. De hoeveelheid verdampt water wordt daarna weer aangevuld.

De controle moet van elke hulpstof dezelfde hoeveelheid bevatten. Indien de te onderzoeken stof niet oplosbaar, dispergeerbaar of emulgeerbaar is in organische oplosmiddelen, wordt 10 g van een mengsel van fijn gemalen kwartszand en een hoeveelheid van de te onderzoeken stof die nodig is voor de behandeling van 500 g droog gewicht aan kunstmatige grond gemengd met 490 g droog gewicht aan basissubstraat.

Voor elke testportie wordt een hoeveelheid nat testsubstraat die overeenkomt met 500 g droog gewicht in een glazen pot gebracht en worden tien regenwormen, die 24 uur in een soortgelijk nat basissubstraat zijn geconditioneerd en voor gebruik snel zijn gewassen en met filtreerpapier van overtollig water zijn ontdaan, bovenop het testsubstraat geplaatst.

▼B

De potten worden afgedekt met geperforeerde plastic deksels, schalen of folie om uitdrogen van het substraat te voorkomen en worden vervolgens veertien dagen onder de testomstandigheden gehouden.

De bepalingen worden gedaan veertien dagen (en eventueel zeven dagen) na het begin van de test. Het substraat wordt uitgespreid op een plaat van glas of roestvrij staal. De regenwormen worden onderzocht en het aantal overlevende wormen wordt bepaald. Regenwormen worden als dood aangemerkt indien zij niet reageren op een zachte mechanische prikkel op de kop.

Indien onderzoek na zeven dagen plaatsvindt, wordt het substraat terug in de pot gedaan en worden de overlevende regenwormen weer bovenop het testsubstraat geplaatst.

1.6.4. *Testorganismen*

De testorganismen zijn volwassen *Eisenia foetida* (zie opmerking in de bijlage), ten minste twee maanden oud met clitellum, nat gewicht 300-600 mg (voor kweekmethode zie aanhangsel).

2. **GEGEVENS**

2.1. VERWERKING VAN DE RESULTATEN

De concentraties van de onderzochte stof worden vermeld-in samenhang met de bijbehorende percentages dode regen wormen.

Wanneer de gegevens zich daartoe lenen, worden de LC_{50}-waarde en de betrouwbaarheidsgrenzen (p = 0,05) bepaald volgens standaardmethoden (Litchfield en Wilcoxon, 1949 of gelijkwaardige methode). De LC_{50} wordt weergegeven in mg te onderzoeken stof per kg testsubstraat (droog gewicht).

Indien de helling van de concentratiecurve te steil ïs voor de berekening van de LC_{50}, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Wanneer twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 1,8 slechts respectievelijk 0 % en 100 % sterfte geven, zijn deze waarden voldoende voor het aangeven van het gebied waarbinnen de LC_{50} ligt.

3. **VERSLAGGEVING**

3.1. TESTRAPPORT

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— een verklaring dat de test is uitgevoerd overeenkomstig de bovenvermelde kwaliteitsnormen;

— uitgevoerde toetsen (oriënterende toets en/of definitieve toets);

— nauwkeurige beschrijving van de testomstandigheden of verklaring dat de test is uitgevoerd overeenkomstig deze methode; alle afwijkingen worden vermeld;

— nauwkeurige beschrijving van de wijze waarop de te onderzoeken stof door het basissubstraat is gemengd;

— gegevens over de testorganismen (soort, leeftijd, gemiddeld gewicht en variatie in gewicht, houd- en kweekomstandigheden, leverancier);

▼B

— gebruikte methode voor de bepaling van de LC_{50};

— testresultaten met inbegrip van alle gebruikte gegevens;

— beschrijving van waargenomen symptomen of wijzigingen in het gedrag van de testorganismen;

— sterfte in de controleproeven;

— LC_{50} of hoogste geteste concentratie zonder sterfte dan wel laagste geteste concentratie met een sterfte van 100 %, veertien dagen (en eventueel zeven dagen) na de start van de test;

— grafiek van de concentratie-responscurve;

— resultaten verkregen met de referentiestof, in samenhang met de onderhavige test dan wel uit eerdere kwaliteitsborging.

4. **REFERENTIES**

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 207,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

(2) Edwards, C. A., en Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, London, 331 blz.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 blz.

(4) Litchfield, J. T., en Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 96,* 1949, blz. 99.

(5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje: *ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Aanhangsel

Kweken en houden van de wormen vóór de test

Voor het kweken worden 30 tot 50 volwassen wormen in een kweekbak met vers substraat gebracht en na veertien dagen daaruit verwijderd. Deze dieren kunnen worden gebruikt voor verder kweken. De uit de cocons gekomen regenwormen worden voor het onderzoek gebruikt wanneer ze volwassen zijn (onder de voorgeschreven omstandigheden na twee tot drie maanden).

Houd- en kweekomstandigheden

Klimaatkamer: temperatuur 20 ± 2 °C, zo mogelijk met continu licht (intensiteit 400 — 800 lux).

Kweekbakken: geschikte ondiepe bakken met een inhoud van 10 tot 20 l.

Substraat: *Eisenia foetida* kan worden gekweekt in verschillende dierlijke uitwerpselen. Aanbevolen als kweekmedium wordt een mengsel van 50 volumeprocent turf en 50 % koemest of paardemest. Het medium moet een pH hebben van 6 tot 7 (bij te stellen met calciumcarbonaat) en een lage-ionengeleiding (lager dan 6 mmho's of 0,5 % zoutconcentratie). Het substraat dient vochtig maar niet te nat te zijn.

Naast de aangegeven methode kunnen ook andere procedures die goede resultaten geven worden gebruikt.

Opmerking: *Eisenia foetida* bestaat in twee ondersoorten die door sommige taxonomen als soorten worden aangemerkt (Bouche, 1972). Deze zijn morfologisch overeenkomstig, maar de ene, *Eisenia foetida foetida*, heeft kenmerkende dwarse strepen of banden op de segmenten terwijl de andere, *Eisenia foetida andrei*, deze niet heeft en een onregelmatige roodachtige kleur heeft. Zo mogelijk dient *Eisenia foetida andrei* te worden gebruikt. Andere soorten kunnen worden gebruikt indien de benodigde methodiek beschikbaar is.

▼B

C.9. BIOLOGISCHE AFBRAAK

ZAHN-WELLENS TEST

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze methode is de bepaling van de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid van in water oplosbare, niet-vluchtige organische stoffen, wanneer deze in een statische proef aan betrekkelijk hoge concentraties micro-organismen worden onderworpen.

Aan de gesuspendeerde vaste stoffen kan fysisch-chemische adsorptie plaatsvinden en hiermee moet bij het interpreteren van de resultaten rekening worden gehouden (zie 3.2).

De te onderzoeken stoffen worden gebruikt in concentraties, die overeenkomen met DOC-waarden tussen 50 en 400 mg/liter of COD-waarden tussen 100 en 1 000 mg/liter (DOC = opgeloste organische koolstof; COD = chemisch zuurstofverbruik). Deze betrekkelijk hoge concentraties hebben het voordeel dat ze analytisch betrouwbaar zijn, Verbindingen met toxische eigenschappen kunnen het afbraakproces vertragen of verhinderen.

In deze methode wordt door middel van meting van de concentratie opgeloste organische koolstof of het chemisch zuurstofverbruik de uiteindelijke biologische afbraak van de teststof bepaald.

Het gelijktijdig toepassen van een specifieke analytische methode biedt de mogelijkheid de primaire biologische afbraak van de stof (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur) te bepalen.

Deze methode is alleen toepasbaar op die organische stoffen die bij de in de test gebruikte concentratie:

— onder de testomstandigheden in water oplosbaar zijn,

— onder de testomstandigheden een verwaarloosbare dampspanning hebben,

— geen remmende werking op bacteriën hebben,

— slechts in beperkte mate worden geadsorbeerd aan de testapparatuur,

— niet door schuimvorming uit de testoplossing verdwijnen.

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste componenten van het testmateriaal kunnen van nut zijn bij het interpreteren van de resultaten, vooral wanneer deze laag of marginaal zijn.

Gegevens aangaande de toxiciteit van de stof ten opzichte van micro-organismen zijn gewenst voor de interpretatie van lage resultaten en voor de keuze van de geschikte testconcentraties.

▼B

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De aan het eind van de proef verkregen mate van afbraak wordt opgegeven als de „biologische afbreekbaarheid in de Zahn-Wellens test”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

waarin:

D_T = biologische afbraak (%) op tijd T,

C_A = DOC- of COD-waarden in het testmengsel, zoals gemeten drie uur na het begin van de test (mg/l) (DOC = opgeloste organische koolstof, COD = chemisch zuurstofverbruik),

C_T = DOC- of COD-waarden in het testmengsel op het tijdstip van monsterneming (mg/L),

C_B = DOC- of COD-waarden van de blanco op het tijdstip van monsterneming (mg/l),

C_{BA} = DOC- of COD-waarden van de blanco, zoals gemeten drie uur na het begin van de test (mg/l).

De mate van afbraak wordt op het dichtstbijzijnde hele procent afgerond.

Het percentage afbraak wordt bepaald als zijnde het percentage DOC- of COD-verwijdering van de onderzochte stof.

Het verschil tussen de waarde gemeten na drie uur en de berekende of bij voorkeur gemeten oorspronkelijke waarde kan nuttige informatie verschaffen over de verwijdering van de stof (zie 3.2: Interpretatie van de resultaten).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Bij het onderzoeken van nieuwe stoffen kunnen referentiestoffen soms van nut zijn; er kunnen echter nog geen specifieke referentiestoffen worden aanbevolen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

In een glazen vat van 1 tot 4 liter inhoud, uitgerust met een roertoestel en een beluchtingsapparaat, worden actief slib, minerale voedingsstoffen en het testmateriaal als enige koolstofbron in water bij elkaar gebracht. Het mengsel wordt gedurende hooguit 28 dagen onder diffuus licht of in een donkere ruimte bij 20 tot 25 °C geroerd en belucht. Het verloop van het afbraakproces wordt gevolgd door het dagelijks of op andere geschikte gezette tijden bepalen van de DOC- of COD-waarden in de gefiltreerde oplossing. De verhouding tussen de verdwenen hoeveelheid DOC (of COD) bij elke meettijd en de hoeveelheid drie uur na het begin wordt uitgedrukt als het percentage biologische afbraak en dient voor het bepalen van de mate van afbraak op dat tijdstip.

Het resultaat wordt uitgezet tegen de tijd en geeft aldus de kromme van de biologische afbraak.

Wanneer een specifieke analytische methode wordt toegepast, kunnen de veranderingen in de concentratie van de uitgangsmolecule als gevolg van de biologische afbraak worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

▼B

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De reproduceerbaarheid van deze test is in een ringtest voldoende gebleken.

De gevoeligheid van de methode wordt grotendeels bepaald door de veranderlijkheid van de blanco en, in mindere mate, door de nauwkeurigheid van de bepaling van opgeloste organische koolstof en van de concentratie von de testverbinding in de vloeistof.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. *Preparaten*

1.6.1.1. Reagentia

Water: drinkwater met een organisch-koolstofgehalte kleiner dan 5 mg/1. De totale concentratie van calcium- en magnesiumionen te zamen mag 2,7 mmol/1 niet overschrijden; zonodig moet met gedeïoniseerd of gedestilleerd water worden verdund.

Zwavelzuur, analytisch reagens (AR):	50 g/l
Natriumhydroxideoplossing AR:	40 g/l

Minerale nutriëntoplossingen: hiervoor wordt in 1 liter gedeïoniseerd water opgelost:

ammoniumchloride, NH_4Cl, AR:	38,5 g
natriumdiwaterstoffosfaat, NaH_2PO_4 2 H_2O, AR:	33,4 g
kaliumdiwaterstoffosfaat, KH_2PO_4, AR:	8,5 g
di-kaliumwaterstoffosfaat, K_2HPO_4, AR:	21,75 g

Dit mengsel dient tegelijkertijd als voedingsstof maar ook als buffer-aplossing.

1.6.1.2. Apparatuur

Glazen vaten met inhoud van 1 tot 4 liter (bij voorbeeld cilindervormige recipiënten).

Roerapparaat met glazen of metalen roerblad op een geschikte schacht. (De roerder moet 5 tot 10 cm boven de bodem van het vat ronddraaien.) Een magneetroerder met een roerstaaf van 7 tot 10 cm kan eveneens gebruikt worden.

Glazen buis met een inwendige diameter van 2 tot 4 mm voor het inleiden van lucht. De opening van de buis moet zich ongeveer 1 cm boven de bodem van het vat bevinden.

Centrifuge (ongeveer 3 550 g).

pH-meter.

Apparaat voor het meten van de opgeloste zuurstof.

Papieren filters.

▼B

Membraanfiltreerapparaat.

Membraanfilters, mazen van 0,45 μm. Membraanfilters zijn geschikt als vaststaat dat zij geen koolstof afgeven en bij het filtreren de stof niet absorberen.

Analyseapparatuur voor het bepalen van het organisch koolstofgehalte en het chemisch zuurstofverbruik.

1.6.1.3. Bereiding van het inoculum

Actief slib uit een biologische zuiveringsinstallatie wordt gewassen door (herhaald) centrifugeren of bezinken in het water dat gebruikt wordt voor de test (zie boven).

Het actief slib moet de juiste kenmerken hebben. Dergelijk slib kan worden betrokken van een goed werkende waterzuiveringsinstallatie. Om zoveel mogelijk verschillende soorten en stammen van bacteriën te verkrijgen kan het de voorkeur verdienen inocula van verschillende bronnen (bij voorbeeld verschillende zuiveringsinstallaties, bodemextracten, rivierwater en dergelijke) te mengen. Het mengsel moet dan worden behandeld als hierboven beschreven.

Voor het controleren van de activiteit van het actief slib, zie 1.6.2, onder „Functionele controle”.

1.6.1.4. Bereiding van de testoplossingen

In het testvat worden gebracht: 500 ml testwater, 2,5 ml/l minerale nutriëntoplossing en een hoeveelheid actief slib die overeenkomt met 0,2-1,0 g/l droge stof in het uiteindelijke mengsel. Hieraan wordt een voldoende hoeveelheid van een voorraadoplossing van de te onderzoeken stof toegevoegd, zodanig dat Het DOC-gehalte in het uiteindelijke mengsel 50-400 mg/l bedraagt. De overeenkomstige CODwaarden zijn 100-1 000 mg/l. Het volume wordt met testwater op een totaal van 1 tot 4 liter gebracht. De keuze van het volume wordt bepaald door het aantal monsters voor de DOC- of COD-bepaling en door de voor de analytische procedure benodigde volumes.

Doorgaans wordt een volume van 2 liter als voldoende beschouwd. Er wordt ten minste één blanco controlevat bereid dat parallel met elke testreeks wordt behandeld; het bevat alleen actief slib en minerale nutriëntoplossing, aangevuld met testwater tot hetzelfde totale volume als in de testvaten.

1.6.2. *Uitvoering van de test*

De testvaten worden geroerd met magneetroerders of schroefbladen onder gedempt licht of in het donker bij 20 tot 25 °C. Beluchting vindt plaats door middel van perslucht die met een wattenfilter en eventueel een wasfles wordt gereinigd. Er dient voor gezorgd te worden dat het slib niet bezinkt en de zuurstofconcentratie niet beneden de 2 mg/l daalt.

De pH-waarde wordt op gezette tijden (bij voorbeeld dagelijks) gemeten en zonodig bijgesteld tot pH 7 à 8.

▼B

Verliezen ten gevolge van verdamping worden vlak voor de monsterneming aangevuld met gedeïoniseerd of gedestilleerd water in de vereiste hoeveelheden. Een goede methode bestaat erin, het vloeistofniveau voor het begin van de proef aan te duiden op het vat. Na elke monsterneming worden, bij uitgeschakelde beluchting en beroering, nieuwe aanduidingen aangebracht. De eerste monsters worden steeds drie uur na het begin van de test genomen, teneinde adsorptie van testmateriaal aan het actief slib te kunnen ontdekken.

De verwijdering van het testmateriaal wordt gevolgd aan de hand van DOC- of COD-bepalingen, welke dagelijks of op andere gezette tijden worden uitgevoerd. De monsters uit het testvat en de blanco's worden gefiltreerd door een zorgvuldig gewassen papieren filter. De eerste 5 ml filtraat van de testoplossing worden niet gebruikt. Moeilijk filtreerbaar slib kan worden afgescheiden door voorafgaand centrifugeren gedurende tien minuten. DOC- en COD-bepalingen worden ten minste in duplo uitgevoerd. De test duurt maximaal 28 dagen.

Opmerking: Monsters die troebel blijven, worden gefiltreerd door membraanfilters. De membraanfilters mogen geen organisch materiaal afgeven of adsorberen.

Functionele controle van het actieve slib

Parallel met elke testreeks wordt een vat met een bekende stof onderzocht teneinde de functionele capaciteit van het actieve slib te controleren. Diëthyleenglycol is voor dit doel bruikbaar gebleken.

Adaptatie

Indien de analyses met betrekkelijk korte intervallen worden uitgevoerd (bij voorbeeld dagelijks), komt het adaptatiefenomeen duidelijk tot uiting in de afbraakkromme (zie figuur 2). Om deze reden wordt de test niet vlak voor het weekeinde gestart.

Indien adaptatie in de laatste dagen van de test optreedt, kan de test worden verlengd tot de afbraak is beëindigd.

Opmerking: Indien een grondiger kennis van het gedrag van het geadapteerde slib nodig is, wordt hetzelfde actief slib nogmaals met hetzelfde testmateriaal in contact gebracht volgens de volgende procedure:

De roermotor en het beluchtingsapparaat worden uitgeschakeld en men laat het actief slib bezinken. De bovendrijvende vloeistof wordt verwijderd, het volume wordt met water op 2 liter gebracht, vervolgens wordt er vijftien minuten geroerd, waarna men het slib weer laat bezinken. Nadat de bovendrijvende vloeistof weer is verwijderd, wordt het resterende slib gebruikt om de test met hetzelfde materiaal volgens 1.6.1.4 en 1.6.2 te herhalen. Het actief slib kan ook door centrifugeren in plaats van door bezinken worden afgezonderd.

Het geadapteerde slib kan met vers slib worden gemengd tot een totale hoeveelheid van 0,2-1 g droog gewicht per liter.

▼B

Analyse

Doorgaans worden de monsters gefiltreerd door een grondig gewassen papieren filter (voor het wassen wordt gedeïoniseerd water gebruikt).

Monsters die troebel blijven, worden door membraanfilters gefiltreerd (0,45 μm).

De DOC-concentratie in de filtraten van het monster (eerste 5 ml worden niet gebruikt) wordt, in duplo, bepaald met behulp van het DOC-instrument. Als analyse van de filtraten op dezelfde dag niet mogelijk is, worden deze tot de volgende dag in de koelkast bewaard. Langer bewaren wordt niet aanbevolen.

De COD-concentratie in de nitraten van het monster wordt bepaald met een COD-analyseapparaat volgens de procedure beschreven in referentie (2).

2. **RESULTATEN**

De DOC-en COD-concentraties in de monsters worden ten minste in duplo bepaald volgens 1.6.2. Het percentage afbraak op tijdstip T wordt berekend volgens de bij 1.2 gegeven formule (met definities).

De mate van afbraak wordt naar het dichtstbijzijnde geheel percent afgerond. De mate van afbraak die aan het eind van de test is verkregen, wordt opgegeven als de „biologische afbreekbaarheid in de Zahn-Wellens test".

Opmerking: Indien volledige afbraak bereikt wordt voor het einde van de testduur en dit resultaat door een tweede analyse op de volgende dag wordt bevestigd, kan de test worden beëindigd.

3. **VERSLAG**

3.1. TESTVERSLAG

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— de beginconcentratie van de teststof,

— alle andere gegevens en experimentele resultaten betreffende de onderzochte stof, de referentiestof, indien gebruikt, en de blanco,

— de concentratie na drie uur,

— de biologische afbraakkromme met een toelichting,

— datum en plaats van monsterneming van het inoculum, adaptatietoestand, gebruikte concentratie, enz.,

— wetenschappelijke verantwoording voor eventuele wijzigingen in de testprocedure.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Geleidelijke verwijdering van DOC of COD in de loop van dagen of weken betekent dat de teststof biologisch wordt afgebroken.

▼B

Fysisch-chemische adsorptie kan echter in sommige gevallen een rol spelen en dit wordt aangetoond door een gehele of gedeeltelijke verwijdering van de teststof gedurende de eerste drie uur en door het onverwacht klem blijven van het verschil tussen de resultaten bekomen met de controlevloeistof en de bovendrijvende vloeistof.

Als er onderscheid moet worden gemaakt tussen de biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie, zijn aanvullende proeven nodig.

Dit kan op een aantal manieren geschieden, waarvan de meest geschikte erin bestaat de bovendrijvende vloeistof als inoculum te gebruiken in een test van het basisniveau (bij voorkeur een respirometrische test).

Stoffen die in deze test een grote mate van niet door adsorptie veroorzaakte verwijdering van DOC (COD) te zien geven, dienen te worden beschouwd als potentieel biologisch afbreekbaar. Een gedeeltelijke, niet door adsorptie veroorzaakte verwijdering duidt erop dat de stof ten minste in enige mate biologisch afbreekbaar is. Een geringe of ontbrekende verwijdering van DOC (COD) kan het gevolg zijn van remming van micro-organismen door de teststof en dit kan ook aan het licht komen door lysis en verlies van slib, hetgeen leidt tot troebele bovendrijvende vloeistoffen. In een dergelijk geval moet de test worden herhaald met een lagere concentratie van teststof.

Door toepassing van een voor een verbinding specifieke analytische methode of van een met ^{l4}C gemerkte teststof kan een grotere gevoeligheid worden bereikt. Bij onderzoek van een ^{14}C-verbinding vormt het terugvinden van $^{14}CO_2$ de bevestiging dat biologische afbraak heeft plaatsgevonden.

Wanneer resultaten worden uitgedrukt in termen van primaire biologische afbraak dient er, zo mogelijk, een verklaring gegeven te worden over de wijziging van de chemische structuur die leidt tot een vermindering van de respons van de oorspronkelijke teststof.

De validatie van de analytische methode moet opgegeven worden te zamen met de respons die gevonden werd met het blanco-testmedium.

4. **REFERENTIES**

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 302* B, Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

(2) Bijlage V, C.9 Degradatie: Chemisch zuurstofverbruik, Richtlijn 84/449/EEG van de Commissie, *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen* nr. L 25 van 19.9.1984.

▼B

Aanhangsel

VOORBEELD VAN EEN VERSLAG

Organische verbinding:	4-Ethoxybenzoczuur
Theoretische testconcentratie:	600 mg/l
Theoretische DOC:	390 mg/l
Entmateriaal:	Waterzuiveringsinstallatie van …
Concentratie:	1 g droge stof per liter
Adaptatietoestand:	niet geadapteerd
Analyse:	DOC-bepaling
Monstervolume:	3 ml
Controlestof:	Diëthyleenglycol
Toxiciteit van de verbinding:	Geen toxische effecten beneden 1 000 mg/l Gebruikte test: fermentatie/buizentest

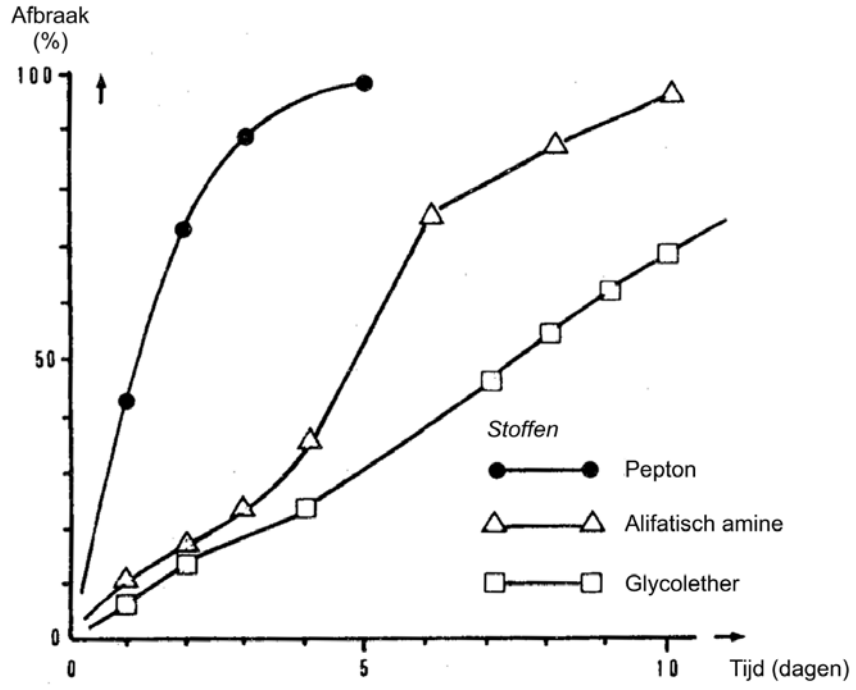
Testtijd	Controlestof				Teststof		
	Blanco DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	Netto DOC mg/l	Afbraak %	DOC (1) mg/l	Netto DOC mg/l	Afbraak %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3, uur	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dagen	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dagen	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dagen	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dagen	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dagen	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dagen	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dagen	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Gemiddelde waarden van bepalingen in triplo.

▼B

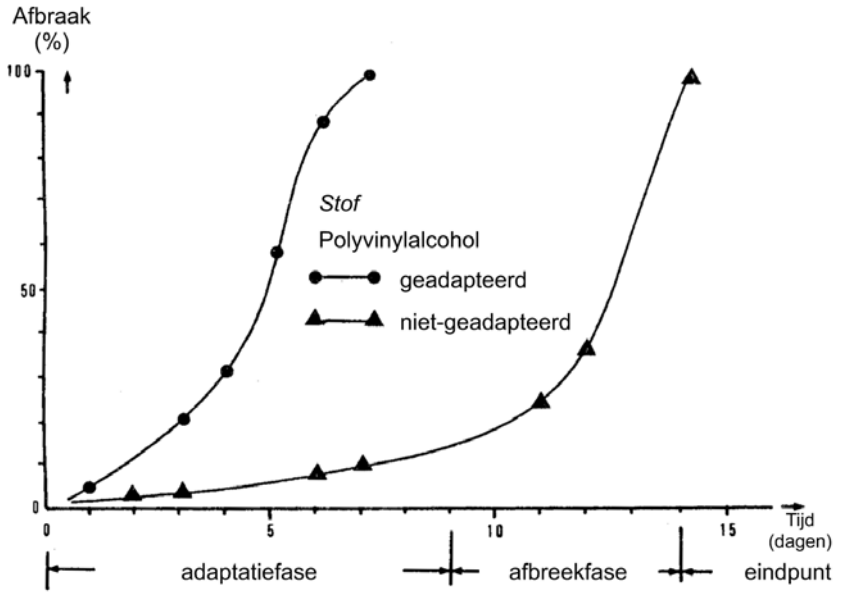
Figuur 1

Voorbeelden van krommen van de biologische afbraak



Figuur 2

Voorbeelden van adaptatie van slib



▼M4

C.10. **SIMULATIETEST AEROBE RIOOLWATERZUIVERING: C.10-A: ACTIEFSLIBINSTALLATIES — C.10-B: BIOFILMS**

C.10-A: Actiefslibinstallaties

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 303 (2001) van de OESO (TG 303). In de jaren 1950 bleek dat de nieuwe oppervlakteactieve stoffen die in het milieu werden gebracht, leidden tot overmatige schuimvorming in rioolwaterzuiveringsinstallaties en rivieren. Bij de aerobe zuivering werden deze stoffen niet volledig verwijderd en in sommige gevallen verhinderden zij de verwijdering van ander organisch materiaal. Daarom werd veel onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om oppervlakteactieve stoffen uit rioolwater te verwijderen en naar de vraag of nieuwe stoffen die door de chemische industrie werden geproduceerd, geschikt waren voor rioolwaterzuivering. Hierbij werd gebruikgemaakt van modelinstallaties voor de twee voornaamste soorten aerobe biologische rioolwaterbehandeling (actief slib en filtering door percolatie of druppelfilters). Verspreiding en monitoring van elke nieuwe chemische stof in grootschalige rioolwaterzuiveringen zou, zelfs op plaatselijk niveau, onpraktisch en zeer kostbaar zijn geweest.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

Actiefslibinstallaties

2. Er zijn modellen van actiefslibinstallaties beschreven met een omvang tussen 300 ml en ongeveer 2 000 ml. Sommige waren een realistische imitatie van installaties op ware grootte, met bezinkingsvijvers waaruit het bezonken slib werd teruggepompt in de beluchtingstank, terwijl andere, zoals die van Swisher (1), geen bezinkingsvoorziening hadden. De omvang van de apparatuur is een compromis: enerzijds moet de apparatuur groot genoeg zijn om de mechanische bewerking met succes te kunnen uitvoeren en een toereikende hoeveelheid monsters te kunnen leveren zonder de bewerking te verstoren, terwijl de apparatuur anderzijds niet te veel plaats mag innemen en niet te veel materialen mag vergen.

3. Twee soorten apparatuur die veelvuldig en naar tevredenheid zijn gebruikt, zijn de installatie van Husmann (2) en de „poreuze pot” (3)(4), voor het eerst gebruikt bij de bestudering van oppervlakteactieve stoffen; zij worden in deze testmethode beschreven. Ook andere apparaten zijn naar tevredenheid gebruikt, bv. de installatie van Eckenfelder (5). Omdat de uitvoering van die simulatietest relatief hoge kosten en grote inspanningen vergt, werd tegelijkertijd onderzoek gedaan naar eenvoudigere en goedkopere screeningtests, die inmiddels zijn opgenomen in hoofdstuk C.4 A-F van deze bijlage (6). De ervaring met vele oppervlakteactieve en andere stoffen heeft uitgewezen dat stoffen die de screeningtests doorstonden (en dus gemakkelijk biologisch afbreekbaar waren) ook afbreekbaar bleken bij de simulatietest. Sommige stoffen die de screeningtests niet doorstonden, doorstonden wel de tests op inherente biologische afbreekbaarheid (hoofdstukken C.12 (7) en C.19 (8) van deze bijlage), maar van deze laatste groep bleken er slechts enkele afbreekbaar in de simulatietest, terwijl de stoffen die de test op inherente biologische afbreekbaarheid niet doorstonden, ook niet afbreekbaar bleken in de simulatietests (9)(10)(11).

4. Voor sommige doeleinden volstaan simulatietests die onder één reeks bedrijfsomstandigheden worden uitgevoerd; de resultaten worden uitgedrukt als het percentage verwijderde teststof of opgeloste organische koolstof (DOC). In deze testmethode wordt een beschrijving van een dergelijke test gegeven. In tegenstelling tot de eerdere versie van dit hoofdstuk, waarin slechts één soort apparatuur werd beschreven die kunstmatig afvalwater

▼M4

behandelde met gekoppelde eenheden volgens een vrij grove slibafvoermethode, biedt deze tekst echter een aantal varianten. Er worden alternatieven beschreven voor het soort apparatuur, de werkwijze, het afvalwater en de slibafvoer. De tekst sluit nauw aan bij die van ISO 11733 (12), die tijdens de voorbereiding zorgvuldig is onderzocht, hoewel de methode niet aan een ringonderzoek is onderworpen.

5. Voor andere doeleinden moet de concentratie van de teststof in het effluent nauwkeuriger bekend zijn en is een uitgebreidere methode vereist. Daarbij moet bijvoorbeeld gedurende de testperiode elke dag het percentage afgevoerd slib preciezer worden gecontroleerd en moeten de installaties bij een aantal afvoerpercentages functioneren. Bij de meest uitgebreide methode moeten tests bij twee of drie verschillende temperaturen worden verricht: een dergelijke methode is beschreven door Birch (13)(14) en samengevat in aanhangsel 6. De huidige kennis is echter ontoereikend om te kunnen beslissen welke van de kinetische modellen van toepassing zijn op de biologische afbreekbaarheid van stoffen in een rioolwaterzuiveringsinstallatie en in het aquatisch milieu in het algemeen. Het model van Monod, dat bij wijze van voorbeeld in aanhangsel 6 wordt gegeven, is alleen geldig voor stoffen die in een concentratie van 1 mg/l of meer aanwezig zijn, maar volgens sommigen moet ook dit nog worden onderbouwd. In aanhangsel 7 worden tests vermeld die kunnen worden uitgevoerd bij concentraties die meer overeenstemmen met de in de praktijk in rioolwater aangetroffen niveaus, maar zij zijn, evenals die in aanhangsel 6, opgenomen in aanhangsels en worden niet als afzonderlijke testmethoden verstrekt.

Filters

6. Modellen met percolatiefilters hebben veel minder aandacht gekregen, mogelijk omdat zij omslachtiger en minder compact zijn dan modellen van actiefslibinstallaties. Gerike *et al.* hebben druppelfilterinstallaties ontwikkeld en toegepast met gekoppelde eenheden (15). Die filters waren relatief groot (2 m hoog; volume 60 l) en elk filter had een zuiveringscapaciteit van slechts 2 l/h. Baumann *et al.* (16) hebben druppelfilters gesimuleerd door strips van polyester („fleece") in 1 m lange buizen (binnendiameter 14 mm) te plaatsen nadat zij gedurende 30 minuten in geconcentreerd actief slib waren ondergedompeld. De teststof werd, als enige koolstofbron in een oplossing van minerale zouten, van de bovenzijde door de verticale buis geleid en de biologische afbreekbaarheid werd beoordeeld door in het effluent de DOC te meten en in het ontsnappende gas de CO_2.

7. Biofilters zijn op een andere manier gesimuleerd (15): naar het binnenoppervlak van roterende buizen, die een kleine hoek met het horizontale vlak maakten, werd afvalwater (ongeveer 250 ml/h) met en zonder teststof geleid; de verzamelde effluenten werden op DOC en/of de specifieke teststof geanalyseerd.

PRINCIPE VAN DE TEST

8. Deze methode is ontworpen om in een continu werkend testsysteem dat het actiefslibproces nabootst de eliminatie en de primaire en/of totale biologische afbraak van in water oplosbare organische stoffen door aerobe microorganismen te bepalen. Als koolstof- en energiebronnen voor de microorganismen worden een gemakkelijk biologisch afbreekbaar organisch medium en de organische teststof gebruikt.

9. Er vinden parallelle bepalingen, onder identieke omstandigheden, plaats met twee continu werkende testinstallaties (actiefslibinstallaties of poreuze potten) die geschikt worden geacht voor de doeleinden van de test. Normaliter bedraagt de gemiddelde hydraulische retentietijd zes uur en de gemiddelde slibleeftijd (slibretentietijd) zes tot tien dagen. Het slib wordt afgevoerd met een van beide methoden; de teststof wordt normaliter in een concentratie tussen 10 mg/l opgeloste organische koolstof (DOC) en 20 mg/l DOC toegevoegd aan het influent (organisch medium) van slechts een van de installaties. De tweede installatie wordt gebruikt als controle-installatie om de biologische afbreekbaarheid van het organische medium te bepalen.

▼M4

10. In frequent genomen monsters van beide effluenten wordt bij voorkeur de DOC bepaald, of anders het chemisch zuurstofverbruik (CZV), en in het effluent van de installatie waarin de teststof is geleid, wordt de concentratie van de teststof (indien vereist) door middel van een specifieke analyse bepaald. Het verschil tussen de DOC- of CZV-concentraties in het effluent van de testinstallatie en de controle-installatie wordt toegeschreven aan de teststof of de organische metabolieten ervan. Dit verschil wordt met de aan de toegevoegde teststof toegeschreven DOC- of CZV-concentratie van het influent vergeleken om de eliminatie van de teststof te bepalen.

11. De biologische afbraak kan normaliter van de biologische adsorptie worden onderscheiden door zorgvuldige bestudering van de eliminatie-tijdcurve en kan doorgaans worden bevestigd door de uitvoering van een test op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid met behulp van een geacclimatiseerd entmateriaal uit de installatie waarin de teststof is geleid.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

12. De zuiverheid, oplosbaarheid in water, vluchtigheid en adsorptie-eigenschappen van de teststof moeten bekend zijn om de resultaten goed te kunnen interpreteren. Normaliter kunnen vluchtige en onoplosbare stoffen niet worden getest, tenzij er speciale voorzorgsmaatregelen worden genomen (zie aanhangsel 5). Ook de chemische structuur, of ten minste de molecuulformule, moet bekend zijn om theoretische waarden te kunnen berekenen en/of de gemeten waarden van parameters te kunnen controleren (bv. theoretisch zuurstofverbruik (ThOD), opgeloste organische koolstof (DOC) en chemisch zuurstofverbruik (CZV)).

13. Informatie over de giftigheid van de teststof voor micro-organismen (zie aanhangsel 4) kan nuttig zijn voor het kiezen van de juiste testconcentraties en kan essentieel zijn voor een juiste interpretatie van lage waarden voor de biologische afbraak.

NIVEAUS WAARBIJ DE TEST WORDT DOORSTAAN

14. Bij de eerste uitvoering van deze (bevestigende) simulatietest ter bepaling van de primaire biologische afbreekbaarheid van oppervlakteactieve stoffen, moet meer dan 80 % van de specifieke stof worden verwijderd om de oppervlakteactieve stof te mogen verhandelen. Als de waarde van 80 % niet wordt gehaald, kan deze (bevestigende) simulatietest worden uitgevoerd en mag de oppervlakteactieve stof alleen worden verhandeld als meer dan 90 % van de specifieke stof wordt verwijderd. Voor stoffen in het algemeen is er geen sprake van dat de test al dan niet kan worden doorstaan en kan het verkregen verwijderingspercentage worden gebruikt in berekeningen voor de schatting van de waarschijnlijke milieuconcentratie die voor de beoordeling van de gevaren van stoffen wordt gebruikt. Bij de resultaten is het vaak „alles of niets”. In een aantal studies van zuivere stoffen die een significante mate van biologische afbreekbaarheid vertoonden, bedroeg het gevonden DOC-verwijderingspercentage voor meer dan drie kwart van de stoffen > 90 % en voor meer dan 90 % van de stoffen > 80 %.

15. Relatief weinig stoffen (bv. oppervlakteactieve stoffen) zijn in de bij deze test gebruikte concentraties (ongeveer 10 mg C/l) in het afvalwater aanwezig. Sommige stoffen kunnen bij deze concentraties een inhibitoire werking hebben, terwijl de kinetiek van de verwijdering van andere stoffen bij lage concentraties anders kan zijn. Een nauwkeurigere beoordeling van de afbraak kan worden verkregen door gewijzigde methoden toe te passen, waarbij realistische lage concentraties van de teststof worden gebruikt, en de verzamelde gegevens kunnen worden gebruikt om kinetische constanten te berekenen. De benodigde experimentele technieken zijn echter nog niet volledig gevalideerd en de kinetische modellen die de reacties van de biologische afbraak beschrijven, zijn nog niet vastgesteld (zie aanhangsel 7).

▼M4

REFERENTIESTOFFEN

16. Om te waarborgen dat de experimentele procedure correct wordt uitgevoerd, kan het soms nuttig zijn gelijktijdig met de onderzochte teststof andere stoffen te testen waarvan het gedrag bekend is. Daarbij kan het gaan om stoffen als adipinezuur, 2-fenylfenol, 1-naftol, difenylzuur en 1-naftoëzuur (9)(10)(11).

REPRODUCEERBAARHEID VAN TESTRESULTATEN

17. Er zijn veel minder studieverslagen over simulatietests dan over tests op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid. De reproduceerbaarheid tussen (gelijktijdige) duplo's is goed (binnen 10-15 %) voor teststoffen die voor ten minste 80 % afbraken, maar voor minder goed afgebroken stoffen is de variabiliteit groter. Ook voor sommige stoffen die een grensgeval zijn, werden tijdens de negen weken dat de test mag duren, bij verschillende gelegenheden zeer uiteenlopende resultaten (bv. 10 % en 90 %) geregistreerd.

18. De resultaten met de twee soorten apparatuur ontliepen elkaar niet veel, maar sommige stoffen braken in huishoudelijk afvalwater beter en consistenter af dan in kunstmatig OESO-afvalwater.

BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Apparatuur

Testsysteem

19. Het testsysteem voor één teststof bestaat uit een testinstallatie en een controle-installatie; wanneer echter uitsluitend specifieke analysen worden verricht (primaire biologische afbreekbaarheid), volstaat een testinstallatie. Een controle-installatie kan worden gebruikt voor verscheidene testinstallaties met dezelfde of verschillende teststoffen. Als testeenheden worden gekoppeld (aanhangsel 3), moet elke testinstallatie haar eigen controle-installatie hebben. Het testsysteem kan hetzij een actiefslibmodel volgens Husmann (aanhangsel 1, figuur 1), hetzij een poreuze pot (aanhangsel 1, figuur 2) zijn. In beide gevallen zijn opslagtanks van voldoende omvang voor het influent en het effluent vereist, evenals pompen voor de dosering van het influent (al dan niet gemengd met de oplossing van de teststof).

20. Elke actiefslibinstallatie bestaat uit een beluchtingsvat met een bekende capaciteit van ongeveer 3 liter actief slib en een nabezinkvat (secundaire zuivering) met een inhoud van ongeveer 1,5 liter; de volumes kunnen enigszins worden gewijzigd door de hoogte van het nabezinkvat aan te passen. Vaten van een andere omvang zijn toegestaan als deze onder een vergelijkbare hydraulische belasting worden gebruikt. Als de temperatuur in de testkamer niet binnen het gewenste bereik kan worden gehouden, wordt aanbevolen watermantelvaten met regelbare watertemperatuur te gebruiken. Om het actief slib uit het nabezinkvat terug te leiden naar het beluchtingsvat, wordt een continu of niet-continu functionerende persluchtpomp of doseerpomp gebruikt.

21. Het poreuzepotsysteem bestaat uit een poreuze binnencilinder met een kegelvormige bodem, geplaatst in een iets groter vat met dezelfde vorm, dat echter uit ondoordringbare kunststof bestaat. Een geschikt materiaal voor het poreuze vat is poreus polyethyleen met een maximale poriegrootte van 90 μm en een dikte van 2 mm. Het slib wordt van het behandelde organische medium gescheiden door differentiële passage door de poreuze wand. Het effluent wordt verzameld in de ringvormige ruimte, waaruit het overloopt in het opvangvat. Aangezien er geen bezinking plaatsvindt, wordt het slib niet teruggeleid. Het hele systeem kan worden gemonteerd in een waterbad met

▼M4

temperatuurregeling. In het begin kunnen poreuze potten verstopt raken en overstromen. In dat geval wordt de poreuze voering door een schone voering vervangen, waarbij eerst het slib uit de pot in een schone emmer wordt overgeheveld. Na de ondoordringbare buitencilinder te hebben schoongeveegd, wordt een schone voering aangebracht en wordt het slib weer in de pot overgebracht. Ook slib dat aan de verstopte voering is blijven plakken, wordt zorgvuldig afgeschraapt en overgebracht. Reinig verstopte potten eerst door met een fijne waterstraal het achterblijvende slib te verwijderen en de pot te dompelen in een verdunde oplossing van natriumhypochloriet en vervolgens in water, gevolgd door grondig spoelen met water.

22. Voor het beluchten van het slib in de beluchtingsvaten van beide systemen moeten geschikte technieken worden toegepast, bijvoorbeeld poreus materiaal (beluchtingsstenen) en perslucht. De lucht moet zo nodig door een geschikt filter worden gezuiverd en gereinigd. Er moet voldoende lucht door het systeem gaan om op ieder moment van de test aerobe omstandigheden te behouden en slibvlokken in suspensie te houden.

Filtreerapparaat of centrifuge

23. Apparaat voor het filtreren van monsters over membraanfilters met een geschikte porositeit (nominale openingsdiameter 0,45 μm) die oplosbare organische stoffen adsorberen en zo min mogelijk organische koolstof vrij laten komen. Als filters worden gebruikt die organische koolstof vrij laten komen, worden de filters zorgvuldig met warm water gewassen om uitloogbare organische koolstof te verwijderen. Bij wijze van alternatief kan een centrifuge worden gebruikt die een versnelling van 40 000 m/s^2 kan produceren.

Analyseapparatuur

24. Apparatuur die nodig is voor de bepaling van:

— DOC (opgeloste organische koolstof) en TOC (totale hoeveelheid organische koolstof) of CZV (chemisch zuurstofverbruik);

— de specifieke stof, indien nodig;

— gesuspendeerde vaste stoffen, pH, zuurstofconcentratie in water;

— temperatuur, zuurgraad en alkaliteit;

— ammonium, nitriet en nitraat, als de test wordt uitgevoerd onder omstandigheden waarin nitrificatie mogelijk is.

Water

25. Kraanwater met een DOC-gehalte van minder dan 3 mg/l. Bepaal de alkaliteit, tenzij deze al bekend is.

26. Gedeïoniseerd water met een DOC-gehalte van minder dan 2 mg/l.

Organisch medium

27. Als organisch medium is kunstmatig afvalwater, huishoudelijk afvalwater of een mengsel van beide soorten afvalwater toegestaan. Gebleken is (11)(14) dat het gebruik van huishoudelijk afvalwater alleen veelal een hoger percentage DOC-verwijdering oplevert en dat daarin zelfs bepaalde stoffen verwijderd en biologisch afgebroken kunnen worden die bij gebruik van kunstmatig OESO-afvalwater niet afbreken. Bovendien wordt het actief slib vaak gestabiliseerd wanneer continu of met tussenpozen huishoudelijk afvalwater wordt toegevoegd, waardoor de cruciale goede bezinking kan plaatsvinden. Daarom wordt het gebruik van huishoudelijk afvalwater aanbevolen. Meet de DOC- of CZV-concentratie van elke nieuwe partij van het organische medium. De zuurgraad of alkaliteit van het organische medium moet bekend zijn. Als het organische medium een lage zuurgraad of alkaliteit heeft, kan het nodig zijn een geschikte bufferoplossing (natriumwaterstofcarbonaat of kaliumdiwaterstoffosfaat) toe te voegen om tijdens de test in het beluchtingsvat een pH-waarde van ongeveer 7,5 ± 0,5 te behouden. In elk afzonderlijk geval moet worden besloten hoeveel en op welk moment een bufferoplossing wordt toegevoegd. Wanneer voortdurend en/of met tussenpozen mengsels worden gebruikt, moet de DOC- (of CZV-)waarde van het mengsel ongeveer constant worden gehouden, bijvoorbeeld door verdunning met water.

▼M4

Kunstmatig afvalwater

28. Per liter leidingwater worden opgelost: pepton, 160 mg; vleesextract, 110 mg; ureum, 30 mg; watervrij dikaliumwaterstoffosfaat (K_2HPO_4), 28 mg; natriumchloride (NaCl), 7 mg; calciumchloridedihydraat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; magnesiumsulfaatheptahydraat ($Mg_2SO_4.7H_2O$), 2 mg. Dit kunstmatig OESO-afvalwater is een voorbeeld en geeft een gemiddelde DOC-concentratie in het influent van ongeveer 100 mg/l. Bij wijze van alternatief mogen ook andere samenstellingen worden gebruikt die ongeveer dezelfde DOC-concentratie opleveren en het feitelijke afvalwater beter benaderen. Als een minder geconcentreerd influent vereist is, wordt het kunstmatige afvalwater met kraanwater verdund, bijvoorbeeld in een verhouding van 1:1 om een concentratie van ongeveer 50 mg/l te bereiken. Een dergelijk minder geconcentreerd influent bevordert de groei van nitrificerende organismen en moet worden gebruikt wanneer nitrificerende rioolwaterzuiveringsinstallaties moeten worden gesimuleerd. Dit kunstmatige afvalwater mag in geconcentreerde vorm van gedistilleerd water worden bereid en ten hoogste één week worden bewaard bij ongeveer 1 °C. Zo nodig wordt het met kraanwater verdund. (Dit medium is onbevredigend, bijvoorbeeld omdat het stikstofgehalte zeer hoog is en het koolstofgehalte relatief laag, maar er is nog geen beter voorstel gedaan, afgezien van de toevoeging van meer fosfaat als buffer en extra pepton).

Huishoudelijk afvalwater

29. Gebruik vers bezonken rioolwater dat dagelijks wordt verzameld uit een rioolwaterzuiveringsinstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Het wordt voorafgaand aan de primaire bezinking verzameld uit het overloopkanaal van de primaire bezinkingstank of uit de inlaat van de actiefslibinstallatie en moet grotendeels vrij zijn van grove deeltjes. Het rioolwater kan worden gebruikt na enige dagen (gewoonlijk niet meer dan zeven) bij ongeveer 4 °C te zijn bewaard, mits aangetoond wordt dat tijdens de opslag de DOC- (of CZV-)waarde niet significant (met minder dan 20 %) is gedaald. Om verstoringen van het systeem te voorkomen, moet de DOC (of het CZV) van elke nieuwe partij voor gebruik op een passende constante waarde worden gebracht, bijvoorbeeld door verdunning met kraanwater.

Actief slib

30. Verzamel actief slib voor het enten uit de beluchtingstank van een goed functionerende rioolwaterzuiveringsinstallatie of uit een actiefslibinstallatie op laboratoriumschaal, die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater verwerkt.

Stamoplossingen van de teststof

31. Bereid voor stoffen die voldoende oplosbaar zijn, stamoplossingen in een geschikte concentratie (bv. 1 tot 5 g/l) in gedeïoniseerd water of in de minerale fractie van het kunstmatig afvalwater (zie aanhangsel 5 voor onoplosbare en vluchtige stoffen). Bepaal de DOC en de totale hoeveelheid organische koolstof (TOC) van de stamoplossing en herhaal de metingen voor elke nieuwe partij. Controleer, als het verschil tussen de DOC en de TOC groter is dan 20 %, de oplosbaarheid in water van de teststof. Vergelijk de DOC of de met een specifieke analyse van de stamoplossing bepaalde concentratie van de teststof met de nominale waarde om vast te stellen of de recovery toereikend is (normaliter kan een waarde van > 90 % worden verwacht). Bepaal, in het bijzonder voor dispersies, of al dan niet gebruik kan worden gemaakt van de DOC als analytische parameter, dan wel of alleen een specifieke analysetechniek voor de teststof kan worden gebruikt. Monsters van dispersies moeten worden gecentrifugeerd. Voor elke nieuwe partij wordt de DOC of het CZV gemeten, dan wel de teststof met een specifieke analyse.

▼M4

32. Bepaal de pH van de stamoplossing. Extreme waarden wijzen erop dat de toevoeging van de stof van invloed kan zijn op de pH van het actief slib in het testsysteem. Neutraliseer in dat geval de stamoplossing met kleine hoeveelheden van een anorganisch zuur of een anorganische base om een pH van 7 ± 0,5 te verkrijgen, maar let erop dat de teststof niet neerslaat.

PROCEDURE

33. De procedure wordt beschreven voor de actiefslibinstallaties; voor het poreuzepotsysteem zijn enige aanpassingen nodig.

Bereiding van het entmateriaal

34. Aan het begin van de test wordt het testsysteem geënt met actief slib of een entmateriaal met een lage concentratie micro-organismen. Bewaar het entmateriaal voorafgaand aan het gebruik in beluchte toestand bij kamertemperatuur en gebruik het binnen 24 uur. Neem in het eerste geval een monster van het actief slib uit de beluchtingstank van een goed functionerende biologische rioolwaterzuiveringsinstallatie of een laboratoriumzuiveringsinstallatie, die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Als omstandigheden moeten worden gesimuleerd waarin nitrificatie mogelijk is, wordt slib genomen van een nitrificerende rioolwaterzuiveringsinstallatie. Bepaal de concentratie gesuspendeerde vaste stoffen en concentreer het slib zo nodig door middel van bezinking, zodat zo min mogelijk volume aan het testsysteem wordt toegevoegd. Zorg voor een aanvangsconcentratie droge stof van ongeveer 2,5 g/l.

35. Gebruik in het tweede geval 2 tot 10 ml/l van het effluent van een biologische zuiveringsinstallatie voor huishoudelijk rioolwater als entmateriaal. Om zo veel mogelijk verschillende soorten bacteriën te krijgen, kan het nuttig zijn entmateriaal uit diverse andere bronnen toe te voegen, bijvoorbeeld uit het oppervlaktewater. In dat geval zal het actief slib zich in het testsysteem ontwikkelen en groeien.

Dosering van het organische medium

36. Zorg ervoor dat de houders voor het influent en het effluent en de slangen vanuit de influentvaten en naar de effluentvaten grondig zijn gereinigd om microbiële groei voorafgaand en gedurende de test te voorkomen. Monteer de testsystemen in een kamer met temperatuurregeling (normaliter tussen 20 en 25 °C) of gebruik testeenheden met watermantel. Bereid een toereikende hoeveelheid van het vereiste organisch medium (punten 27-29). Vul eerst het beluchtingsvat en het nabezinkvat met het organische medium en voeg daaraan het entmateriaal (punten 34 en 35) toe. Start de beluchting op zodanige wijze dat het slib in suspensie en in aerobe toestand wordt gehouden en begin met de dosering van het influent en de terugvoer van het bezonken slib. Pomp het organische medium uit opslagvaten in de beluchtingsvaten (punten 20 en 21) van de test- en controle-installatie en verzamel de respectieve effluenten in soortgelijke opslagvaten. Om de normale hydraulische retentietijd van 6 uur te verkrijgen, wordt het organische medium met 0,5 l/h in de vaten gepompt. Meet, om deze snelheid te controleren, de dagelijks ingebrachte hoeveelheid organisch medium door de afname van de hoeveelheid van het medium in de opslagvaten te noteren. Om de effecten van onderbroken afgifte van en schoksgewijze belasting met chemische stoffen te kunnen bepalen, zijn andere wijzen van dosering vereist.

37. Als het organische medium bereid wordt om gedurende meer dan één dag te worden gebruikt, moet het bij ongeveer 4 °C worden gekoeld of moet een andere conserveermethode worden toegepast om microbiële groei en biologische afbraak buiten de testinstallaties tegen te gaan (punt 29). Als kunstmatig afvalwater wordt gebruikt, kan een geconcentreerde stamoplossing (bv. tien keer de normale concentratie, punt 28) worden bereid en bij ongeveer 4 °C worden bewaard. Deze stamoplossing kan voor gebruik goed worden vermengd met een passende hoeveelheid kraanwater; een andere mogelijkheid is om de stamoplossing rechtstreeks in de vaten te pompen en afzonderlijk de juiste hoeveelheid kraanwater toe te voegen.

▼M4

Dosering van de teststof

38 Voeg een passende hoeveelheid van de stamoplossing van de teststof (punt 31) toe aan het opslagvat van het influent of pomp deze hoeveelheid met een afzonderlijke pomp rechtstreeks in het beluchtingsvat. De normale gemiddelde testconcentratie in het influent bedraagt 10 tot 20 mg/l DOC, met een hoogste concentratie van 50 mg/l. Als de teststof slecht oplosbaar is in water of toxische effecten worden verwacht, wordt de concentratie verlaagd naar 5 mg/l DOC of nog lager, maar alleen als er een geschikte specifieke analysemethode beschikbaar is en wordt toegepast (gedispergeerde teststoffen die slecht oplosbaar zijn in water, kunnen met speciale doseertechnieken worden toegevoegd; zie aanhangsel 5).

39. Begin, nadat het systeem is gestabiliseerd en efficiënt DOC uit het organische medium verwijderd (ongeveer 80 %), met het toevoegen van de teststof. Het is belangrijk dat vóór het toevoegen van de teststof wordt gecontroleerd of alle installaties even efficiënt functioneren; als dit niet het geval is, helpt het gewoonlijk om het afzonderlijke slib te mengen en gelijke hoeveelheden over de afzonderlijke installaties te herverdelen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van een entmateriaal van (ongeveer) 2,5 g/l actief slib (drooggewicht), kan de teststof vanaf het begin van de test worden toegevoegd, aangezien de directe toevoeging vanaf het begin van toenemende hoeveelheden als voordeel heeft dat het actief slib zich beter aan de teststof kan aanpassen. Ongeacht de wijze waarop de teststof wordt toegevoegd, wordt aanbevolen met regelmatige intervallen de relevante stroomsnelheid en/of de volumes in het opslagvat of de opslagvaten te meten.

Behandeling van actief slib

40. Ongeacht het gebruikte entmateriaal stabiliseert de concentratie van het actief slib gewoonlijk tijdens de test op een waarde tussen 1 en 3 g/l (drooggewicht), afhankelijk van de kwaliteit en de concentratie van het organische medium, de bedrijfsomstandigheden, de aard van de aanwezige micro-organismen en de invloed van de teststof.

41. Bepaal hetzij ten minste wekelijks de gesuspendeerde vaste stoffen in de beluchtingsvaten en voer de overmaat slib af om de concentratie tussen 1 en 3 g/l (drooggewicht) te houden, of houd de gemiddelde slibleeftijd op een constante waarde, gewoonlijk tussen zes en tien dagen. Als bijvoorbeeld een slibretentietijd van acht dagen wordt gekozen, wordt dagelijks 1/8 van het volume van het actief slib in het beluchtingsvat verwijderd en afgevoerd. Herhaal dit dagelijks of laat dit, bij voorkeur, uitvoeren door een automatische niet-continu functionerende pomp. Door de concentratie van de gesuspendeerde vaste stoffen constant, of binnen strikte grenswaarden, te houden, wordt niet gezorgd voor een constante slibretentietijd (SRT); dit is echter de operationele variabele die de waarde van de concentratie van de teststof in het effluent bepaalt.

42. Verwijder gedurende de test ten minste dagelijks het slib dat aan de wanden van het beluchtingsvat en het nabezinkvat plakt, zodat dit weer in suspensie wordt gebracht. Controleer en reinig regelmatig alle buizen en slangen om biofilmgroei te voorkomen. Voer het bezonken slib uit het nabezinkvat terug naar het beluchtingsvat, bij voorkeur door met onderbrekingen te pompen. In het poreuzepotsysteem vindt geen terugvoer plaats; zorg ervoor dat er schone binnenpotten zijn geplaatst voordat het volume in het vat significant toeneemt (punt 21).

43. In installaties van Husmann kan een slechte bezinking en verlies van slib optreden. Dit kan worden gecorrigeerd door in de test- en controle-installatie tegelijkertijd één of meer van de onderstaande acties te verrichten:

— met regelmatige intervallen, bijvoorbeeld wekelijks, kan vers slib of flocculant (bv. per vat 2 ml $FeCl_3$ van 50 g/l) worden toegevoegd, waarbij erop moet worden gelet dat de toevoeging van $FeCl_3$ geen reactie of neerslag van de teststof induceert;

▼M4

— de persluchtpomp kan worden vervangen door een peristaltische pomp, waardoor een slibrecirculatiestroom op gang kan worden gebracht die ongeveer gelijk is aan de vereiste influentstroom en de ontwikkeling van een anaerobe zone in het bezonken slib kan ontstaan (door de configuratie van de persluchtpomp kan de stroomsnelheid van het teruggevoerde slib niet lager zijn dan 12 keer de stroomsnelheid van het influent);

— er kan met onderbrekingen slib uit het nabezinkvat in het beluchtingsvat worden gepompt (bv. 5 minuten inschakeltijd per 2,5 uur om 1 tot 1,5 l/h terug te voeren);

— om verlies door schuimvorming te voorkomen, kan een minimale concentratie niet-toxisch antischuimmiddel worden gebruikt (bv. siliconenolie);

— het slib kan in het nabezinkvat kortstondig schoksgewijs worden belucht (bv. gedurende 10 s per uur);

— het organische medium kan met intervallen in het beluchtingsvat worden ingebracht (bv. gedurende 3 tot 10 minuten per uur).

Bemonstering en analyse

44. Meet met regelmatige tussenpozen het gehalte aan opgeloste zuurstof, de temperatuur en de pH-waarde van het actief slib in de beluchtingsvaten. Zorg ervoor dat er steeds voldoende zuurstof beschikbaar is (> 2 mg/l) en dat de temperatuur binnen het voorgeschreven bereik blijft (normaliter 20 tot 25 °C). Houd de pH-waarde op 7,5 ± 0,5 door kleine hoeveelheden van een anorganische base of een anorganisch zuur aan het beluchtingsvat of het influent toe te voegen of door de buffercapaciteit van het organische medium te vergroten (zie punt 27). Indien nitrificatie optreedt, wordt zuur geproduceerd, waarbij de oxidatie van 1 mg N het equivalent van ongeveer 7 mg CO_3– oplevert. De meetfrequentie hangt af van de te meten parameter en de stabiliteit van het systeem, en kan variëren van één keer per dag tot één keer per week.

45. Meet de DOC of het CZV in de influenten van de controle- en testvaten. Meet de concentratie van de teststof in het testinfluent door een specifieke analyse te verrichten of schat deze aan de hand van de concentratie in de stamoplossing (punt 31), het gebruikte volume en de in de testinstallatie ingebrachte hoeveelheid afvalwater. Om de variabiliteit van de concentratiegegevens te beperken, wordt aanbevolen de concentratie van de teststof te berekenen.

46. Neem passende monsters van het verzamelde effluent (bv. composietmonsters voor 24 uur) en filtreer de monsters over een membraan met poriegrootte 0,45 μm of centrifugeer ze gedurende ongeveer 15 minuten bij ongeveer 40 000 m/s^2. Als filtratie moeilijk is, moet worden gecentrifugeerd. Bepaal de DOC of het CZV ten minste in duplo om de totale biologische afbraak te meten en bepaal zo nodig de primaire biologische afbraak door een specifieke analyse voor de teststof uit te voeren.

47. Het gebruik van de COD kan bij lage concentraties analytische problemen opleveren en wordt daarom alleen aangeraden bij een voldoende hoge testconcentratie (ongeveer 30 mg/l). Voor sterk adsorberende stoffen wordt bovendien aanbevolen de in het slib geadsorbeerde hoeveelheid te meten met een op de teststof afgestemde specifieke analysetechniek.

48. De bemonsteringsfrequentie hangt af van de verwachte duur van de test. Een frequentie van drie keer per week wordt aanbevolen. Wacht nadat de installaties efficiënt functioneren, na inbrenging van de teststof één tot maximaal zes weken om het actief slib zich te laten aanpassen en een stationaire toestand te bereiken. Er moeten bij voorkeur ten minste 15 geldige waarden worden verkregen in de plateaufase (punt 59), die normaliter 3 weken duurt, om het testresultaat te evalueren. De test kan worden beëindigd als een toereikend eliminatiepercentage (bv. > 90 %) is bereikt en deze 15 waarden beschikbaar zijn, die afkomstig zijn van analysen die gedurende drie weken elke werkdag zijn verricht. De test mag normaliter na toevoeging van de teststof niet langer dan twaalf weken duren.

▼M4

49. Als in het slib nitrificatie plaatsvindt en bestudeerd moet worden welke invloed de teststof daarop heeft, worden ten minste één keer per week monsters van het effluent van de test- en controle-installatie geanalyseerd op ammonium en/of nitriet plus nitraat.

50. Alle analysen, en met name de stikstofbepalingen, worden zo spoedig mogelijk verricht. Als analysen moeten worden uitgesteld, worden de monsters in het donker bij ongeveer 4 °C bewaard in volle, goed afgesloten flessen. Als de monsters langer dan 48 uur moeten worden bewaard, worden zij geconserveerd door invriezen, zuurbehandeling (bv. 10 ml/l van een zwavelzuuroplossing van 400 g/l) of toevoeging van een geschikte toxische stof (bv. 20 ml/l van een kwik(II)chloride-oplossing van 10 g/l). De conserveertechniek mag de resultaten van de analyse niet beïnvloeden.

Koppeling van testinstallaties

51. Als gebruik moet worden gemaakt van gekoppelde installaties (aanhangsel 3), wordt dagelijks dezelfde hoeveelheid actief slib (150 tot 1 500 ml voor beluchtingsvaten die 3 liter vloeistof bevatten) uitgewisseld tussen de beluchtingsvaten van de testinstallatie en de controle-installatie daarvan. Als de teststof sterk aan het slib adsorbeert, wordt alleen het supernatans van de nabezinkvaten uitgewisseld. Gebruik in beide gevallen een correctiefactor om de testresultaten te berekenen (punt 55).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

52. Bereken met de volgende vergelijking de procentuele DOC- of CZV-eliminatie van de teststof voor elk beoordelingsmoment:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

waarbij

D_t = % DOC- of CZV-eliminatie op tijdstip t;

C_s = aan de teststof toegeschreven DOC of CZV in het influent, bij voorkeur geschat aan de hand van de stamoplossing (mg/l);

E = gemeten DOC- of CZV-waarde in het testeffluent op tijdstip t (mg/l);

E_o = gemeten DOC- of CZV-waarde in het controle-effluent op tijdstip t (mg/l).

53. De mate van DOC- of CZV-eliminatie van het organische medium in de controle-installatie is informatie die nuttig is voor de beoordeling van de biologische afbraakactiviteit van het actief slib tijdens de test. Bereken de procentuele eliminatie met de volgende vergelijking:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

waarbij

D_B = % DOC- of CZV-eliminatie van het organische medium in de controle-installatie op tijdstip t;

C_M = DOC of CZV van het organische medium in het controle-influent (mg/l).

▼M4

Desgewenst kan de procentuele DOC- of CZV-eliminatie als gevolg van het organische medium plus de teststof in de testinstallatie worden berekend met de volgende vergelijking:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

waarbij

D_T = % DOC- of CZV-eliminatie van het totale testinfluent;

C_T = DOC of CZV van het totale testinfluent of berekend aan de hand van de stamoplossingen (mg/l);

54. Bereken, als met een specifieke analysemethode de teststof wordt gemeten, voor elk meettijdstip de verwijdering van de teststof met de volgende vergelijking:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

waarbij

D_{ST} = % primaire eliminatie van teststof op tijdstip t;

S_i = gemeten of geschatte concentratie van de teststof in het testinfluent (mg/l);

S_e = gemeten concentratie van de teststof in het testeffluent op tijdstip t (mg/l).

55. Als gewerkt is met gekoppelde eenheden, wordt de verdunning van de teststof in het beluchtingsvat als gevolg van de uitwisseling van het slib gecompenseerd door een correctiefactor toe te passen (zie aanhangsel 3). Als de gemiddelde hydraulische retentietijd 6 uur bedraagt en de helft van het volume van het actief slib in het beluchtingsvat is uitgewisseld, moeten de bepaalde dagelijkse eliminatiewaarden (D_t, punt 52) met de volgende vergelijking worden gecorrigeerd om de feitelijke mate van eliminatie van de teststof D_{tc} te verkrijgen:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Uitdrukking van de testresultaten

56. Zet de procentuele eliminatie D_t (of D_{tc}) en D_{st}, indien beschikbaar, uit tegen de tijd (zie aanhangsel 2). Uit de vorm van de eliminatiecurve van de teststof (als zodanig of als DOC) kunnen enkele conclusies over het verwijderingsproces worden afgeleid.

Adsorptie

57. Als vanaf het begin van de test een grote mate van DOC-eliminatie van de teststof wordt waargenomen, wordt de teststof waarschijnlijk geëlimineerd door adsorptie aan de vaste stoffen van het actief slib. Dit kan worden aangetoond door met een specifieke analyse de geadsorbeerde teststof te bepalen. Het is niet gebruikelijk dat gedurende de hele test een hoge mate van DOC-eliminatie van adsorbeerbare stoffen plaatsvindt; normaliter is de mate van verwijdering in eerste instantie groot, waarna geleidelijk een evenwichtswaarde wordt bereikt. Als de adsorbeerbare teststof echter op de een of andere manier kan zorgen voor acclimatisering van de microbiële populatie, neemt de DOC-eliminatie van de teststof vervolgens toe en wordt een hoge plateauwaarde bereikt.

▼M4

Aanloopfase

58. Net als in statische screeningtests hebben veel teststoffen een aanloopfase nodig voordat volledige biologische afbraak plaatsvindt. In de aanloopfase vindt acclimatisering of aanpassing van de afbraakbacteriën plaats en wordt de teststof nagenoeg niet verwijderd; vervolgens gaan deze bacteriën groeien. Deze fase duurt totdat ongeveer 10 % van de initiële hoeveelheid teststof is verwijderd (nadat eventuele adsorptie heeft kunnen plaatsvinden); op dat moment begint de afbraakfase. De aanloopfase is vaak zeer variabel en slecht reproduceerbaar.

Plateaufase

59. In een continue test is de plateaufase van een eliminatiecurve de fase waarin de maximale afbraak plaatsvindt. De plateaufase moet ten minste drie weken duren en omvat ongeveer 15 geldige gemeten waarden.

Gemiddeld eliminatiepercentage van de teststof

60. Bereken het gemiddelde van de eliminatiewaarden (D_t) van de teststof in de plateaufase. Rond de gevonden waarde af op het dichtstbijzijnde gehele getal (1 %); dit is het eliminatiepercentage van de teststof. Aanbevolen wordt tevens het 95 %-betrouwbaarheidsinterval van de gemiddelde waarde te berekenen.

Eliminatie van het organische medium

61. Zet de procentuele eliminatie van de DOC of het CZV van het organische medium in de controle-installatie (D_B) uit tegen de tijd. Geef het gemiddelde eliminatiepercentage op dezelfde wijze aan als voor de teststof (punt 60).

Aanduiding van biologische afbraak

62. Als de teststof niet significant aan het actief slib adsorbeert en de eliminatiecurve een vorm heeft die typerend is voor biologische afbraak met aanloopfase, afbraakfase en plateaufase (punten 58 en 59), kan de gemeten eliminatie zonder meer aan biologische afbraak worden toegeschreven. Als een grote mate van initiële verwijdering heeft plaatsgevonden, kan in de simulatietest geen onderscheid worden gemaakt tussen biologische en niet-biologische eliminatieprocessen. In dergelijke gevallen, alsook in andere gevallen waarin getwijfeld wordt over de biologische afbraak (bv. als wordt gestript), moeten de geadsorbeerde teststoffen worden geanalyseerd of aanvullende statische biologischeafbraaktests worden verricht voor parameters die duidelijk op biologische processen wijzen. Dergelijke tests zijn de methoden voor zuurstofopname (hoofdstukken C.4 D, E en F van deze bijlage (6)), een test waarbij de productie van kooldioxide wordt gemeten (hoofdstuk C.4 C van deze bijlage (6)) en de ISO-gasruimteproef (18), waarvoor van tevoren blootgesteld entmateriaal uit de simulatietest wordt gebruikt. Als de verwijdering van zowel de DOC als de specifieke stof is gemeten, wijzen significante verschillen tussen beide verwijderingspercentages (waarbij het eerste lager is dan het tweede) op de aanwezigheid van organische tussenproducten in de effluenten, die moeilijker afbreekbaar kunnen zijn dan de oorspronkelijke stof.

Geldigheid van testresultaten

63. Als het eliminatiepercentage van het organische medium (punt 53) in de controle-installatie is bepaald, is er informatie over het normale biologische afbraakgedrag van het entmateriaal. De test wordt geldig geacht als de mate van DOC- of CZV-eliminatie in de controle-installatie(s) na twee weken > 80 % is en geen ongebruikelijke waarnemingen zijn gedaan.

▼M4

64. Als een gemakkelijk biologisch afbreekbare (referentie)stof is gebruikt, moet de mate van biologische afbraak (D_t, punt 52) > 90 % zijn.

65. Als de test is uitgevoerd onder omstandigheden waarin nitrificatie mogelijk is, moeten de gemiddelde concentraties aan ammoniumstikstof en nitrietstikstof in de effluenten respectievelijk < 1 mg/l en < 2 mg/l zijn.

66. Als niet aan deze criteria (punten 63-65) wordt voldaan, wordt de test herhaald met een entmateriaal uit een andere bron, wordt een referentiestof getest en worden alle procedures van de proef opnieuw bekeken.

Testverslag

67. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— identificatiegegevens;

— fysische toestand en, indien relevant, fysisch-chemische kenmerken.

Testomstandigheden:

— soort testsysteem; eventuele aanpassingen voor het testen van onoplosbare en vluchtige stoffen;

— soort organisch medium;

— indien bekend, percentage en aard van industrieel afvalwater dat in het rioolwater aanwezig is;

— entmateriaal, aard en plaats(en) van bemonstering, concentratie en eventuele prebehandeling;

— stamoplossing van de teststof: DOC- en TOC-gehalte; bij suspensies: wijze van bereiding; gebruikte testconcentratie; indien afwijkend van het bereik van 10 tot 20 mg/l DOC, motivering; toevoegingsmethode; datum van eerste toevoeging; eventuele wijzigingen;

— gemiddelde slibleeftijd en gemiddelde hydraulische retentietijd; methode van slibafvoer; methoden om bulking, verlies van slib enz. tegen te gaan;

— toegepaste analysetechnieken;

— testtemperatuur;

— kwaliteit van de slibbulking, slibvolume-index (SVI), concentratie gesuspendeerde vaste stoffen in het mengsel (MLSS);

— eventuele afwijkingen van de standaardprocedures en omstandigheden die de resultaten kunnen hebben beïnvloed.

Testresultaten:

— alle gemeten gegevens van DOC, CZV, specifieke analysen, pH, temperatuur, zuurstofgehalte, gesuspendeerde vaste stoffen, stikstofverbindingen, indien relevant;

— alle berekende waarden van D_t (of D_{tc}), D_B en D_{St} in de vorm van tabellen en eliminatiecurven;

— informatie over de aanloop- en plateaufase, de duur van de test, het eliminatiepercentage van de teststof en van het organische medium in de controle-installatie, met statistische informatie en verklaringen betreffende de biologische afbraak en de geldigheid van de test;

— een bespreking van de resultaten.

▼M4

LITERATUUR:

(1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) Duitse Bondsregering (1962). Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergenzien in Wasch- und Reinigungsmitteln. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, Bepaling van de „gemakkelijke” biologische afbreekbaarheid.

(7) Hoofdstuk C.12 van deze bijlage, Biologische afbraak — gewijzigde SCAS-test.

(8) Hoofdstuk C.19 van deze bijlage, Raming van de adsorptiecoëfficiënt (K_{OC}) aan de bodem en aan rioolslib met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium — Activated sludge simulation test.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 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.

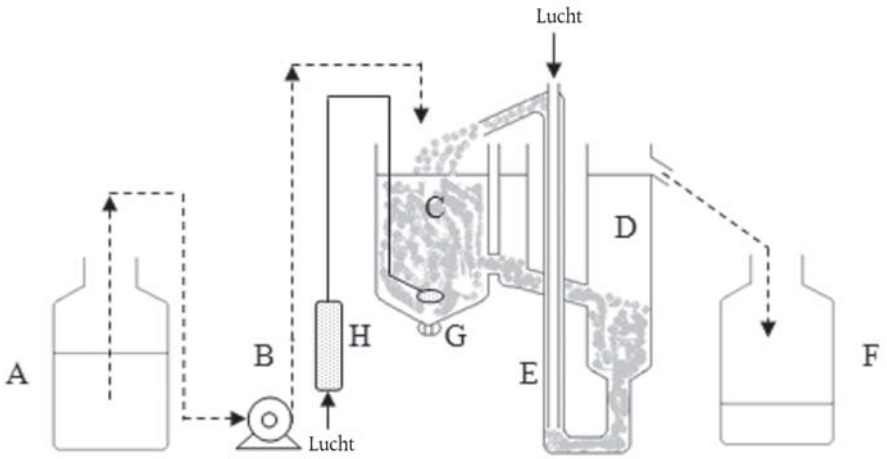
▼**M4**

Aanhangsel 1

Figuur 1

Apparatuur voor de beoordeling van biologische afbreekbaarheid

Installatie van Husmann



A. Opslagvat

B. Doseerpomp

C. Beluchtingsvat (inhoud 3 l)

D. Nabezinkvat

E. Persluchtpomp

F. Verzamelvat

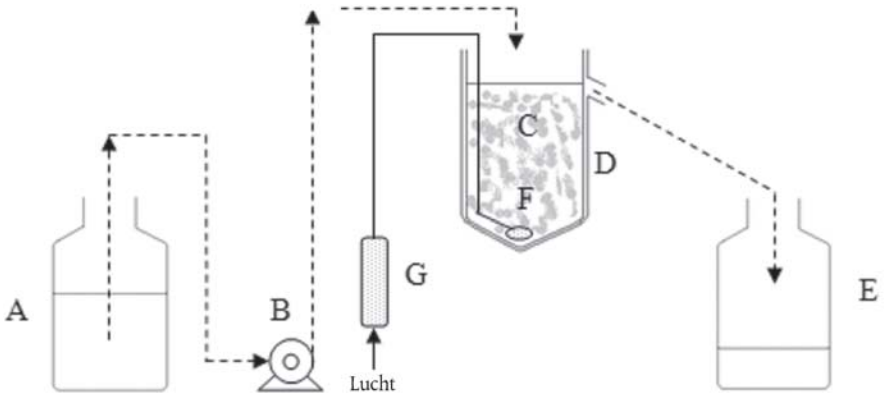
G. Beluchter

H. Luchtstroommeter

Figuur 2

Apparatuur voor de beoordeling van biologische afbreekbaarheid

Poreuze pot



A. Opslagvat

B. Doseerpomp

C. Poreus beluchtingsvat

D. Ondoordringbaar buitenvat

E. Verzamelvat

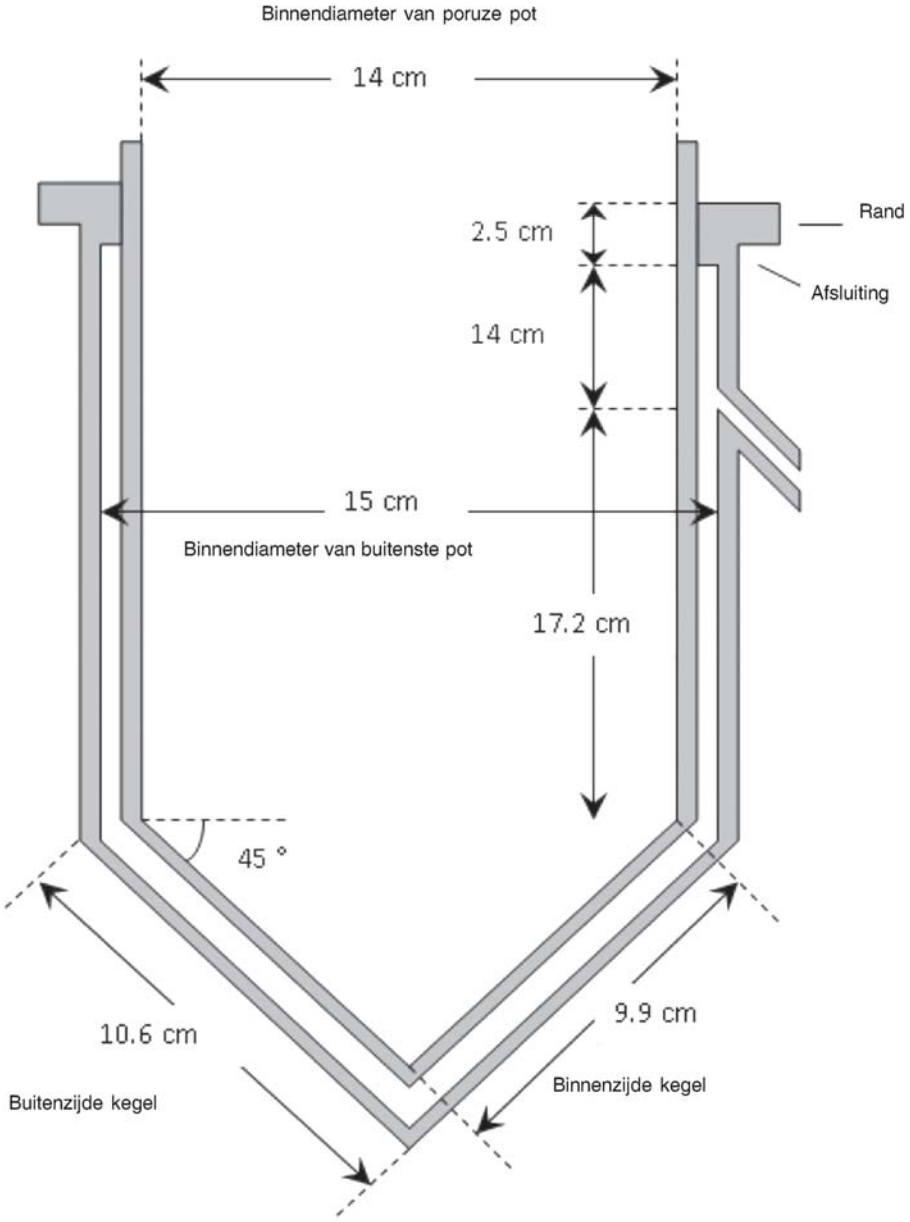
F. Diffusor

G. Luchtstroommeter

▼M4

Figuur 3

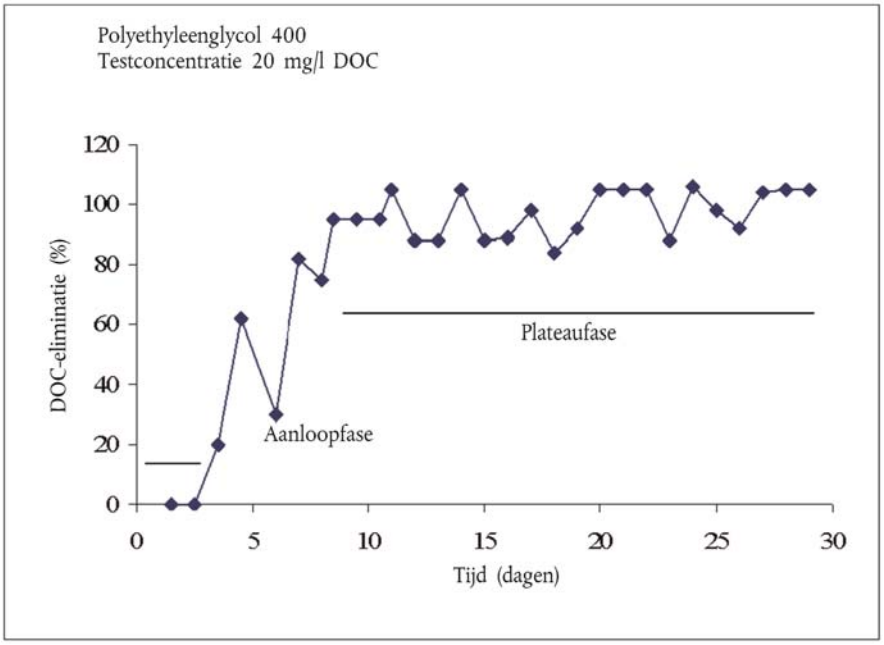
Maten van poreus beluchtingsvat van 3 liter



▼**M4**

Aanhangsel 2

Voorbeeld van een eliminatiecurve



▼M4

Aanhangsel 3

[TER INFORMATIE]

KOPPELING VAN TESTINSTALLATIES

Om een evenwicht tot stand te trachten te brengen tussen de microbiële populaties in het slib van een testinstallatie, die zowel afvalwater als teststof ontvangt, en een controle-installatie, die uitsluitend afvalwater ontvangt, is overgegaan tot een dagelijkse slibuitwisseling (1). Deze procedure werd „koppeling" genoemd en de methode staat bekend als „gekoppelde eenheden". Aanvankelijk werd koppeling toegepast bij actiefslibinstallaties volgens Husmann, maar later ook bij poreuzepotinstallaties (2)(3). Aangezien noch bij installaties van het Husmanntype, noch bij poreuzepotinstallaties significante verschillen tussen de resultaten van niet-gekoppelde en gekoppelde installaties werden gevonden, levert de investering van extra tijd en energie in het koppelen van de eenheden geen voordelen op.

Omdat bij de slibuitwisseling een deel van de teststof wordt overgeheveld en de teststofconcentraties in het test- en controle-effluent nagenoeg gelijk kunnen zijn, kan het lijken alsof er een aanzienlijke verwijdering plaatsvindt. Daarom moeten correctiefactoren worden toegepast, die afhangen van het uitgewisselde deel van het slib en de gemiddelde hydraulische retentietijd. De berekening is uitvoerig beschreven in de literatuur (1).

Bereken de gecorrigeerde DOC- of CZV-eliminatie met de algemene formule:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

waarbij

D_{tc} = gecorrigeerd % DOC- of CZV-eliminatie;

D_t = bepaald % DOC- of CZV-eliminatie;

a = uitgewisseld deel van het volume van de actiefslibinstallaties;

r = gemiddelde hydraulische retentietijd (h).

Als bijvoorbeeld de helft van het volume van de beluchtingstank wordt uitgewisseld (a = 0,5) en de gemiddelde hydraulische retentietijd 6 uur bedraagt, is de correctieformule:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATUUR:

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Aanhangsel 4

EVALUATIE VAN DE INHIBITIE VAN HET ACTIEF SLIB

Inhibitie door teststoffen

1. Het is mogelijk dat een stof (of afvalwater) in de simulatietest niet wordt afgebroken of verwijderd en zelfs een inhibitoir effect heeft op de micro-organismen in het slib. Andere stoffen zijn bij lage concentraties biologisch afbreekbaar, maar bij hogere concentraties inhibitoir (hormese). Inhibitoire effecten kunnen in een eerder stadium zijn vastgesteld of kunnen zijn vastgesteld door de uitvoering van een toxiciteitstest waarvoor hetzelfde of soortgelijk entmateriaal is gebruikt als in de simulatietest (1). Dergelijke methoden zijn de inhibitie van de zuurstofopname (hoofdstuk C.11 van deze bijlage (2) en ISO 8192 (3)) en de inhibitie van de groei van sliborganismen (ISO 15522 (4)).

2. Bij de simulatietest manifesteert inhibitie zich doordat het verschil in opgeloste organische koolstof (DOC) of chemisch zuurstofverbruik (CZV) tussen het effluent van het testvat en dat van het controlevat groter is dan de als teststof toegevoegde DOC. Met andere woorden, het percentage verwijderde DOC (en biochemisch zuurstofverbruik (BZV), chemisch zuurstofverbruik (CZV) en/of NH^{+}_{4}) van het organische medium neemt af door de aanwezigheid van de teststof. Als dit het geval is, moet de test worden herhaald waarbij de concentratie van de teststof wordt verlaagd totdat een niveau wordt bereikt waarbij geen inhibitie optreedt; de concentratie kan mogelijk nog verder worden verlaagd totdat de teststof biologisch wordt afgebroken. Als de teststof (of het afvalwater) echter bij alle geteste concentraties nadelige effecten op het proces heeft, zijn er aanwijzingen dat het moeilijk, zo niet onmogelijk, is om de stof biologisch te behandelen; het kan evenwel zinvol zijn de test te herhalen met actief slib uit een andere bron en/of het slib geleidelijker te laten acclimatiseren.

3. Als de teststof daarentegen bij de eerste uitvoering van de simulatietest biologisch wordt geëlimineerd, moet de concentratie worden verhoogd als er behoefte is aan kennis over de mogelijke inhibitoire werking van de stof.

4. Bij de bepaling van de inhibitiegraad dient men zich te realiseren dat de populatie van het actief slib kan veranderen en dat de micro-organismen na verloop van tijd een tolerantie kunnen ontwikkelen voor een inhibitoire stof.

5. Berekening van de inhibitiegraad:

   Het totale percentage verwijdering van BZV, DOC, CZV enz. (R_o) voor de test- en controle-installatie kan als volgt worden berekend:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   waarbij:

   I = concentratie van BZV, DOC, CZV enz. in het influent van het test- of controlevat (mg/l);

   E = desbetreffende concentratie in het effluent (mg/l).

   Voor de testinstallaties moeten I en E worden gecorrigeerd voor de DOC als gevolg van de teststof, omdat anders de berekening van de procentuele inhibitie onjuist is.

▼**M4**

De inhibitiegraad als gevolg van de aanwezigheid van de teststof kan als volgt worden berekend:

$$\% \text{ inhibitie} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

waarbij:

R_c = procentuele verwijdering in de controlevaten;

R_t = procentuele verwijdering in de testvaten.

LITERATUUR:

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Hoofdstuk C.11 van deze bijlage, Biologische afbraak — Actief slib: remming ademhaling.

(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

Aanhangsel 5

Slecht in water oplosbare teststoffen — Vluchtige stoffen

Slecht in water oplosbare stoffen

Er lijken weinig rapporten te zijn gepubliceerd over de uitvoering van simulatietests voor rioolwaterzuivering op slecht in water oplosbare en onoplosbare stoffen (1)(2)(3).

Er is geen enkele dispergeermethode die bruikbaar is voor alle onoplosbare teststoffen. Van de vier soorten methoden die in ISO 10634 (4) zijn beschreven, lijken er twee geschikt te zijn om te proberen teststoffen te dispergeren met het oog op de uitvoering van een simulatietest, namelijk het gebruik van emulgeermiddelen en/of ultrasone energie. De stabiliteit van de dispersie moet gedurende een periode van ten minste 24 uur worden onderzocht. Dispersies die op geschikte wijze zijn gestabiliseerd en onder constant roeren in een reservoir zijn bewaard (punt 38), worden vervolgens, gescheiden van het huishoudelijke (of kunstmatige) afvalwater, in de beluchtingstank ingebracht.

Onderzoek, als de dispersies stabiel zijn, hoe de teststof in gedispergeerde vorm kan worden bepaald. Het is onwaarschijnlijk dat DOC geschikt is, zodat een specifieke analysemethode voor de teststof moet worden vastgesteld die kan worden toegepast op de effluenten, de vaste deeltjes in de effluenten en het actief slib. Vervolgens worden de lotgevallen van de teststof in de simulatie van het actiefslibproces bepaald in de vloeibare en de vaste fase. Aldus wordt een „massabalans” vastgesteld om te bepalen of de teststof biologisch is afgebroken. Hieruit blijkt echter alleen de primaire biologische afbreekbaarheid. Om te trachten de totale biologische afbreekbaarheid aan te tonen, moet een respirometrische test op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (hoofdstuk C.4 van deze bijlage (5) C, F of D) worden uitgevoerd waarbij als entmateriaal slib wordt gebruikt dat in de simulatietest aan de teststof is blootgesteld.

Vluchtige stoffen

De uitvoering van rioolwaterzuiveringssimulaties op vluchtige stoffen is zowel controversieel als problematisch. Net als over slecht in water oplosbare teststoffen lijken er zeer weinig rapporten over simulatietests met vluchtige stoffen te zijn gepubliceerd. Een gebruikelijk type apparaat met volledige menging wordt aangepast door de beluchtings- en nabezinktanks af te sluiten, de luchtdoorstroming met debietmeters te meten en te regelen en het uitgaande gas door vallen te leiden om vluchtig organisch materiaal te verzamelen. In sommige gevallen wordt een vacuümpomp gebruikt om het uitgaande gas naar een „koude” val of een *purgeand-trap*-systeem met Tenax- en silicagelfilters te zuigen om gaschromatografische analysen te verrichten. De in de val aanwezige teststof kan analytisch worden bepaald.

De test wordt in twee delen uitgevoerd. Eerst functioneren de installaties zonder slib, terwijl het kunstmatige afvalwater en de teststof in de beluchtingstank worden gepompt. Gedurende enkele dagen worden monsters van het influent, het effluent en het uitgaande gas verzameld en geanalyseerd. Op basis van de verzamelde gegevens kan het uit het systeem gestripte percentage (R_{vs}) van de teststof worden berekend.

Vervolgens wordt de normale biologische test (met slib) uitgevoerd onder bedrijfsomstandigheden die identiek zijn aan die van de strippingstudie. Er worden ook DOC- en CZV-metingen verricht om te controleren of de installaties efficiënt functioneren. Incidenteel worden analysen verricht om in het eerste deel van de test de teststof in het influent, het effluent en het uitgaande gas te bepalen; na acclimatisering worden frequenter analysen verricht. Opnieuw kan, op basis van de gegevens in de stationaire toestand, het percentage van de teststof worden berekend dat door alle processen (fysisch en biologisch) uit de vloeibare fase is verwijderd (R_T), alsook het uit het systeem gestripte deel (R_V).

▼**M4**

Berekening:

a) in de niet-biologische test kan het uit het systeem gestripte percentage (R_{VP}) van de teststof als volgt worden berekend:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

waarbij

R_{VP} = verwijdering van de teststof door vervluchtiging (%);

S_{VP} = in de val verzamelde teststof, uitgedrukt als equivalente concentratie in de vloeibare fase (mg/l);

S_{IP} = concentratie van de teststof in het influent (mg/l);

b) in de biologische test kan het uit het systeem gestripte percentage (R_V) van de teststof als volgt worden berekend:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

waarbij

R_V = verwijdering van de teststof door vervluchtiging in de biologische test (%);

S_V = in de biologische test in de val verzamelde teststof, uitgedrukt als equivalente concentratie in het vloeibare influent (mg/l);

S_I = concentratie van de teststof in het influent (mg/l);

c) in de biologische test wordt het percentage (R_T) van de teststof dat door alle processen is verwijderd als volgt berekend:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

waarbij

S_E = concentratie van de teststof in het (vloeibare) effluent (mg/l);

d) vervolgens kan het door biologische afbraak en adsorptie verwijderde percentage (R_{BA}) als volgt worden berekend:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Er moeten afzonderlijke tests worden verricht om te bepalen of de teststof is geadsorbeerd; als dit het geval is, kan een nadere correctie worden toegepast;

e) een vergelijking tussen het gestripte deel van de teststof in de biologische test (R_V) en de niet-biologische test (R_{VP}) geeft een aanwijzing voor het totale effect dat de biologische behandeling heeft op de emissie van de teststof in de atmosfeer.

Voorbeeld: Benzeen

Slibretentietijd = vier dagen

Een kunstmatig afvalwater; retentietijd = 8 uur

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**

Hieruit volgt:

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % en R_{BA} = 85 %.

Benzeen werd geacht niet aan het slib te adsorberen.

LITERATUUR:

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, Bepaling van de „gemakkelijke” biologische afbreekbaarheid.

▼M4

Aanhangsel 6

Effecten van de slibretentietijd (SRT) op de behandelbaarheid van stoffen

INLEIDING

1. De in de hoofdtekst beschreven methode is ontworpen om te bepalen of de teststoffen (waarvan gewoonlijk bekend is dat zij inherent, maar niet gemakkelijk, biologisch afbreekbaar zijn) biologisch afbreekbaar zijn binnen de grenzen die door rioolwaterzuiveringsinstallaties worden gesteld. De resultaten worden uitgedrukt als procentuele verwijdering en procentuele biologische afbraak. De bedrijfsomstandigheden van de actiefslibinstallaties en de keuze van het influent maken een vrij uiteenlopende variatie in de concentratie van de teststof in het effluent mogelijk. Er worden tests verricht bij slechts één nominale concentratie van vaste stoffen van het actief slib of één nominale slibretentietijd (SRT) en de beschreven slibafvoerregelingen kunnen ertoe leiden dat de SRT-waarde tijdens de test aanzienlijk varieert, zowel van dag tot dag als in de loop van een dag.

2. Bij deze variant (1)(2) wordt de SRT gedurende elke periode van 24 uur binnen veel nauwere grenzen geregeld (zoals ook op de grote schaal gebeurt), waardoor de concentratie in de effluenten constanter is. Huishoudelijk afvalwater wordt aanbevolen, omdat dit een consistenter en hoger verwijderingpercentage oplevert. Bovendien worden de effecten van een aantal SRT-waarden onderzocht en in een gedetailleerdere studie kunnen de effecten van een reeks van temperaturen op de effluentconcentratie worden bepaald.

3. Er bestaat nog geen algemene overeenstemming over de vraag welke kinetische modellen van toepassing zijn op de biologische afbraak van stoffen onder rioolwaterzuiveringsomstandigheden. Het model van Monod voor bacteriële groei en substraatgebruik werd gekozen (1)(2) voor toepassing op de verzamelde gegevens, aangezien de methode uitsluitend bedoeld was voor stoffen die in grote hoeveelheden worden geproduceerd, waardoor concentraties van meer dan 1 mg/l in het rioolwater optreden. De geldigheid van het vereenvoudigde model en de gemaakte aannamen is vastgesteld aan de hand van een reeks alcoholethoxylaten met een uiteenlopende mate van primaire biologische afbreekbaarheid (2)(3).

Opmerking: Deze variant van de methode volgt grotendeels de tekst van testmethode C.10-A; hierna worden alleen de details vermeld die afwijken.

PRINCIPE VAN DE TEST

4. De poreuzepotinstallaties voor actief slib, die zijn ontworpen om te zorgen voor (bijna) continue afvoer van gemengde vloeistof waarbij de slibretentietijd (SRT of θ_s) zeer nauwkeurig kan worden geregeld, worden in niet-gekoppelde modus gebruikt bij een reeks SRT's, en facultatief ook bij een reeks temperaturen. De retentietijd bedraagt gewoonlijk twee tot tien dagen en de temperatuur ligt tussen 5 en 20 °C. Het (bij voorkeur huishoudelijke) afvalwater en de oplossing van de teststof worden afzonderlijk in de installaties gebracht in een dosering die de gewenste slibretentietijd (3 tot 6 uur) en concentratie van de teststof in het influent oplevert. De controle-installaties die geen teststof ontvangen, worden ter vergelijking parallel gebruikt.

5. Er kan gebruik worden gemaakt van andere soorten apparatuur, waarbij er echter zorgvuldig op dient te worden gelet dat de SRT goed wordt geregeld. Als bijvoorbeeld installaties met een bezinker worden gebruikt, kan het nodig zijn een correctie toe te passen voor het verlies van vaste stoffen via het effluent van de installatie. Bovendien moeten bijzondere voorzorgsmaatregelen worden genomen om fouten als gevolg van de variatie van de hoeveelheid slib in de bezinker te voorkomen.

▼M4

6. De installaties worden bij een geselecteerde reeks omstandigheden gebruikt; nadat een evenwichtstoestand is bereikt, worden in de effluenten in stationaire toestand gedurende een periode van ongeveer drie weken de gemiddelde concentraties van de teststof, en eventueel de DOC, bepaald. Naast de beoordeling van de procentuele verwijdering van de teststof, en eventueel DOC, wordt het verband tussen de bedrijfsomstandigheden van de installatie en de concentratie in het effluent grafisch weergegeven. Op grond hiervan kunnen tentatieve kinetische constanten worden berekend en kan een voorspelling worden gedaan over de omstandigheden waaronder de teststof kan worden behandeld.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

7. Hoofdstuk C.10-A, punten 12 en 13, is van toepassing.

NIVEAUS WAARBIJ DE TEST WORDT DOORSTAAN

8. Hoofdstuk C.10-A, punten 14 en 15, is van toepassing.

REFERENTIETESTSTOF

9. Hoofdstuk C.10-A, punt 16, is van toepassing.

REPRODUCEERBAARHEID VAN TESTRESULTATEN

10. Hoofdstuk C.10-A, punten 17 en 18, is van toepassing.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

11. Het gewijzigde poreuzepotsysteem (aanhangsel 6.1) is een geschikte installatie. Dit bestaat uit een binnenvat (voering) van poreus polypropyleen met een dikte van 3,2 mm, een poriegrootte van ongeveer 90 μm en stompgelaste naden (hierdoor is de installatie steviger dan die welke beschreven is in punt 21 van dit hoofdstuk C.10-A). De voering wordt bevestigd in een ondoordringbaar buitenvat van polyethyleen, dat uit twee delen bestaat: een ronde bodem waarin gaten voor twee luchtleidingen en een slibafvoerleiding zijn geboord, waarop met schroeven een cilinder met een uitlaat is bevestigd, zodat het poreuzepotvat een bekende inhoud (3 l) heeft. Op een van de luchtleidingen wordt een beluchtingssteen gemonteerd en de andere heeft een open uiteinde en wordt loodrecht op de steen in de pot geplaatst. Dit systeem produceert voldoende werveling om de inhoud van de pot volledig te mengen en te zorgen voor een concentratie opgeloste zuurstof die hoger is dan 2 mg/l.

12. Het vereiste aantal installaties wordt, in waterbaden of kamers met constante temperatuur, op een geregelde temperatuur gehouden binnen het bereik 5 tot 20 °C (± 1 °C). Er zijn pompen nodig om de oplossing van de teststof en het bezonken rioolwater met het vereiste debiet (respectievelijk 0-1,0 ml/min en 0-25 ml/min) in de beluchtingsvaten te leiden en er is een derde pomp nodig om het afvoerslib uit de beluchtingsvaten te verwijderen. Het zeer lage debiet waarmee het slib moet worden afgevoerd, wordt verkregen door gebruik te maken van een op een hoger debiet afgestelde pomp die op een tijdschakelaar is aangesloten, zodat de pomp met tussenpozen functioneert; zo levert bijvoorbeeld 10 s inschakeltijd per minuut bij een pompdebiet van 3 ml/min een afvoerdebiet van 0,5 ml/min op.

Filtreerapparaat of centrifuge

13. Hoofdstuk C.10-A, punt 23, is van toepassing.

Analyseapparatuur

14. Hoofdstuk C.10-A, punt 24, is van toepassing.

Water

▼M4

15. Hoofdstuk C.10-A, punten 25 en 26, is van toepassing.

Organisch medium

16. Hoofdstuk C.10-A, punt 27, is van toepassing.

Kunstmatig afvalwater

17. Hoofdstuk C.10-A, punt 28, is van toepassing.

Huishoudelijk afvalwater

18. Hoofdstuk C.10-A, punt 29, is van toepassing.

Actief slib

19. Hoofdstuk C.10-A, punt 30, is van toepassing.

Stamoplossingen van de teststof

20. Hoofdstuk C.10-A, punten 31 en 32, is van toepassing.

PROCEDURE

Bereiding van het entmateriaal

21. Alleen punt 34 van hoofdstuk C.10-A is van toepassing — gebruik actief slib (ongeveer 2,5 g/l).

Aantal testinstallaties

22. Voor een eenvoudige test, waarbij alleen de procentuele verwijdering wordt gemeten, is slechts één SRT vereist; om de voor de berekening van tentatieve kinetische constanten benodigde gegevens te verkrijgen, zijn daarentegen 4 of 5 SRT's vereist. Gewoonlijk worden waarden tussen twee en tien dagen gekozen. In de praktijk is het handig om bij één temperatuur gelijktijdig een test uit te voeren met 4 of 5 SRT's; bij uitgebreide studies worden dezelfde SRT-waarden, of misschien een andere reeks waarden, gebruikt bij andere temperaturen binnen het bereik 5-20 °C. Voor primaire biologische afbreekbaarheid (het belangrijkste gebruik) is normaliter slechts één installatie per reeks omstandigheden vereist. Voor totale biologische afbreekbaarheid is echter, voor elke reeks omstandigheden, een controle-installatie nodig, die wel afvalwater maar geen teststof ontvangt. Als vermoed wordt dat de teststof in het gebruikte afvalwater aanwezig is, moeten bij de beoordeling van primaire biologische afbreekbaarheid controle-installaties worden gebruikt en moet op de berekeningen een correctiefactor worden toegepast.

Dosering van het organische medium en de teststof

23. Hoofdstuk C.10-A, punten 36 tot en met 39, is van toepassing, met dien verstande dat de teststofoplossing apart wordt ingebracht en dat verschillende slibafvoerdebieten worden toegepast. Bovendien moeten de debieten van de influenten, effluenten en de slibafvoer frequent, bijvoorbeeld twee keer per dag, worden gecontroleerd en zo nodig worden aangepast. Als het gebruik van huishoudelijk afvalwater moeilijkheden voor de analysemethoden oplevert, wordt de test uitgevoerd met kunstmatig afvalwater, waarbij echter moet worden gewaarborgd dat de verschillende media vergelijkbare kinetische gegevens opleveren.

Behandeling van actiefslibinstallaties

24. Hoofdstuk C.10-A, punten 40 tot en met 43, is van toepassing, maar de SRT moet uitsluitend worden geregeld door „constante" slibafvoer.

Bemonstering en analyse

25. Hoofdstuk C.10-A, punten 44 tot en met 50, is van toepassing, maar de concentratie van de teststof moet worden bepaald en de DOC wordt facultatief bepaald; er mag geen gebruik worden gemaakt van het CZV.

▼M4

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

26. Hoofdstuk C.10-A, punten 52 tot en met 54, is van toepassing.

Uitdrukking van de testresultaten

27. Hoofdstuk C.10-A, punten 56 tot en met 62, is van toepassing.

Berekening van kinetische constanten

28. Het is realistischer om de gemiddelde concentratie van de teststof in het effluent in stationaire toestand te vermelden en te beschrijven hoe deze varieert afhankelijk van de bedrijfsomstandigheden van de installatie, dan om de procentuele primaire biologische afbreekbaarheid te vermelden. Dit kan worden gedaan met behulp van vergelijking (6) in aanhangsel 6.2, die waarden kan geven voor K_S, μ_m en θ_{SC}, de kritische slibretentietijd.

(Bij wijze van alternatief kunnen benaderingen voor K_S en μ_m worden verkregen met een eenvoudig computerprogramma waarmee de met vergelijking [2] (aanhangsel 6.2) berekende theoretische curve wordt aangepast aan de experimenteel verkregen waarden. Hoewel een bepaalde oplossing niet uniek zal zijn, kan een redelijke benadering van K_S en μ_m worden verkregen.)

Variabiliteit van de resultaten

29. De ervaring leert dat variabele waarden worden verkregen voor de kinetische parameters van individuele stoffen. Verondersteld wordt dat de omstandigheden waaronder het slib is gegroeid en de omstandigheden waaronder de test is verricht (zoals in punt 5 en in andere tests) grote invloed hebben op de uitkomsten. Een aspect van deze variabiliteit is besproken door Grady e.a. (4), die hebben geopperd dat de begrippen „extant" en „intrinsic" moeten worden gebruikt voor de twee extreme omstandigheden die de grenzen vormen van de fysiologische toestand die een kweek tijdens een kinetisch experiment kan bereiken. Als de toestand tijdens de test niet mag veranderen, geven de waarden van de kinetische parameter de omstandigheden weer van het milieu waaruit de micro-organismen afkomstig zijn; deze waarden worden „extant" of momenteel bestaand genoemd. Als de omstandigheden in de test zodanig zijn dat het eiwitsynthesesysteem zich optimaal ontwikkelt en een zo groot mogelijke groeisnelheid wordt gehaald, worden de verkregen kinetische parameters „intrinsiek" genoemd en hangen zij uitsluitend af van de aard van het substraat en het type bacteriën in de kweek. Als richtsnoer worden de extante waarden verkregen wanneer een lage verhouding tussen de concentratie substraat en werkzame micro-organismen (S_o/X_o) wordt aangehouden, bv. 0,025, en de intrinsieke waarden wanneer deze verhouding hoog is, bv. ten minste 20. In beide gevallen moet S_o ten minste gelijk zijn aan de overeenkomstige waarde van K_S, de halfverzadigingsconstante.

30. De variabiliteit en andere facetten van de biologischeafbraakkinetiek zijn besproken tijdens een recente SETAC-workshop (5). Dergelijke, gerapporteerde en geplande, studies moeten een duidelijker beeld opleveren van de kinetische processen in rioolwaterzuiveringsinstallaties, zodat bestaande gegevens beter kunnen worden geïnterpreteerd en de opzet van toekomstige testmethoden kan worden geoptimaliseerd.

LITERATUUR:

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

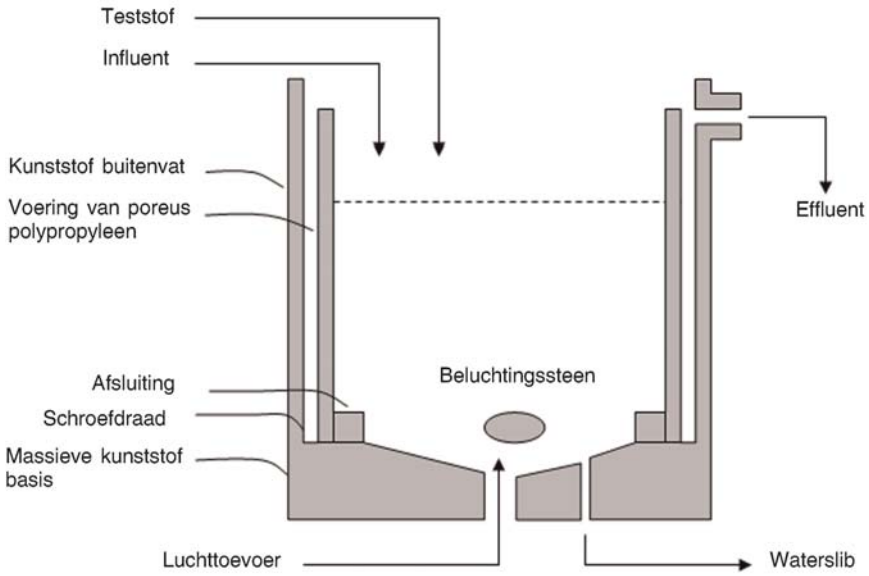
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC — Europe, Brussels.

▼M4

Aanhangsel 6.1

Poreuze pot met SRT-regeling



▼M4

Aanhangsel 6.2

Berekening van kinetische constanten

1. Aannemende dat het kinetische model van Monod van toepassing is, en uitgaande van een massabalans van actieve vaste stoffen en substraat in het hele actiefslibsysteem (1), gelden de volgende expressies voor de stationaire toestand:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

of

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

waarbij

S_1 = concentratie van het substraat in het effluent (mg/l);

K_S = halfverzadigingsconstante, de concentratie waarbij geldt: $\mu = \mu_m/2$ (mg/l);

μ = specifieke groeisnelheid (d^{-1});

μ_m = maximumwaarde van μ (d^{-1});

K_d = specifieke afnamesnelheid van vaste stoffen (d^{-1});

θ_S = gemiddelde slibretentietijd, SRT (d).

Bestudering van deze vergelijking leidt tot de volgende conclusies:

i) de concentratie in het effluent is onafhankelijk van de concentratie in het influent (S_0); dit betekent dat de procentuele biologische afbraak varieert naargelang van de concentratie in het influent (S_0);

ii) de enige regelparameter van de installatie die van invloed is op S_1, is de slibretentietijd (θ_S);

iii) voor een gegeven concentratie in het influent S_0 zal er een kritische slibretentietijd zijn, zodanig dat:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

waarbij

θ_{SC} = kritische slibretentietijd; bij een kortere SRT worden de werkzame micro-organismen uit de installatie gespoeld;

iv) aangezien de andere parameters in vergelijking [2] verband houden met groeikinetiek, zal de temperatuur waarschijnlijk het substraatniveau in het effluent en de kritische slibleeftijd beïnvloeden, d.w.z. dat de slibretentietijd die nodig is om een bepaalde zuiveringsgraad te verkrijgen toeneemt naarmate de temperatuur daalt.

2. Uitgaande van een massabalans van vaste stoffen in het poreuzepotsysteem, en aannemende dat de concentratie van vaste stoffen in het effluent van de installatie (X_2) laag is in vergelijking met de concentratie in het beluchtingsvat (X_1), geldt voor de slibretentietijd:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

en

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

waarbij

V = volume van het beluchtingsvat (l);

X_1 = concentratie van vaste stoffen in het beluchtingsvat (mg/l);

X_2 = concentratie van vaste stoffen in het effluent (mg/l);

Q_0 = influentdebiet (l/d);

Q_1 = slibafvoerdebiet (l/d).

Dit betekent dat de slibretentietijd op elke vooraf gekozen waarde kan worden geregeld door aanpassing van het slibafvoerdebiet (Q_1).

Conclusies:

3. Hoofddoel van de test is de effluentconcentratie, en dus de niveaus van de teststof in de ontvangende wateren, te voorspellen.

4. In sommige gevallen kan de kritische slibretentietijd (θ_{SC}) gemakkelijk worden bepaald door S_1 uit te zetten tegen θ_S, bijvoorbeeld bij curve 3 in figuur 1. Wanneer dit niet mogelijk is, kan θ_{SC}, met benaderingen voor μ_m en K_S, worden berekend door S_1 uit te zetten tegen $S_1 \bullet \theta_S$.

Een herschikking van vergelijking [1] geeft:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Als K_d klein is, geldt: $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ en wordt [5]:

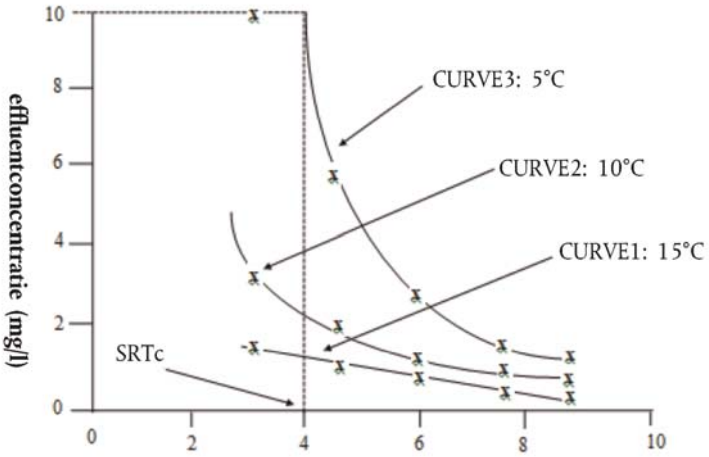
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Dit levert een rechte lijn op (zie figuur 2) waarvan de richtingscoëfficiënt $1/\mu_m$ is en het snijpunt met de y-as K_S/μ_m; bovendien geldt: $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

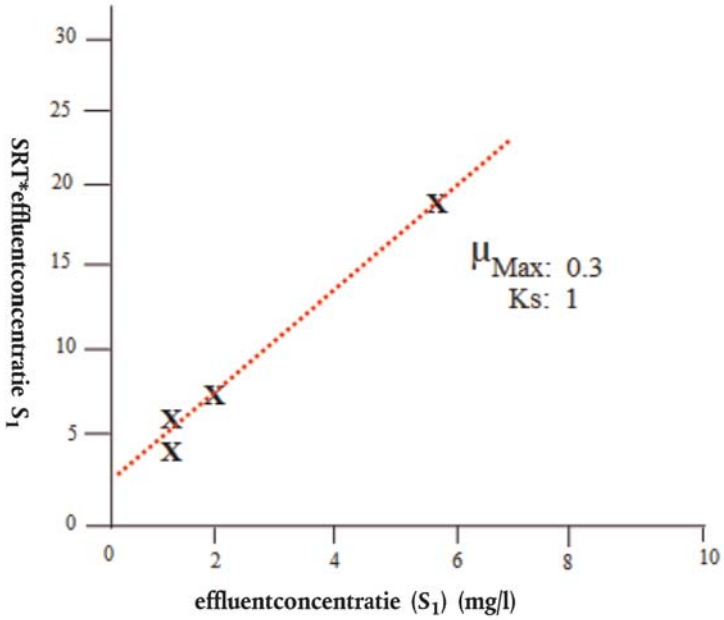
Figuur 1

Drie temperaturen; vijf SRT's



Figuur 2

Regressielijn van SRT · S_1 versus S_1 bij T = 5 °C



Legenda:

effluentconcentratie

curve.

▼M4

Aanhangsel 7

TEST BIJ LAAG CONCENTRATIEBEREIK (µg/l)

1. In het aquatisch milieu, en zelfs in afvalwater, zijn veel stoffen normaliter in zeer lage concentraties (µg/l) aanwezig. Bij die concentraties fungeren zij waarschijnlijk niet als primaire substraten die in groei resulteren, maar is het waarschijnlijker dat zij afbreken tot geen groei veroorzakende secundaire substraten, samen met uiteenlopende koolstoffen die van nature voorkomen. Daarom is het model van aanhangsel 6 niet geschikt voor de afbreekbaarheid van dergelijke stoffen. Er zijn vele modellen die zouden kunnen worden toegepast en onder de omstandigheden die in rioolwaterzuiveringssystemen heersen, kunnen verscheidene modellen tegelijkertijd werkzaam zijn. Om dit probleem te kunnen oplossen is veel meer onderzoek noodzakelijk.

2. Tot die tijd kan, uitsluitend voor primaire biologische afbreekbaarheid, de procedure in de hoofdtekst (hoofdstuk C.10-A) worden gevolgd, waarbij gebruik moet worden gemaakt van passende lage concentraties (< 100 µg/l) en een gevalideerde analyseprocedure. De procentuele biologische afbraak kan worden berekend (zie punt 54 van de testmethode), mits rekening wordt gehouden met niet-biologische processen (adsorptie, vluchtigheid enz.). Een voorbeeld is de studie van Nyholm e.a. (1)(2), waarbij in een vul-en-aftap-systeem een cyclus van 4 uur is toegepast. Zij rapporteerden pseudo-eersteordeconstanten voor vijf stoffen die in een concentratie van 5 tot 100 µg/l aan kunstmatig afvalwater werden toegevoegd. (Voor totale biologische afbreekbaarheid kunnen ^{14}C-gemerkte teststoffen worden gebruikt. Een beschrijving daarvan valt buiten het bestek van deze testmethode, omdat er vooralsnog geen overeengekomen procedures bestaan, al bevat een voorgestelde methode voor ISO 14592 (3) richtsnoeren voor het gebruik van ^{14}C-gemerkte stoffen.)

SCAS-test

3. Later is een eenvoudigere tweefasentest voorgesteld (4)(5)(6), waarbij de semicontinue actiefslibmethode (SCAS) wordt gevolgd door kortstondige kinetische tests op monsters uit de SCAS-installaties. Bij het SCAS-systeem worden (anders dan bij de oorspronkelijke testmethode C.12) bekende slibafvoerdebieten toegepast en wordt gemodificeerd kunstmatig OESO-afvalwater of huishoudelijk afvalwater gebruikt. Het kunstmatige afvalwater werd gemodificeerd (om de pH-waarde en de slechte bezinkingseigenschappen te wijzigen) door toevoeging van fosfaat als buffer, gistextract, ijzer(III)chloride en zouten van spoorelementen, en het CZV werd tot ongeveer 750 mg/l verhoogd door verhoging van de concentratie pepton en vleesextract. De installaties werkten met een cyclus van 24 uur: 23 uur beluchten, afvoer van slib, bezinking, verwijdering van het supernatans (effluent) gevolgd door toevoeging van kunstmatig afvalwater plus teststof in een concentratie tot 100 µg/l (d.w.z. ongeveer dezelfde concentratie als in de kortetermijntest). Eén keer per week werd 10 % van het totale slib vervangen door vers slib, om een evenwichtige microbiële populatie te behouden.

4. De concentraties van de teststof worden van tevoren en aan het eind van de beluchting gemeten en de test wordt voortgezet totdat een constante verwijdering van de teststof is bereikt; dit kan variëren van één week tot verscheidene maanden.

Kortetermijntest

5. Er wordt een korte test (van bv. 8 uur) verricht om de (pseudo-)eersteordeconstante van de kinetische snelheid te bepalen voor de afname van de teststof in actief slib met bekende, maar uiteenlopende oorsprongen en achtergronden. In het bijzonder worden tijdens een acclimatisatieproef, aan het eind van een beluchtingsperiode wanneer de concentratie organisch substraat laag is, slibmonsters uit de SCAS-reactoren genomen (punten 3 en 4). Ter vergelijking kan ook slib worden afgenomen uit een parallelle SCAS-installatie waarin de

▼M4

teststof niet is toegevoegd. Mengsels van het slib en de daaraan in twee of meer concentraties tussen 1 en 50 µg/l toegevoegde teststof worden belucht, zonder toevoeging van kunstmatig afvalwater of ander organisch substraat. Gedurende maximaal 24 uur wordt met regelmatige intervallen, afhankelijk van de afbreekbaarheid van de stof, de in de oplossing achterblijvende teststof bepaald (bijvoorbeeld ieder uur). De monsters worden gecentrifugeerd en vervolgens op geschikte wijze geanalyseerd.

Berekeningen

6. De gegevens over de SCAS-installaties worden gebruikt voor de berekening van de procentuele verwijdering van de teststof (punt 54). Bovendien kan met de volgende formule een gemiddelde snelheidsconstante K_1 worden berekend (genormaliseerd voor de concentratie gesuspendeerde vaste stoffen):

$$K_1 = 1/t \cdot \ln\frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS \ (1/g\ h)$$

waarbij

t = beluchtingstijd (23 uur);

C_e = concentratie aan eind van beluchtingsperiode (µg/l);

C_i = concentratie bij begin beluchting (µg/l);

SS = concentratie van vaste stoffen in het actief slib (g/l).

7. Bij de kortetermijntest wordt de resterende procentuele concentratie op logaritmische schaal uitgezet tegen de tijd en komt de richtingscoëfficiënt van het begindeel (10-50 % afbraak) van de curve overeen met K_1, de (pseudo-)eersteordeconstante. De constante wordt voor de concentratie vaste stoffen van het slib genormaliseerd door de richtingscoëfficiënt te delen door die concentratie. Het verslag over de resultaten moet ook gegevens bevatten over de initiële concentraties van de teststof en de gesuspendeerde vaste stoffen, de slibretentietijd, de slibbelasting en de bron, alsook over de eventuele voorafgaande blootstelling aan de teststof.

Variabiliteit van de resultaten

8. De variabiliteit en andere facetten van de biologischeafbraakkinetiek zijn besproken tijdens een recente SETAC-workshop (7). Dergelijke, gerapporteerde en geplande, studies moeten een duidelijker beeld opleveren van de kinetische processen in rioolwaterzuiveringsinstallaties, zodat bestaande gegevens beter kunnen worden geïnterpreteerd en de opzet van toekomstige testmethoden kan worden geoptimaliseerd.

LITERATUUR:

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilms

INLEIDING

1. Simulatietests worden normaliter gebruikt voor stoffen die een screeningtest op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (hoofdstukken C.4 A tot en met F van deze bijlage (9)) niet doorstonden, maar wel een test op inherente biologische afbreekbaarheid. In uitzonderlijke gevallen worden simulatietests ook gebruikt voor stoffen waarover meer informatie nodig is, in het bijzonder stoffen die in grote hoeveelheden worden geproduceerd; doorgaans wordt de actiefslibtest (C.10-A) uitgevoerd. In bepaalde omstandigheden is echter specifieke informatie vereist over het gedrag van een stof bij rioolwaterzuiveringsmethoden waarbij gebruik wordt gemaakt van biofilms, namelijk percolatie- of druppelfilters, roterende biologische contactoren en wervelbedden. Er zijn verschillende installaties ontwikkeld om in deze behoefte te voorzien.

2. Gerike *et al.* (1) hebben gebruikgemaakt van grote druppelfilters op schaal, met gekoppelde eenheden. Die filters vergden veel ruimte en relatief grote hoeveelheden afvalwater of kunstmatig afvalwater. Truesdale *et al.* (2) beschreven kleinere filters (6 ft, diameter 6 inch), waarover surfactantvrij natuurlijk afvalwater werd geleid, maar ook daarvoor waren nog vrij grote volumes nodig. Het duurde maar liefst 14 weken voordat een „rijpe" biofilm was ontstaan en nadat de testsurfactant voor het eerst was toegevoegd, duurde het nog eens vier-acht weken voordat de acclimatisering was voltooid.

3. Baumann *et al.* (3) ontwikkelden een veel kleiner filter met strips van polyester („fleece") die vooraf in actief slib waren ondergedompeld als inert medium dat de biofilm ondersteunde. De teststof werd als enige koolstofbron gebruikt en de biologische afbraak werd beoordeeld door meting van de opgeloste organische koolstof (DOC) in het influent en het effluent en op grond van de hoeveelheid CO_2 in het uitgaande gas.

4. Een tamelijk verschillende aanpak volgden Gloyna *et al.* (4), die de roterende buisreactor uitvonden. Op het bekende binnenoppervlak van de roterende buis liet men een biofilm ontstaan door het influent van de bovenzijde in de buis te leiden, die een kleine hoek met het horizontale vlak maakte. De reactor is gebruikt om de biologische afbreekbaarheid van oppervlakteactieve stoffen te bestuderen (5) en om de optimale dikte van de biofilm en de diffusie door de film te onderzoeken (6). De auteurs hebben de reactor verder ontwikkeld en onder meer geschikt gemaakt voor de bepaling van CO_2 in het uitgaande gas.

5. De roterende buisreactor is door het Standing Committee of Analysts (Verenigd Koninkrijk) als standaardmethode overgenomen voor de beoordeling van zowel de biologische afbreekbaarheid van stoffen (7) als de behandelbaarheid en toxiciteit van afvalwater (8). De voordelen van de hier beschreven methode zijn gelegen in de eenvoud, compactheid, reproduceerbaarheid en het relatief kleine volume organisch medium dat nodig is.

PRINCIPE VAN DE TEST

6. Op het binnenoppervlak van een traag roterende hellende buis wordt, vermengd of afzonderlijk, kunstmatig of huishoudelijk afvalwater en teststof aangebracht. Op het binnenoppervlak groeit een laag micro-organismen die lijkt op de laag die aanwezig is op biofiltermedia. De bedrijfsomstandigheden van de reactor worden zodanig gekozen dat voldoende eliminatie van organisch materiaal en, zo nodig, oxidatie van ammonium plaatsvinden.

▼M4

7. Het effluent uit de buis wordt verzameld en bezonken en/of gefiltreerd alvorens te worden geanalyseerd op opgeloste organische koolstof (DOC) en/of de teststof met een specifieke methode. De controle-installaties die geen teststof ontvangen, worden ter vergelijking parallel gebruikt onder dezelfde omstandigheden. Het verschil tussen de DOC-concentraties in het effluent van de testinstallatie en de controle-installatie wordt toegeschreven aan de teststof en de organische metabolieten ervan. Dit verschil wordt met de concentratie van de toegevoegde teststof (als DOC) vergeleken om de eliminatie van de teststof te berekenen.

8. De biologische afbraak kan normaliter van de biologische adsorptie worden onderscheiden door zorgvuldige bestudering van de eliminatie-tijdcurve. Bevestiging kan gewoonlijk worden verkregen door een test op gemakkelijke afbreekbaarheid (zuurstofopname of kooldioxideproductie) te verrichten op geacclimatiseerd entmateriaal dat aan het eind van de test wordt genomen uit de reactoren waarin de teststof is ingebracht.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

9. De zuiverheid, oplosbaarheid in water, vluchtigheid en adsorptie-eigenschappen van de teststof moeten bekend zijn om de resultaten goed te kunnen interpreteren.

10. Normaliter kunnen vluchtige en slecht oplosbare stoffen niet worden getest, tenzij er speciale voorzorgsmaatregelen worden genomen (zie aanhangsel 5 van hoofdstuk C.10-A). Ook de chemische structuur, of ten minste de molecuulformule, moet bekend zijn om theoretische waarden te kunnen berekenen en/of de gemeten waarden van parameters te kunnen controleren (bv. theoretisch zuurstofverbruik (ThOD) en DOC).

11. Informatie over de giftigheid van de teststof voor micro-organismen (zie aanhangsel 4 van hoofdstuk C.10-A) kan nuttig zijn voor het kiezen van de juiste testconcentraties en kan essentieel zijn voor een juiste interpretatie van lage waarden voor de biologische afbraak.

NIVEAUS WAARBIJ DE TEST WORDT DOORSTAAN

12. Aanvankelijk moest de primaire biologische afbraak van oppervlakteactieve stoffen ten minste 80 % bedragen om de stof in de handel te mogen brengen. Als de waarde van 80 % niet wordt gehaald, kan deze (bevestigende) simulatietest worden uitgevoerd en mag de oppervlakteactieve stof alleen worden verhandeld als meer dan 90 % van de specifieke stof wordt verwijderd. Voor stoffen in het algemeen is er geen sprake van een niveau waarbij de test al dan wordt doorstaan en kan het verwijderingspercentage worden gebruikt in berekeningen voor de schatting van de waarschijnlijke milieuconcentratie die voor de beoordeling van de gevaren van stoffen wordt gebruikt. In een aantal studies van zuivere stoffen die een significante mate van biologische afbreekbaarheid vertoonden, bedroeg het gevonden DOC-verwijderingspercentage voor meer dan drie kwart van de stoffen > 90 % en voor meer dan 90 % van de stoffen > 80 %.

REFERENTIESTOFFEN

13. Om te waarborgen dat de experimentele procedure correct wordt uitgevoerd, kan het soms nuttig zijn referentiestoffen te testen waarvan het gedrag bekend is. Daarbij kan het gaan om stoffen als adipinezuur, 2-fenylfenol, 1-naftol, difenylzuur en 1-naftoëzuur.

REPRODUCEERBAARHEID VAN TESTRESULTATEN

14. Door een laboratorium in het Verenigd Koninkrijk is de relatieve standaardafwijking binnen tests vastgesteld op 3,5 % en die tussen tests op 5 % (7).

▼M4

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

Roterende buisreactoren

15. De apparatuur bestaat uit een metalen draagconstructie met een rij buizen van acryl met een lengte van 30,5 cm en een binnendiameter van 5 cm, rustend op met rubber beklede wieltjes (zie de figuren 1 en 2 in aanhangsel 8). Elke buis heeft aan de buitenzijde een ongeveer 0,5 cm diepe inkeping om haar op de wieltjes te houden en een met grove staalwol geruwd binnenoppervlak waarin aan de bovenzijde (inlaat) een 0,5 cm diepe flens is aangebracht om de ingebrachte vloeistof tegen te houden. De buizen maken een hoek van ongeveer 1 graad met het horizontale vlak teneinde de vereiste contacttijd te verkrijgen bij aanbrenging van het testmedium in een schone buis. De met rubber beklede wieltjes worden aangedreven door een langzaam draaiende motor met variabel toerental. De temperatuur van de buizen wordt geregeld door de apparatuur in een kamer met constante temperatuur te plaatsen.

16. Het uitgaande CO_2-gas kan, om later te worden gemeten, in een alkalische oplossing worden opgevangen door elke buisreactor in een iets grotere, afgesloten buis te plaatsen en te zorgen voor gasdichte verbindingen (6).

17. Voor elke buis wordt in een opslagvat (A) van 20 l voldoende organisch medium, waaraan zo nodig teststof is toegevoegd, voor 24 uur aangebracht (zie figuur 2). Zo nodig kan de teststofoplossing afzonderlijk worden ingebracht. Nabij de bodem van elk opslagvat bevindt zich een uitlaat die met geschikte leidingen (bv. van siliconenrubber) via een peristaltische pomp (B) verbonden is met een toevoerbuis van glas of acryl, die 2-4 cm in de bovenzijde (inlaat) van de hellende buis (C) steekt. Het effluent druppelt uit de onderzijde van de hellende buis en wordt opgevangen in een ander opslagvat (D). Het effluent wordt vóór analyse bezonken of gefiltreerd.

Filtreerapparaat of centrifuge

18. Apparaat voor het filtreren van monsters over membraanfilters met een geschikte porositeit (nominale openingsdiameter 0,45 μm) die organische stoffen adsorberen of zo min mogelijk organische koolstof vrij laten komen. Als filters worden gebruikt die organische koolstof vrij laten komen, worden zij zorgvuldig met warm water gewassen om uitloogbare organische koolstof te verwijderen. Bij wijze van alternatief kan een centrifuge worden gebruikt die een versnelling van 40 000 m/s^2 kan produceren.

19. Analyseapparatuur voor het bepalen van:

— DOC/totale organische koolstof (TOC), of chemisch zuurstofverbruik (CZV);

— de specifieke stof, zo nodig (HPLC, GC enz.);

— pH, temperatuur, zuurgraad en alkaliteit;

— ammonium, nitriet en nitraat, als de tests worden uitgevoerd onder omstandigheden waarin nitrificatie mogelijk is.

Water

20. Kraanwater met een DOC-gehalte van minder dan 3 mg/l.

21. Gedestilleerd of gedeïoniseerd water met een DOC-gehalte van minder dan 2 mg/l.

▼M4

Organisch medium

22. Als organisch medium mag kunstmatig afvalwater, huishoudelijk afvalwater of een mengsel van beide soorten afvalwater worden gebruikt. Gebleken is dat het gebruik van huishoudelijk afvalwater alleen veelal een hoger percentage DOC-verwijdering oplevert (in actiefslibinstallaties) en dat daarin zelfs bepaalde stoffen biologisch afgebroken kunnen worden die bij gebruik van kunstmatig OESO-afvalwater niet afbreken. Daarom wordt het gebruik van huishoudelijk afvalwater aanbevolen. Meet de DOC- (of CZV-)concentratie in elke nieuwe partij van het organische medium. De zuurgraad of alkaliteit van het organische medium moet bekend zijn. Als het medium een lage zuurgraad of alkaliteit heeft, kan het nodig zijn een geschikte bufferoplossing (natriumwaterstofcarbonaat of kaliumwaterstoffosfaat) toe te voegen om tijdens de test in de reactor een pH-waarde van ongeveer 7,5 ± 0,5 te behouden. In elk afzonderlijk geval moet worden besloten hoeveel en op welk moment een bufferoplossing wordt toegevoegd.

Kunstmatig afvalwater

23. Per liter leidingwater worden opgelost: pepton, 160 mg; vleesextract, 110 mg; ureum, 30 mg; watervrij dikaliumwaterstoffosfaat (K_2HPO_4), 28 mg; natriumchloride (NaCl), 7 mg; calciumchloridedihydraat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; magnesiumsulfaatheptahydraat ($MgSO_4.7H_2O$), 2 mg. Dit kunstmatig OESO-afvalwater is een voorbeeld en geeft een gemiddelde DOC-concentratie in het influent van ongeveer 100 mg/l. Bij wijze van alternatief mogen ook andere samenstellingen worden gebruikt die ongeveer dezelfde DOC-concentraties opleveren en het feitelijke afvalwater beter benaderen. Dit kunstmatige afvalwater mag in geconcentreerde vorm van gedistilleerd water worden bereid en ten hoogste één week worden bewaard bij ongeveer 1 °C. Zo nodig wordt het met kraanwater verdund. (Dit medium is onbevredigend, bijvoorbeeld omdat het stikstofgehalte zeer hoog is en het koolstofgehalte relatief laag, maar er is nog geen beter voorstel gedaan, afgezien van de toevoeging van meer fosfaat als buffer en extra pepton).

Huishoudelijk afvalwater

24. Gebruik vers bezonken rioolwater dat dagelijks wordt verzameld uit een rioolwaterzuiveringsinstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Het wordt verzameld uit het overloopkanaal van de primaire bezinkingstank of uit de inlaat van de actiefslibinstallatie en moet grotendeels vrij zijn van grove deeltjes. Het rioolwater kan worden gebruikt na enige dagen bij ongeveer 4 °C te zijn bewaard, mits aangetoond wordt dat tijdens de opslag de DOC- (of CZV-)waarde niet significant (met minder dan 20 %) is gedaald. Om verstoringen van het systeem te voorkomen, moet de DOC (of het CZV) van elke nieuwe partij voor gebruik op een passende constante waarde worden gebracht, bijvoorbeeld door verdunning met kraanwater.

Smeermiddel

25. De rollen van de peristaltische pomp kunnen worden gesmeerd met glycerol of olijfolie: beide smeermiddelen zijn geschikt voor gebruik bij leidingen van siliconenrubber.

Stamoplossingen van de teststof

26. Bereid voor stoffen die voldoende oplosbaar zijn, stamoplossingen in een geschikte concentratie (bv. 1 tot 5 g/l) in gedeïoniseerd water of in de minerale fractie van het kunstmatig afvalwater. Zie aanhangsel 5 van hoofdstuk C.10-A voor onoplosbare stoffen. Zonder modificatie van de buisreactoren (punt 16) is deze methode niet geschikt voor vluchtige stoffen. Bepaal de DOC en TOC van de stamoplossing en herhaal de metingen voor elke nieuwe partij. Controleer, als het verschil tussen de DOC en de TOC groter is dan 20 %, de oplosbaarheid in water van de teststof. Vergelijk de DOC of de met een

▼M4

specifieke analyse van de stamoplossing bepaalde concentratie van de teststof met de nominale waarde om vast te stellen of de recovery toereikend is (normaliter kan een waarde van > 90 % worden verwacht). Bepaal, in het bijzonder voor dispersies, of al dan niet gebruik kan worden gemaakt van de DOC als analytische parameter, dan wel of alleen een specifieke analysetechniek voor de teststof kan worden gebruikt. Monsters van dispersies moeten worden gecentrifugeerd. Voor elke nieuwe partij wordt de DOC of het CZV gemeten, dan wel de teststof met een specifieke analyse.

27. Bepaal de pH van de stamoplossing. Extreme waarden wijzen erop dat de toevoeging van de stof van invloed kan zijn op de pH van het actief slib in het testsysteem. Neutraliseer in dat geval de stamoplossing met kleine hoeveelheden van een anorganisch zuur of een anorganische base om een pH van 7 ± 0,5 te verkrijgen, maar let erop dat de teststof niet neerslaat.

PROCEDURE

Bereiding van het organische medium voor dosering

28. Zorg ervoor dat alle houders voor het influent en het effluent en de slangen vanuit de influentvaten en naar de effluentvaten grondig zijn gereinigd om microbiële groei voorafgaand en gedurende de test te voorkomen.

29. Bereid het kunstmatige afvalwater (punt 23) elke dag vers uit de vaste stoffen of uit de geconcentreerde stamoplossing door voldoende verdunning met kraanwater. Meet in een cilinder de vereiste hoeveelheid af en voeg deze toe aan een schoon influentvat. Voeg zo nodig vóór verdunning tevens de vereiste hoeveelheid stamoplossing van de teststof of referentiestof aan het kunstmatige afvalwater toe. Bereid, als dit praktischer is of noodzakelijk is om verlies van de teststof te vermijden, een afzonderlijke verdunde oplossing van de teststof in een afzonderlijk reservoir en leid deze via een andere doseerpomp in de hellende buizen.

30. Als alternatief (en bij voorkeur) kan ook bezonken huishoudelijk afvalwater (punt 24) worden gebruikt, dat zo mogelijk elke dag vers wordt verzameld.

Werking van roterende buisreactoren

31. Voor de beoordeling van één teststof zijn twee identieke buisreactoren nodig, die in een kamer met constante temperatuur (gewoonlijk 22 ± 2 °C) zijn geplaatst.

32. Stel de peristaltische pompen zo in dat per uur 250 ± 25 ml organisch medium (zonder teststof) wordt ingebracht in de hellende buizen, die met 18 ± 2 tpm ronddraaien. Breng het smeermiddel (punt 25) van tevoren en tijdens de test periodiek op de leidingen van de pomp aan om de pomp goed te laten werken en de levensduur van de leidingen te verlengen.

33. Stel de hellingshoek van de buizen zo in dat de verblijfsduur van de ingebrachte vloeistof in een schone buis 125 ± 12,5 s bedraagt. Schat de retentietijd door een niet-biologische markerstof (bv. NaCl, inerte kleurstof) aan de ingebrachte vloeistof toe te voegen; de tijd die nodig is voor het bereiken van de piekconcentratie in het effluent geldt als de gemiddelde retentietijd (wanneer de maximale film aanwezig is, kan de retentietijd tot ongeveer 30 minuten toenemen).

34. Gebleken is dat bij deze snelheden, toerentallen en tijdsduren voldoende DOC- (of CZV-)eliminatie plaatsvindt en genitrificeerde effluenten worden geproduceerd. Als onvoldoende eliminatie plaatsvindt of als de prestaties van een bepaalde zuiveringsinstallatie moeten worden nagebootst, moet het debiet worden aangepast. In het laatste geval wordt de doseersnelheid van het organische medium aangepast totdat de prestaties van de reactor overeenkomen met die van de zuiveringsinstallatie.

▼M4

Enten

35. Wanneer kunstmatig afvalwater wordt gebruikt, kan beënting via de lucht volstaan om de groei van micro-organismen op gang te brengen; zo niet, voeg dan gedurende drie dagen per liter 1 ml bezonken slib toe aan de ingebrachte vloeistof.

Metingen

36. Controleer met regelmatige intervallen of de doseer- en omwentelingssnelheden binnen het voorgeschreven bereik liggen. Meet ook de pH van het effluent, zeker wanneer nitrificatie wordt verwacht.

Bemonstering en analyse

37. De methode, het patroon en de frequentie van de bemonstering worden op het doel van de test afgestemd. Neem bijvoorbeeld steek- of grijpmonsters van het influent en het effluent, of verzamel monsters over een langere periode, bv. 3-6 uur. Neem in de eerste periode, zonder teststof, twee keer per week monsters. Filtreer de monsters over membranen of centrifugeer de monsters gedurende circa 15 minuten bij 40 000 m/s^2 (punt 18). Het kan noodzakelijk zijn de monsters vóór membraanfiltratie te laten bezinken en/of over een grof filter te leiden. Bepaal de DOC (of het CZV) ten minste in duplo en zo nodig het BZV, ammonium en nitriet/nitraat.

38. Alle analysen moeten zo spoedig mogelijk na verzameling en bereiding van de monsters worden verricht. Als analysen moeten worden uitgesteld, worden de monsters in het donker bij ongeveer 4 °C bewaard in volle, goed afgesloten flessen. Als de monsters langer dan 48 uur moeten worden bewaard, worden zij geconserveerd door invriezen, zuurbehandeling of toevoeging van een geschikte toxische stof (bv. 20 ml/l van een kwik(II)chlorideoplossing van 10 g/l). De conserveertechniek mag de resultaten van de analyse niet beïnvloeden.

Aanloopperiode

39. In deze periode groeit de biofilm aan het oppervlak tot een optimale dikte; dit duurt doorgaans ongeveer twee weken en mag niet langer dan zes weken duren. De DOC- (of CZV-)verwijdering (punt 44) neemt toe en bereikt een plateauwaarde. Wanneer in beide buizen het plateau is bereikt bij een vergelijkbare waarde, wordt een van de buizen gekozen om als controlereactor te fungeren gedurende de rest van de test, waarbij de prestaties van beide buizen consistent moeten blijven.

Inbrengen van de teststof

40. Voeg in dit stadium de teststof in de vereiste concentratie (gewoonlijk 10-20 mg C/l) toe aan de andere reactor. De controlereactor ontvangt alleen het organische medium.

Acclimatiseringsperiode

41. Zet de DOC- (of CZV-)analysen twee keer per week voort en meet als de primaire biologische afbreekbaarheid moet worden beoordeeld tevens de concentratie van de teststof met een specifieke analyse. Laat nadat de teststof voor het eerst is ingebracht acclimatisatie optreden in één tot zes weken (of in bijzondere omstandigheden langer). Wanneer de procentuele verwijdering (punten 43-45) een maximale waarde heeft bereikt, moeten in de plateaufase binnen ongeveer drie weken 12-15 geldige waarden worden verkregen om de gemiddelde procentuele verwijdering te bepalen. De test wordt geacht te zijn voltooid als een voldoende hoog eliminatiepercentage is bereikt. De test mag normaliter na de eerste toevoeging van de teststof niet langer dan twaalf weken duren.

▼M4

Loslatende film

42. Met betrekkelijk regelmatige intervallen laten plotseling grote hoeveelheden overtollige film los in de buizen. Om te zorgen voor vergelijkbare resultaten, moeten de tests ten minste twee volledige cycli omvatten waarbij de film groeit en loslaat.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

43. Bereken met de volgende vergelijking de procentuele DOC- of (CZV-)eliminatie van de teststof voor elk beoordelingsmoment:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

waarbij

D_t = procentuele DOC- (of CZV)-eliminatie op tijdstip t;

C_s = aan de teststof toegeschreven concentratie DOC (of CZV) in het influent, bij voorkeur geschat aan de hand van de concentratie in en het toegevoegde volume van de stamoplossing (mg/l);

E = gemeten DOC of (CZV) in het testeffluent op tijdstip t (mg/l);

E_o = gemeten DOC of (CZV) in het controle-effluent op tijdstip t (mg/l).

Herhaal de berekening voor de referentiestof, indien getest.

Prestaties van de controlereactor

44. De mate van DOC- (of CZV-)eliminatie (D_B) van het organische medium in de controlereactoren is informatie die nuttig is voor de beoordeling van de biologische afbraakactiviteit van de biofilm tijdens de test. Bereken de procentuele eliminatie met de volgende vergelijking:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

waarbij

C_m = DOC (of CZV) van het organische medium in het controle-influent (mg/l).

45. Bereken, als de teststof met een specifieke analysemethode wordt gemeten, voor elk meettijdstip de verwijdering (D_{ST}) van de teststof met de volgende vergelijking:

$$D_{ST} = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

waarbij

S_i = gemeten of, bij voorkeur, geschatte concentratie van de teststof in het testinfluent (mg/l);

S_e = gemeten concentratie van de teststof in het testeffluent op tijdstip t (mg/l).

▼M4

Bereken, als de analysemethode een positieve waarde in ongewijzigd afvalwater oplevert die overeenkomt met S_c mg/l, de procentuele verwijdering (D_{SC}) als volgt:

$$D_{SC} = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Uitdrukking van de testresultaten

46. Zet de procentuele eliminatie D_t en D_{ST} (of D_{SC}), indien beschikbaar, uit tegen de tijd (zie aanhangsel 2 van hoofdstuk C.10-A). Neem het gemiddelde (afgerond op het dichtstbijzijnde gehele getal) en de standaardafwijking van de in de plateaufase verkregen 12-15 waarden voor D_T (en D_{ST}, indien beschikbaar) als de procentuele verwijdering van de teststof. Uit de vorm van de eliminatiecurve kunnen enkele conclusies over het eliminatieproces worden afgeleid.

Adsorptie

47. Als aan het begin van de test een grote mate van DOC-eliminatie van de teststof wordt waargenomen, wordt de teststof waarschijnlijk geëlimineerd door adsorptie aan de biofilm. Dit kan worden aangetoond door de geadsorbeerde teststof te bepalen in de vaste stoffen die van de film zijn losgekomen. Het is niet gebruikelijk dat gedurende de hele test een hoge mate van DOC-eliminatie van adsorbeerbare stoffen plaatsvindt; normaliter is de mate van verwijdering in eerste instantie groot, waarna geleidelijk een evenwichtswaarde wordt bereikt. Als de geadsorbeerde teststof echter kan zorgen voor acclimatisering van de microbiële populatie, neemt de DOC-eliminatie van de teststof vervolgens toe en wordt een hoge plateauwaarde bereikt.

Aanloopfase

48. Net als in statische screeningtests hebben veel teststoffen een aanloopfase nodig voordat volledige biologische afbraak plaatsvindt. In de aanloopfase vindt acclimatisering (of aanpassing) van de werkzame bacteriën plaats en wordt de teststof nagenoeg niet verwijderd; vervolgens gaan deze bacteriën groeien. Het einde van deze fase is arbitrair vastgesteld op het moment waarop ongeveer 10 % van de initiële hoeveelheid teststof is verwijderd (nadat eventuele adsorptie heeft kunnen plaatsvinden); op dat moment begint de afbraakfase. De aanloopfase is vaak zeer variabel en slecht reproduceerbaar.

Plateaufase

49. In een continue test is de plateaufase van een eliminatiecurve de fase waarin de maximale afbraak plaatsvindt. Deze fase moet ten minste drie weken duren en omvat ongeveer 12-15 geldige gemeten waarden.

Gemiddeld eliminatiepercentage van de teststof

50. Bereken het gemiddelde van de eliminatiewaarden D_t (en D_{ST}, indien beschikbaar) van de teststof in de plateaufase. Rond de gevonden waarde af op het dichtstbijzijnde gehele getal (1 %); dit is het eliminatiepercentage van de teststof. Aanbevolen wordt tevens het 95 %-betrouwbaarheidsinterval van de gemiddelde waarde te berekenen. Bereken op soortgelijke wijze het gemiddelde eliminatiepercentage (D_B) van het organische medium in het controlevat.

▼M4

Aanduiding van biologische afbraak

51. Als de teststof niet significant aan de biofilm adsorbeert en de eliminatiecurve een vorm heeft die typerend is voor biologische afbraak met aanloopfase, afbraakfase en plateaufase (punten 48 en 49), kan de gemeten eliminatie zonder meer aan biologische afbraak worden toegeschreven. Als een grote mate van initiële verwijdering heeft plaatsgevonden, kan in de simulatietest geen onderscheid worden gemaakt tussen biologische en niet-biologische eliminatieprocessen. In dergelijke gevallen, alsook in andere gevallen waarin getwijfeld wordt over de biologische afbraak (bv. als wordt gestript), moeten monsters van de film op de geadsorbeerde teststof worden geanalyseerd of aanvullende statische (screening)tests op biologische afbreekbaarheid worden verricht voor parameters die duidelijk op biologische processen wijzen. Dergelijke tests zijn de methoden voor zuurstofopname (hoofdstuk C.4 van deze bijlage D, E en F) (9) en een test die de CO_2-productie meet (hoofdstuk C.4-C van deze bijlage of de gasruimteproef) (10); gebruik als entmateriaal van tevoren blootgestelde biofilm uit de juiste reactor.

52. Als de verwijdering van zowel de DOC als de specifieke stof is gemeten, wijzen significante verschillen tussen beide verwijderingspercentages (waarbij het eerste lager is dan het tweede) op de aanwezigheid van organische tussenproducten in de effluenten, die moeilijker afbreekbaar kunnen zijn; deze moeten worden onderzocht.

Geldigheid van testresultaten

53. De test wordt geldig geacht als de mate van DOC- (of CZV-)eliminatie (D_B) in de controle-installaties na twee weken bedrijfstijd > 80 % is en geen ongebruikelijke waarnemingen zijn gedaan.

54. Als een gemakkelijk afbreekbare (referentie)stof is getest, moet de mate van biologische afbraak > 90 % zijn en mag het verschil tussen duplowaarden niet meer dan 5 % bedragen. Als niet aan deze twee criteria wordt voldaan, moeten de procedures van de proef opnieuw worden bekeken en/of moet huishoudelijk afvalwater uit een andere bron worden verkregen.

55. Indien een teststof in duplo-installaties wordt behandeld, mag ook het verschil tussen de waarden voor biologische afbraak van die installaties niet meer dan 5 % bedragen. Als niet aan dit criterium wordt voldaan, maar de verwijdering hoog is, wordt de analyse gedurende nog eens drie weken voortgezet. Als de verwijdering laag is, worden de inhibitoire effecten van de teststof onderzocht (indien niet bekend) en wordt de test indien mogelijk herhaald met een lagere concentratie teststof.

Testverslag

56. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— identificatiegegevens;

— fysische toestand en, indien relevant, fysisch-chemische kenmerken.

Testomstandigheden:

— eventuele wijzigingen van het testsysteem, in het bijzonder indien onoplosbare of vluchtige stoffen worden getest;

— soort organisch medium;

— indien gebruikt en indien bekend, percentage en aard van industrieel afvalwater dat in het rioolwater aanwezig is;

— beëntingsmethode;

▼M4

— stamoplossing van de teststof — gehalte aan DOC (opgeloste organische koolstof) en TOC (totale organische koolstof); bij suspensies: wijze van bereiding; gebruikte testconcentratie(s), met motivering indien afwijkend van het bereik 10-20 mg/l DOC; toevoegingsmethode; datum van eerste toevoeging; eventuele wijzigingen van de concentratie;

— gemiddelde hydraulische retentietijd (zonder groei); omwentelingssnelheid van de buis; benadering van de hellingshoek, indien mogelijk;

— gegevens over loslaten film; tijd en intensiteit;

— testtemperatuur en bereik;

— toegepaste analysetechnieken.

Testresultaten:

— alle gemeten gegevens van DOC, CZV, specifieke analysen, pH, temperatuur, stikstofverbindingen, indien relevant;

— alle berekende gegevens van D_t (of D_{tc}), D_B en D_s in de vorm van tabellen en eliminatiecurven;

— informatie over de aanloop- en plateaufase, de duur van de test, het eliminatiepercentage van de teststof en de referentiestof (indien getest) en van het organische medium (in de controle-installatie), met statistische informatie en verklaringen betreffende de biologische afbraak en de geldigheid van de test;

— een bespreking van de resultaten.

LITERATUUR:

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid A-F.

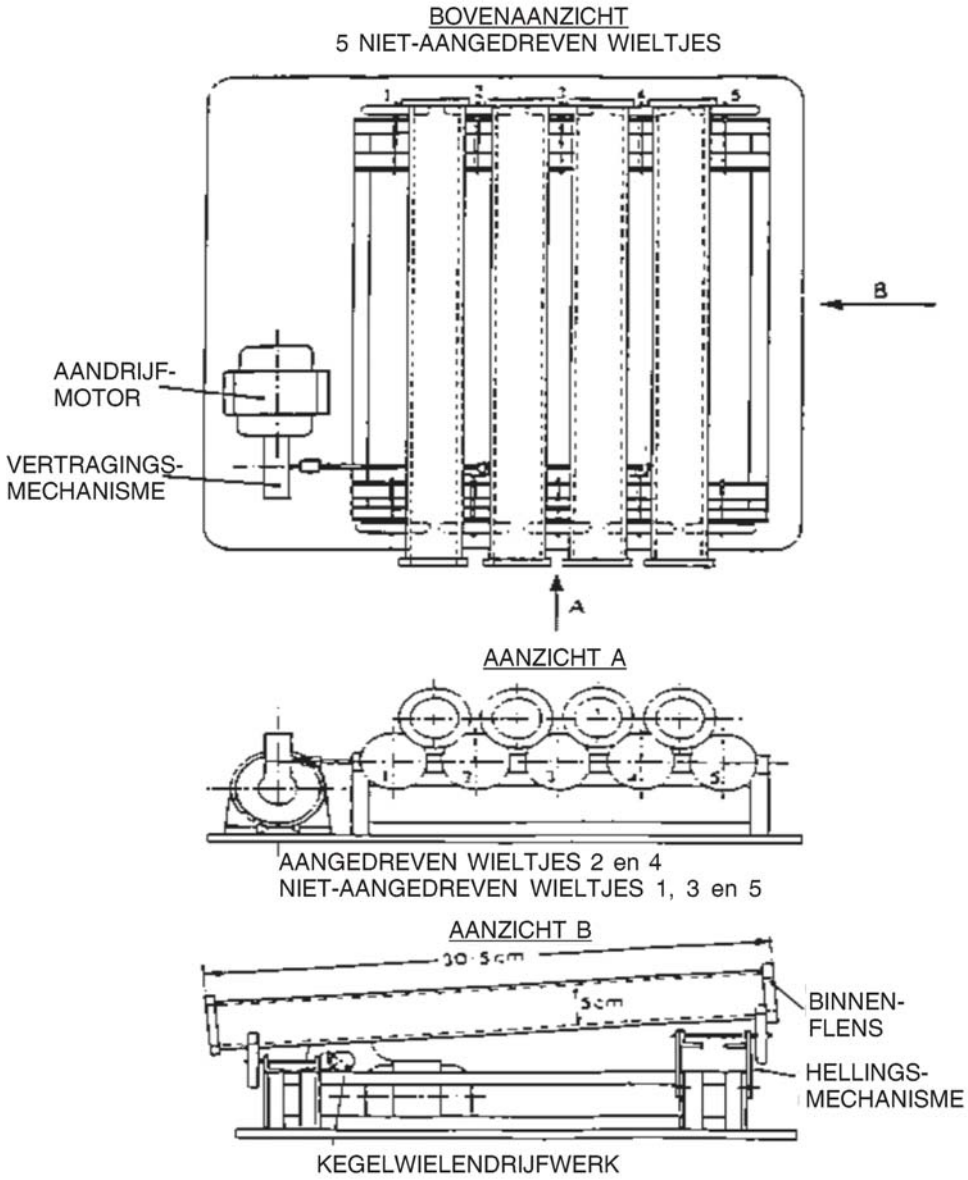
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼M4

Aanhangsel 8

Figuur 1

Roterende buizen



Legenda:

Bovenaanzicht

Aanzicht A/B

Aangedreven wieltjes

Niet-aangedreven wieltjes

Aandrijfmotor

Vertragingsmechanisme

Binnenflens

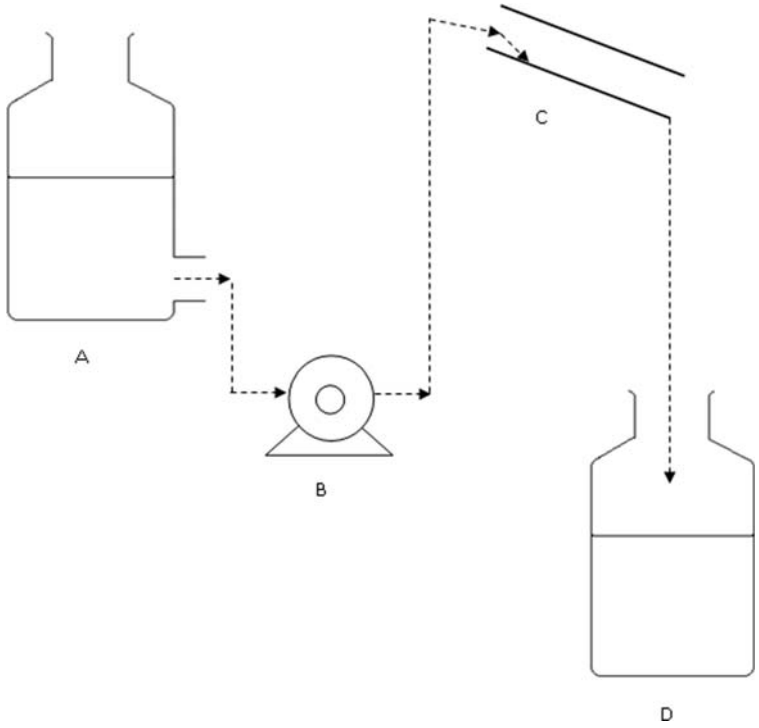
Hellingsmechanisme

Kegelwielendrijfwerk

▼**M4**

Figuur 2

Stroomdiagram



A: Opslagvat

B: Peristaltische pomp

C: Roterende buis

D: Opslagvat effluent

DEFINITIES:

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

(Chemische) stof: „Er zij op gewezen dat het begrip „(chemische) stof" in de UNCED-overeenkomsten en nadere documenten een ruime betekenis heeft en betrekking heeft op zowel stoffen, producten, mengsels, preparaten als andere begrippen waarmee de betrokken stoffen in de bestaande systemen kunnen worden aangeduid."

▼M6

C.11. ACTIEF SLIB: ADEMHALINGSREMMINGSTEST (KOOLSTOF- EN AMMONIUMOXIDATIE)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 209 (2010) van de OESO. Met deze testmethode wordt de invloed van een chemische stof op micro-organismen uit actief slib (voornamelijk bacteriën) bepaald door meting van hun ademhalingssnelheid (koolstof- en/of ammoniumoxidatie) onder gedefinieerde omstandigheden in aanwezigheid van verschillende concentraties van de teststof. De testmethode is gebaseerd op de test van de ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry) (1) (2), de eerdere OESO TG 209 (3) en de herziene ISO-norm 8192 (4). Deze test voorziet in een snelle screeningsmethode om de effecten van chemische stoffen op de micro-organismen van actief slib uit het biologische (aerobe) stadium van afvalwaterbehandelingsinstallaties te bepalen. Ook kan de test dienen om een indicatie te krijgen van geschikte niet-remmende concentraties van teststoffen waarvan de biologische afbreekbaarheid moet worden onderzocht (bv. hoofdstukken C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 en C.29 van deze bijlage, OESO TG 302C). In dat geval kan de test als screeningstest worden uitgevoerd, vergelijkbaar met een bereikbepalingstest of limiettest (zie punt 39), waarbij alleen naar de totale ademhaling wordt gekeken. Voorzichtigheid is echter geboden als de gegevens worden gebruikt voor tests op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (hoofdstuk C.4 A-F en C.29 van deze bijlage) waarbij de concentratie entmateriaal beduidend lager is dan bij deze testmethode. Afwezigheid van remming in deze ademhalingstest betekent niet automatisch dat dit ook het geval is in de test op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid van hoofdstuk C.4 A-F of C.29 van deze bijlage.

2. Hoewel de ademhalingsremmingstest sinds de eerste publicatie over het algemeen met succes is toegepast, werden in enkele gevallen foutieve resultaten gerapporteerd, bv. in (2) (4) (5). Concentratiegerelateerde ademhalingscurven waren soms bifasisch, dosis-responscurven afwijkend van vorm en EC_{50}-waarden onverwacht laag (5). Uit onderzoeken is gebleken dat dergelijke resultaten worden verkregen wanneer in het gebruikte actief slib aanzienlijke nitrificatie plaatsvindt en de teststof een groter effect heeft op de ammoniumoxidatie dan op de algemene heterotrofe oxidatie. Deze foutieve resultaten zijn te corrigeren door de uitvoering van extra tests met een specifieke nitrificatieremmer. Uit metingen van de zuurstofopnamesnelheid in aanwezigheid en afwezigheid van een dergelijke remmer, bv. N-allylthioureum (ATU), kunnen de totale, de heterotrofe en de nitrificatie-zuurstofopname worden berekend (4) (7) (8). Aldus kunnen de remmende effecten van een teststof op deze twee processen worden bepaald en kunnen de EC_{50}-waarden voor de oxidatie van organische koolstof (heterotroof) en ammonium (nitrificatie) op de gebruikelijke manier worden berekend. Hierbij moet worden opgemerkt dat het remmende effect van N-allylthioureum in uitzonderlijke gevallen geheel of gedeeltelijk teniet wordt gedaan door complexvorming met teststoffen of mediumsupplementen, bv. Cu^{++} -ionen (6). Voor *Nitrosomonas* zijn Cu^{++} -ionen essentieel, maar in hoge concentraties toxisch.

3. Met name in Europese landen is de behoefte aan nitrificatie bij de aerobe behandeling van afvalwater, als noodzakelijke stap in het proces waarbij stikstofverbindingen uit afvalwater worden verwijderd door denitrificatie tot gasvormige producten, urgent geworden; de EU heeft nu lagere grenswaarden vastgesteld voor de stikstofconcentratie in behandelde effluenten die in ontvangende wateren worden geloosd ([1]).

([1]) Richtlijn 91/271/EEG van de Raad van 21 mei 1991 inzake de behandeling van stedelijk afvalwater. PB L 135 van 30.5.1991, blz. 40-52.

▼M6

4. Voor de meeste doeleinden volstaat het om alleen het effect op de oxidatie van organische koolstof te bepalen. Soms is het echter nodig om het effect op alleen nitrificatie of op zowel nitrificatie als oxidatie van organische koolstof afzonderlijk te onderzoeken om de resultaten te kunnen interpreteren en de effecten te kunnen begrijpen.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

5. De ademhalingssnelheid van actief slib waaraan kunstmatig afvalwater wordt toegevoegd, wordt na een contacttijd van 3 uur gemeten in een gesloten cel die een zuurstofelektrode bevat. Afhankelijk van het reële blootstellingsscenario kunnen langere contacttijden wenselijk zijn. Als de teststof snel wordt afgebroken, bv. abiotisch door hydrolyse, of vluchtig is en de concentratie niet goed op peil blijft, kan een bijkomende kortere blootstellingsperiode, bv. 30 minuten, worden gebruikt. De gevoeligheid van elke partij actief slib moet op de dag van de blootstelling gecontroleerd worden met een geschikte referentiestof. De test wordt meestal gebruikt om de EC_x (bv. EC_{50}) van de teststof en/of de concentratie zonder waargenomen effect (NOEC) te bepalen.

6. De remming van de zuurstofopname door organische-koolstof-oxiderende organismen en die door ammonium-oxiderende micro-organismen kunnen apart worden uitgedrukt door de zuurstofopnamesnelheid te meten in afwezigheid en aanwezigheid van N-allylthioureum, een specifieke remmer van de oxidatie van ammonium tot nitriet door de nitrificerende bacteriën van deze eerste stap. De procentuele remming van de zuurstofopnamesnelheid wordt dan berekend door de zuurstofopnamesnelheid in aanwezigheid van de teststof te vergelijken met die van corresponderende controles zonder teststof, zowel in aanwezigheid als afwezigheid van de specifieke remmer N-allylthioureum.

7. Eventuele zuurstofopname ten gevolge van abiotische processen kan gedetecteerd worden door bepaling van de snelheid in mengsels van teststof, kunstmatig afvalwater en water, maar zonder actief slib.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

8. De identificatie (bij voorkeur CAS-nummer), naam (IUPAC), zuiverheid, wateroplosbaarheid, dampspanning, vluchtigheid en adsorptie-eigenschappen van de teststof moeten bekend zijn om de resultaten goed te kunnen interpreteren. Normaal gesproken kunnen vluchtige chemische stoffen niet naar behoren worden getest, tenzij er speciale voorzorgsmaatregelen worden genomen (zie punt 21).

TOEPASBAARHEID VAN DE TESTMETHODE

9. De testmethode is geschikt voor in water oplosbare, slecht oplosbare en vluchtige chemische stoffen. Voor chemische stoffen met een beperkte oplosbaarheid is het niet altijd mogelijk EC_{50} -waarden te verkrijgen en met vluchtige stoffen kunnen alleen geldige resultaten worden verkregen indien het grootste deel (grofweg > 80 %) van de teststof aan het eind van de blootstellingsperiode(n) nog in het reactiemengsel aanwezig is. Bij onzekerheid over de stabiliteit of vluchtigheid van de teststof moeten aanvullende ondersteunende analysegegevens worden ingediend om de schatting van de EC_x-concentratie te verfijnen.

▼M6

REFERENTIESTOFFEN

10. De test moet periodiek met referentiestoffen worden uitgevoerd om de betrouwbaarheid van de testmethode en testomstandigheden te waarborgen, en tevens op de dag van blootstelling om van elke partij actief slib die als microbieel entmateriaal wordt gebruikt de gevoeligheid te controleren. De chemische stof 3,5-dichloorfenol (3,5-DCP) wordt aanbevolen als remmende referentiestof, omdat het een bekende remmer van de ademhaling is en in veel soorten remmings-/toxiciteitstests wordt gebruikt (4). Ook koper(II)sulfaatpentahydraat is een geschikte referentiestof voor remming van de totale ademhaling (9). N-methylaniline kan als specifieke referentieremmer van nitrificatie worden gebruikt (4).

GELDIGHEIDSCRITERIA EN REPRODUCEERBAARHEID

11. De zuurstofopnamesnelheid van de blanco controles (zonder teststof of referentiestof) moet minimaal 20 mg zuurstof per gram actief slib (drooggewicht van gesuspendeerde vaste stoffen) per uur zijn. Als de snelheid lager is moet de test worden herhaald met gewassen actief slib of met slib uit een andere bron. De variatiecoëfficiënt van de zuurstofopnamesnelheid in controlereplicaten aan het eind van de definitieve test mag niet hoger dan 30 % zijn.

12. In een door ISO (4) georganiseerd internationaal ringonderzoek in 2004 met actief slib uit huishoudelijk afvalwater lag de EC_{50} van 3,5-DCP tussen 2 mg/l en 25 mg/l voor totale ademhaling, tussen 5 mg/l en 40 mg/l voor heterotrofe ademhaling en tussen 0,1 mg/l en 10 mg/l voor nitrificatieademhaling. Wanneer de EC_{50} van 3,5-DCP niet in het verwachte bereik ligt, moet de test worden herhaald met actief slib uit een andere bron. De EC_{50} van koper(II)sulfaatpentahydraat voor de totale ademhaling moet tussen 53 mg/l en 155 mg/l liggen (9).

BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Testvaten en apparatuur

13. Naast de gebruikelijke laboratoriumuitrusting is het volgende nodig:

(a) Testvaten — bijvoorbeeld bekerglazen van 1 000 ml, voor 500 ml reactiemengsel (zie 5 in figuur 1);

(b) Cel en toebehoren voor het meten van de concentratie opgeloste zuurstof; een geschikte zuurstofelektrode; een gesloten cel die het monster kan bevatten zonder gasruimte bovenin en een recorder (bv. 7, 8, 9 in figuur 1 van aanhangsel 2); er kan ook een BOD-fles worden gebruikt met een geschikte hulsadapter om de zuurstofelektrode vast te klemmen in de hals van de fles (zie figuur 2 van aanhangsel 3). Om bij het inbrengen van de elektrode overlopen en daarmee verlies van vloeistof te voorkomen is het raadzaam eerst een trechter of glazen buisje door de huls te steken, of om vaten met uitlopende randen te gebruiken. In beide gevallen moet een magneetroerder of een andere roermethode, bv. een zelfroerende elektrode, worden gebruikt.

(c) Magneetroerders en roerbonen, bekleed met inert materiaal, voor gebruik in de meetcel en/of de testvaten;

(d) Beluchtingstoestel: perslucht moet, indien nodig, door een geschikt filter worden geleid om stof en olie te verwijderen en door wasflessen met water om de lucht te bevochtigen. De inhoud van de vaten wordt belucht met pasteurpipetten of andere beluchtingshulpmiddelen die geen chemische stoffen adsorberen. Een draaiende schudder ingesteld op een snelheid tussen 150 en 250 rpm met flessen met een inhoud van bijvoorbeeld 2 000 ml is geschikt om aan de zuurstofbehoefte van het slib

▼M6

te voldoen en moeilijkheden te ondervangen met stoffen die overmatig schuim produceren, vluchtig zijn en daardoor verloren gaan, of moeilijk dispergeerbaar zijn bij beluchting door luchtdoorleiding. Het testsysteem bestaat doorgaans uit een aantal continu beluchte bekerglazen die één voor één worden gevuld (bv. met tussenpozen van 10-15 minuten) en vervolgens één voor één worden geanalyseerd. Gevalideerde apparatuur voor gelijktijdige beluchting en meting van de zuurstofverbruikssnelheid in de mengsels kan ook worden gebruikt.

(e) pH-meter;

(f) Centrifuge: standaard tafelmodel voor slib die een versnelling van 10 000 m/s^2 kan produceren.

Reagentia

14. Alle reagentia dienen van p.a.-kwaliteit te zijn.

Water

15. Er moet gedestilleerd of gedeïoniseerd water met een DOC-gehalte van minder dan 1 mg/l worden gebruikt, behalve wanneer chloorvrij kraanwater wordt voorgeschreven.

Kunstmatig afvalwater

16. Het medium dat wordt bereid bevat de volgende bestanddelen in de aangegeven hoeveelheden:

— pepton	16 g
— vleesextract (of een vergelijkbaar plantenextract)	11 g
— ureum	3 g
— natriumchloride (NaCl)	0,7 g
— calciumchloridedihydraat ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnesiumsulfaatheptahydraat ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— watervrij kaliummonowaterstoffosfaat (K_2HPO_4)	2,8 g
— met gedestilleerd of gedeïoniseerd water aangevuld tot 1 liter	

17. De pH van deze oplossing moet 7,5 ± 0,5 zijn. Indien het bereide medium niet onmiddellijk wordt gebruikt, moet het in het donker bij 0 °C tot 4 °C worden bewaard gedurende maximaal 1 week of onder omstandigheden waarbij de samenstelling niet verandert. Let op: dit kunstmatige afvalwater is 100 maal zo geconcentreerd als dat wat beschreven wordt in het technisch rapport van de OESO „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents” van 11 juni 1976, en bovendien is er dikaliumwaterstoffosfaat toegevoegd.

▼M6

18. Het is ook mogelijk om componenten van het medium vóór opslag apart te steriliseren, of om de pepton en het vleesextract kort voor de test toe te voegen. Vóór gebruik moet het medium goed worden gemengd en de pH zo nodig worden bijgesteld tot pH 7,5 ± 0,5.

Teststof

19. Voor stoffen die goed in water oplosbaar zijn wordt een stamoplossing bereid die onder de oplosbaarheidsgrens moet blijven (er mogen geen precipitaten ontstaan). Slecht in water oplosbare stoffen, mengsels met componenten met een verschillende oplosbaarheid in water, en adsorberende stoffen moeten rechtstreeks in de testvaten worden afgewogen. Het gebruik van stamoplossingen kan in zulke gevallen een alternatief zijn, mits de concentraties van de opgeloste teststof analytisch worden bepaald in de testvaten (voordat actief slib wordt toegevoegd). Ook als er WAF's (Water Accommodated Fractions) worden bereid is een analytische bepaling van de concentratie van de opgeloste teststof in de testvaten essentieel. Het gebruik van organische oplosmiddelen, dispergeermiddelen/emulgatoren om te oplosbaarheid te verhogen, moet worden vermeden. Ultrasoonbehandeling van stamoplossingen en het vooraf roeren van suspensies, bv. overnacht, is een optie als er adequate informatie over de stabiliteit van de teststof onder dergelijke omstandigheden beschikbaar is.

20. De teststof kan de pH in het testsysteem in negatieve zin beïnvloeden. Voordat de test wordt opgezet moet de pH van met teststof behandelde mengsels in een oriënterende test worden gemeten, om na te gaan of de pH zal moeten worden bijgesteld vóór de hoofdtest, en nogmaals op de dag van de hoofdtest. Oplossingen/suspensies van teststof in water moeten, indien nodig, geneutraliseerd worden voordat het entmateriaal wordt toegevoegd. Omdat de chemische eigenschappen van de chemische stof hierdoor kunnen veranderen kan het, afhankelijk van het doel van het onderzoek, wenselijk zijn het effect van de teststof op het slib tevens uit te voeren in een test zonder pH-bijstelling.

21. In tests met vluchtige stoffen, met name als het systeem met lucht wordt doorborreld, kunnen de waargenomen toxische effecten variabel zijn als gevolg van verliezen van de stof gedurende de blootstelling. Bij zulke stoffen moet men zorgvuldig te werk gaan door stofspecifieke analyse uit te voeren op controlemengsels die de stof bevatten en door de manier van beluchten te wijzigen.

Referentiestof

22. Als 3,5-dichloorfenol als referentiestof wordt gebruikt, moet een oplossing van 1,00 g 3,5-dichloorfenol in 1 000 ml water worden bereid (15). Gebruik warm water en/of ultrasoonbehandeling om het oplossen te versnellen en vul de oplossing aan tot het eindvolume nadat deze is afgekoeld tot kamertemperatuur. Men moet zich er echter van verzekeren dat de structuur van de referentiestof onveranderd blijft. De pH van de oplossing moet gecontroleerd worden en zo nodig met NaOH of H_2SO_4 op pH 7 — 8 worden gesteld.

23. Als koper(II)sulfaatpentahydraat de referentiestof is, worden concentraties van 58 mg/l, 100 mg/l en 180 mg/l (een reden van 1.8) gebruikt. De stof wordt rechtstreeks in de testvaten afgewogen (29 — 50 — 90 mg voor een totaal volume van 500 ml). Vervolgens wordt de stof opgelost in 234 ml geautoclaveerd kraanwater. Koper(II)sulfaat lost gemakkelijk op. De test wordt gestart door toevoeging van 16 ml kunstmatig afvalwater en 250 ml actief slib.

▼M6

Specifieke remmer van nitrificatie

24. Er wordt een 2,32 g/l stamoplossing van N-allylthioureum (ATU) bereid. Toevoeging van 2,5 ml van deze stamoplossing aan een incubatiemengsel met een eindvolume van 500 ml geeft een eindconcentratie van 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l), die hoog genoeg is (4) om 100 % remming van de nitrificatie te veroorzaken in nitrificerend actief slib dat 1,5 g/l gesuspendeerde vaste stoffen bevat.

Abiotische controle

25. Onder sommige uitzonderlijke omstandigheden kan een teststof met sterk reducerende eigenschappen meetbaar abiotisch zuurstofverbruik veroorzaken. In die gevallen zijn abiotische controles nodig om onderscheid te kunnen maken tussen abiotische zuurstofopname door de teststof en microbiële ademhaling. Abiotische controles kunnen bereid worden door het entmateriaal weg te laten uit de testmengsels. Evenzo kunnen abiotische controles zonder entmateriaal worden opgenomen wanneer ondersteunende analytische metingen worden uitgevoerd om de bereikte concentratie gedurende de blootstellingsfase van de test te bepalen, bijvoorbeeld bij het gebruik van stamoplossingen van slecht in water oplosbare stoffen met componenten met een verschillende oplosbaarheid in water. In specifieke gevallen is een abiotische controle nodig met entmateriaal dat is gesteriliseerd (bv. door autoclavering of toevoeging van steriliserende toxische stoffen). Sommige chemische stoffen kunnen zuurstof produceren of verbruiken als er voldoende oppervlak voor reactie is, zelfs als ze hiervoor normaal gesproken een veel hogere temperatuur of druk nodig hebben. In dit verband moet speciale aandacht worden geschonken aan peroxyverbindingen. Gesteriliseerd entmateriaal biedt een groot oppervlak.

Entmateriaal

26. Voor algemeen gebruik wordt actief slib verzameld uit de uitlaat, of dicht bij de uitlaat, van de beluchtingstank van een goed functionerende afvalwaterbehandelingsinstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater behandelt. Afhankelijk van het doel van de test kunnen ook andere geschikte bronnen van actief slib worden gebruikt, bv. in het laboratorium gekweekt slib, met een concentratie gesuspendeerde vaste stoffen tussen 2 g/l en 4 g/l. Het is echter waarschijnlijk dat slib uit verschillende behandelingsinstallaties zal verschillen in eigenschappen en gevoeligheid.

27. Het verzamelde slib kan zo gebruikt worden. Wel moeten grove deeltjes worden verwijderd door kortstondige bezinking, bv. 5 tot 15 minuten, en decanteren van de bovenlaag met fijnere deeltjes, of door zeven (bv. mazen van 1 mm^2). Het slib kan ook *ca* 15 seconden of langer gehomogeniseerd worden in een blender, maar dit moet voorzichtig gebeuren met het oog op de afschuifkrachten en temperatuurverandering die bij langdurig homogeniseren in een blender kunnen optreden.

28. Vaak is het nodig het slib te wassen, bijvoorbeeld wanneer de endogene ademhalingssnelheid laag is. Hiertoe wordt het slib eerst gecentrifugeerd, bv. 10 minuten bij ca.10 000 m/s^2, waardoor een helder supernatant en een pellet van vaste stoffen wordt verkregen. Vervolgens wordt het supernatant weggegooid en het slib onder schudden geresuspendeerd in chloorvrij kraanwater, waarna het waswater wordt verwijderd door opnieuw centrifugeren en weggooien. Indien nodig wordt het proces van wassen en centrifugeren herhaald. De droge massa van een bekend volume geresuspendeerd slib moet worden bepaald, waarna het slib hetzij wordt geconcentreerd door vloeistofverwijdering of verder wordt verdund met chloorvrij kraanwater,

▼M6

zodat slib met de gewenste concentratie vaste stoffen van 3 g/l wordt verkregen. Het actief slib moet continu worden belucht (bv. 2 l/minuut) bij de testtemperatuur en zo mogelijk op de dag van verzameling worden gebruikt. Als dat niet mogelijk is dient dagelijks kunstmatig afvalwater aan het slib te worden toegevoegd (50 ml kunstmatig afvalwater per liter actief slib), gedurende de twee volgende dagen. Dan wordt het slib voor de test gebruikt; de resultaten worden als geldig beschouwd als uit de snelheid van de endogene, heterotrofe ademhaling en de nitrificatie-ademhaling blijkt dat de activiteit van het slib niet significant is veranderd.

29. Er kunnen moeilijkheden ontstaan als tijdens de incubatie zoveel schuimvorming optreedt dat er schuim met daarin vaste slibdeeltjes uit de beluchtingsvaten wordt gedreven. Schuimvorming, hoewel soms simpelweg veroorzaakt door het kunstmatige afvalwater, is te verwachten als de teststof een oppervlakteactieve stof is of bevat. Verlies van vaste slibdeeltjes uit de testmengsels leidt tot kunstmatig verlaagde ademhalingssnelheden die ten onrechte geïnterpreteerd zouden kunnen worden als een resultaat van remming. Daarnaast heeft het beluchten van een oplossing met een oppervlakteactieve stof tot gevolg dat deze stof in de schuimlaag wordt geconcentreerd, waardoor bij verlies van schuim de blootstellingsconcentraties zullen afnemen. Schuimvorming kan onder controle worden gehouden met eenvoudige mechanische methoden (bv. af en toe handmatig roeren met een glasstaafje) of door toevoeging van een siliconenantischuimmiddel zonder oppervlakteactieve stoffen en/of door het gebruik van de schudfles-beluchtingsmethode. Indien het probleem samenhangt met de aanwezigheid van kunstmatig afvalwater, moet een antischuimmiddel aan het afvalwater worden toegevoegd met een snelheid van bv. 50 µl/l. Als de teststof schuimvorming veroorzaakt, moet bij de hoogste testconcentratie worden bepaald welke hoeveelheid nodig is om dit tegen te gaan, en moeten vervolgens alle beluchtingsvaten op identieke wijze worden behandeld (ook de vaten zonder schuim, zoals de blanco controles en referentievaten). Er mag geen interactie optreden tussen het antischuimmiddel en het entmateriaal en/of de teststof.

TESTPROCEDURE

30. De remming van drie verschillende zuurstofopnameprocessen kan worden bepaald: totale opname, alleen heterotrofe opname, en opname ten gevolge van nitrificatie. Normaal gesproken volstaat het om remming van de totale zuurstofopname te meten. Het is nodig de effecten op heterotrofe zuurstofopname ten gevolge van organische-koolstof-oxidatie en zuurstofopname ten gevolge van ammoniumoxidatie te bepalen wanneer deze twee afzonderlijke eindpunten specifiek vereist zijn voor een bepaalde chemische stof, of (als dat wenselijk is) om een verklaring te vinden voor een atypische dosis-responscurve voor remming van de totale zuurstofopname.

Testomstandigheden

31. De test moet worden uitgevoerd bij een temperatuur van 20 ± 2 °C.

Testmengsels

32. Testmengsels (F_T volgens tabel 1) bestaande uit water, kunstmatig afvalwater en teststof worden zodanig bereid zodat verschillende nominale concentraties van de teststof worden verkregen (zie tabel 1 voor een voorbeeld van volumes van bestanddelen). De pH moet indien nodig worden bijgesteld tot 7,5 ± 0.5. De mengsels worden verdund met water en het entmateriaal wordt toegevoegd, zodanig dat in de vaten gelijke eindvolumes worden verkregen; vervolgens wordt de beluchting gestart.

Referentiemengsels

33. Mengsels (F_R) met in plaats van de teststof de referentiestof, bv. 3,5-dichloorfenol, worden op dezelfde manier als de testmengsels bereid.

▼M6

Blanco controles

34. In tests waarbij de testbekerglazen één voor één met tussenpozen worden opgezet moeten blanco controles (F_B) aan het begin en aan het eind van de blootstellingsperiode worden bereid. In tests met apparatuur die gelijktijdige metingen van het zuurstofverbruik toestaat, moeten in elke ronde van gelijktijdige analyses ten minste twee blanco controles worden opgenomen. Blanco controles bevatten een even groot volume actief slib en kunstmatig medium, maar geen test- of referentiestof. Ze moeten met water worden verdund tot hetzelfde volume als de test- en referentiemengsels.

Abiotische controle

35. Indien nodig, bijvoorbeeld als van een teststof bekend is of vermoed wordt dat deze sterk reducerende eigenschappen heeft, moet een F_A-mengsel worden bereid om het abiotische zuurstofverbruik te meten. Dit mengsel bevat dezelfde hoeveelheden teststof en kunstmatig afvalwater en heeft hetzelfde volume als de testmengsels, maar bevat geen actief slib.

Algemene procedure en metingen

36. Testmengsels, referentiemengsels en de blanco en abiotische controles worden bij de testtemperatuur geïncubeerd onder geforceerde beluchting (0,5 tot 1 l/min) om de concentratie opgeloste zuurstof boven 60-70 % van de verzadigingswaarde te houden en de slibvlokken in suspensie te houden. Roeren van de culturen is ook nodig om de slibvlokken in suspensie te houden. De incubatie begint wanneer het entmateriaal van actief slib in contact komt met de andere bestanddelen van het uiteindelijke mengsel. Aan het eind van de incubatie, na de gespecificeerde blootstellingstijd van doorgaans 3 uur, worden monsters onttrokken om daarin de snelheid te meten waarmee de concentratie opgeloste zuurstof afneemt, in de speciaal daarvoor ontworpen cel (figuur 2 van aanhangsel 3) of in een volledig gevulde BOD-fles. De manier waarop de incubaties worden gestart hangt ook af van de capaciteit van de apparatuur die voor meting van het zuurstofverbruik wordt gebruikt. Als deze één enkele zuurstofelektrode omvat, worden individuele metingen verricht. In dat geval bereid men de verschillende mengsels die voor de test in afvalwater nodig zijn, maar nog zonder entmateriaal. De vereiste hoeveelheden slib worden dan apart toegevoegd aan elk vat van de serie. De incubaties worden één voor één gestart met geschikte tijdsintervallen van bijvoorbeeld 10 tot 15 minuten. Het meetsysteem kan ook meerdere elektroden omvatten waardoor gelijktijdige metingen mogelijk zijn; in dat geval wordt aan de juiste groepen vaten op hetzelfde moment entmateriaal toegevoegd.

37. De nominale concentratie actief slib bedraagt in alle test-, controle- en blanco monsters (maar niet in de abiotische controlemonsters) 1,5 g gesuspendeerde vaste stoffen per liter. Het zuurstofverbruik moet na 3 uur blootstelling worden gemeten. In bepaalde gevallen is een extra meting na een blootstelling van 30 minuten wenselijk, zoals beschreven in punt 5.

Nitrificerend vermogen van slib

38. Om vast te stellen of en, zo ja, met welke snelheid het slib nitrificeert, moeten controlemengsels (F_B) worden bereid zoals bij de blanco controles, maar waarbij aan een deel van de mengsels N-allylthioureum (11,6 mg/l) wordt toegevoegd (F_N). De mengsels moeten worden belucht en 3 uur bij

▼M6

20° ± 2 °C worden geïncubeerd. Dan worden de zuurstofopnamesnelheden gemeten en kan de snelheid van zuurstofopname ten gevolge van nitrificatie worden berekend.

Opzet van de tests

Bereikbepalingstest

39. Indien nodig kan met een oriënterende test het concentratiebereik van een teststof worden geschat dat gebruikt moet worden in een definitieve test voor bepaling van de remming van het zuurstofverbruik. Als in een oriënterende test geen remming van het zuurstofverbruik door de teststof wordt gevonden, kan dat betekenen dat een definitieve test overbodig is. Wel moeten bepalingen in triplo bij de hoogste geteste concentratie van de oriënterende test (meestal 1 000 mg/l, maar afhankelijk van de vereiste meetgegevens) worden opgenomen.

Tabel 1

Voorbeelden van mengsels voor een oriënterende test

Reagens	Oorspronkelijke concentratie				
Stamoplossing van teststof	10 g/l				
Stamoplossing van kunstmatig medium	Zie punt 16				
Stamsuspensie van actief slib	3 g/l gesuspendeerde vaste stoffen				
Componenten van mengsels	Toevoeging aan testvaten [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Stamoplossing van teststof (ml) (punten 19 tot en met 21)	0,5	5	50	0	50
Stamoplossing van kunstmatig afvalwater (punt 16)	16	16	16	16	16
Suspensie van actief slib (punten 26 tot en met 29)	250	250	250	250	0
Water (punt 15)	233,5	229	184	234	434
Totale volume van mengsels (ml)	500	500	500	500	500
Concentraties in het mengsel					
Testsuspensie (mg/l) Actief slib	10	100	1 000	0	1 000
(gesuspendeerde vaste stoffen) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Dezelfde procedure moet voor de referentiestof worden gevolgd, waardoor vaten F_{R1-3}worden verkregen

40. De test moet worden uitgevoerd met minimaal drie concentraties teststof, bv. 10 mg/l, 100 mg/l en 1 000 mg/l, een blanco controle en, indien nodig, minimaal drie abiotische controles met de hoogste concentraties teststof (zie voor een voorbeeld tabel 1). In het ideale geval heeft de laagste concentratie

▼M6

geen effect op het zuurstofverbruik. Eerst worden de snelheden van zuurstofopname en, indien van toepassing, de snelheid van nitrificatie berekend, en vervolgens de procentuele remming. Afhankelijk van het doel van de test is het ook mogelijk om alleen de toxiciteit van een limietconcentratie, bv. 1 000 mg/l, te bepalen. Als er bij deze concentratie geen statistisch significant toxisch effect optreedt, zijn geen verdere tests bij hogere of lagere concentraties nodig. Slecht in water oplosbare stoffen, mengsels met componenten met een verschillende oplosbaarheid in water en adsorberende stoffen moeten rechtstreeks in de testvaten worden afgewogen. In dat geval wordt in plaats van stamoplossing van de teststof een even groot volume verdunningswater toegevoegd.

Definitieve test

Remming van de totale zuurstofopname

41. De test moet worden uitgevoerd met een reeks concentraties die uit de oriënterende test zijn afgeleid. Om zowel een NOEC als een EC_x (bv. EC_{50}) te verkrijgen, worden in de meeste gevallen zes controles en vijf behandelingsconcentraties in een meetkundige reeks met bepalingen in vijfvoud aanbevolen. De abiotische controle hoeft niet te worden herhaald als er in de oriënterende test geen zuurstofopname was; als er wel significante opname optrad, moeten voor elke concentratie teststof abiotische controles worden opgenomen. De gevoeligheid van het slib moet gecontroleerd worden met de referentiestof 3,5-dichloorfenol. Omdat bekend is dat de gevoeligheid van slib fluctueert, moet deze vóór elke testreeks worden gecontroleerd. In alle gevallen worden na 3 uur monsters uit de testvaten onttrokken, en als dat nodig is ook na 30 min, voor meting van de zuurstofopnamesnelheid in de zuurstofelektrodecel. Uit de verzamelde gegevens wordt de specifieke ademhalingssnelheid van de controlemengsels en testmengsels berekend, waarna de procentuele remming wordt berekend met vergelijking 7 hieronder.

Onderscheid maken tussen remming van heterotrofe ademhaling en nitrificatie

42. Door de specifieke nitrificatieremmer ATU toe te voegen kunnen de remmende effecten van teststoffen op de heterotrofe oxidatie rechtstreeks worden bepaald, en door deze zuurstofopnamesnelheid in aanwezigheid van ATU af te trekken van de totale opnamesnelheid (in afwezigheid van ATU) kunnen de effecten op de nitrificatiesnelheid worden berekend. Er moeten twee series mengsels worden bereid volgens de in punt 41 beschreven testopzet voor de EC_x of NOEC, maar in dit geval wordt aan elk mengsel van één serie ATU toegevoegd in een eindconcentratie van 11,6 mg/l; het is aangetoond dat deze concentratie de nitrificatie volledig remt in slib met concentraties gesuspendeerde vaste stoffen tot 3 000 mg/l (4). De zuurstofopnamesnelheden worden na de blootstellingsperiode gemeten; deze rechtstreeks gemeten waarden zijn representatief voor alleen de heterotrofe ademhaling en de verschillen tussen deze waarden en de corresponderende waarden voor totale ademhaling zijn representatief voor nitrificatie. De verschillende maten van remming worden vervolgens berekend.

Metingen

43. Na de blootstellingsperiode(n) moet een monster vanuit het eerste beluchtingsvat worden overgebracht naar de zuurstofelektrodecel (figuur 1 van aanhangsel 2), waarna de concentratie opgeloste zuurstof direct moet worden gemeten. Indien een systeem met meerdere elektroden beschikbaar is, kunnen de metingen gelijktijdig worden uitgevoerd. Het is belangrijk dat met dezelfde snelheid wordt geroerd (met behulp van een beklede magneet) als tijdens de kalibratie van de elektrode, om te zorgen dat de elektrode zo direct mogelijk op veranderingen van de zuurstofconcentratie reageert en de

▼M6

metingen in de meetcel regelmatig en reproduceerbaar zijn. Het zelfroerende mechanisme dat sommige zuurstofelektroden hebben, voldoet meestal goed. Tussen de metingen in moet de cel met water worden gespoeld. Het monster kan ook worden overgebracht in een BOD-fles (figuur 2 van aanhangsel 3) uitgerust met een magneetroerder. Er moet dan een zuurstofelektrode met een hulsadapter in de hals van de fles worden gestoken, en de magneetroerder moet worden aangezet. In beide gevallen wordt de concentratie opgeloste zuurstof continu gemeten en geregistreerd gedurende een bepaalde tijd, meestal 5 tot 10 minuten, of totdat de zuurstofconcentratie lager is geworden dan 2 mg/l. Als er metingen na langere blootstellingsperioden volgen, wordt de elektrode verwijderd en het mengsel teruggevoerd naar het beluchtingsvat, waar het beluchten en roeren moet worden voortgezet.

Verificatie van de concentratie teststof

44. Voor sommige doeleinden kan meting van de concentratie van de teststof in de testvaten nodig zijn. Let op het volgende: bij het gebruik van stamoplossingen van:

— slecht in water oplosbare stoffen,

— mengsels met componenten met een verschillende oplosbaarheid in water, of

— stoffen met een goede oplosbaarheid in water, maar waarbij de concentratie van de stamoplossing dicht bij de oplosbaarheidsgrens ligt,

is onbekend welke fractie is opgelost, en is dus niet bekend wat de werkelijke teststofconcentratie is die in de testvaten wordt gebracht. Om de blootstelling te definiëren is een analytische bepaling van de concentraties van de teststof in de testvaten nodig. Deze bepaling kan het gemakkelijkst worden uitgevoerd vóór de toevoeging van entmateriaal. Aangezien alleen opgeloste fracties in de vaten worden overgebracht, kunnen de gemeten concentraties zeer laag zijn.

45. Om tijdrovende en kostbare analyses te voorkomen wordt aanbevolen de teststof rechtstreeks in de testvaten af te wegen en voor latere berekeningen de afgewogen nominale beginconcentratie te gebruiken. Het is niet nodig om onderscheid te maken tussen opgeloste, niet-opgeloste en geadsorbeerde fracties van de teststof, omdat al deze fracties onder praktijkomstandigheden in een afvalwaterbehandelingsinstallatie op dezelfde wijze voorkomen en bovendien kunnen variëren naargelang van de samenstelling van het afvalwater. De test heeft tot doel een realistische niet-remmende concentratie te schatten en is niet geschikt om in detail te onderzoeken welke fracties bijdragen tot de remming van de organismen in actief slib. Ook adsorptieve stoffen moeten rechtstreeks in de testvaten worden afgewogen, en de vaten moeten gesilaniseerd worden om verliezen door adsorptie zo veel mogelijk te beperken.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Berekening van zuurstofopnamesnelheden

46. De zuurstofopnamesnelheden worden berekend uit de gemiddelden van de gemeten waarden, bijvoorbeeld in het lineaire deel van de grafieken van de zuurstofconcentratie als functie van de tijd, waarbij alleen zuurstofconcentraties tussen 2,0 mg/l en 7,0 mg/l worden gebruikt omdat hogere en lagere concentraties zelf van invloed kunnen zijn op de verbruikssnelheid. Soms is

▼**M6**

het onvermijdelijk en nodig om buiten dit concentratiegebied te komen, bijvoorbeeld wanneer de ademhaling sterk wordt onderdrukt en daardoor erg traag is, of als een bepaald actief slib een zeer snelle ademhaling vertoont. Dit is aanvaardbaar mits de betreffende delen van de opnamegrafiek recht zijn en de helling niet verandert bij het passeren vans de betreffende O_2-grenswaarde van 2,0 mg/l of 7,0 mg/l. Gebogen delen van de grafiek geven aan dat het meetsysteem aan het stabiliseren is of dat de opnamesnelheid aan het veranderen is en mogen niet voor de berekening van ademhalingssnelheden worden gebruikt. De zuurstofopnamesnelheid moet worden uitgedrukt in milligram per liter per uur (mg/l.uur) of in milligram per gram droog slib per uur (mg/g.uur). De zuurstofverbruikssnelheid R, in mg/l.uur, kan worden berekend of geïnterpoleerd uit het lineaire deel van de geregistreerde grafiek van de zuurstofafname volgens vergelijking 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

waarbij

Q_1 de zuurstofconcentratie aan het begin van het gekozen deel van de lineaire fase (mg/l);

Q_2 de zuurstofconcentratie aan het eind van het gekozen deel van de lineaire fase (mg/l);

Δ_t het tijdsinterval tussen deze twee metingen (minuten).

47. De specifieke ademhalingssnelheid (R_s) wordt uitgedrukt als de hoeveelheid zuurstof verbruikt per g drooggewicht slib per uur (mg/g.uur), volgens vergelijking 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

waarbij SS de concentratie gesuspendeerde vaste stoffen in het testmengsel is (g/l).

48. De verschillende indexen van R, die gecombineerd kunnen worden, zijn:

S specifieke snelheid

T totale ademhalingssnelheid

N snelheid ten gevolge van nitrificatie-ademhaling

N snelheid ten gevolge van heterotrofe ademhaling

A snelheid ten gevolge van abiotische processen

B snelheid op basis van blanco bepalingen (gemiddelde)

Berekening van de zuurstofopname door nitrificatie

49. Het verband tussen totale ademhaling (R_T), nitrificatie-ademhaling (R_N) en heterotrofe ademhaling (R_H) wordt beschreven door vergelijking 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

waarbij

R_N de snelheid van zuurstofopname door nitrificatie (mg/l.uur);

R_T de gemeten snelheid van zuurstofopname van de blanco controle (zonder ATU; F_B) (mg/l.uur);

R_T de gemeten snelheid van zuurstofopname van de blanco controle met toegevoegd ATU; F_N) (mg/l.uur).

▼M6

50. Dit verband geldt voor blanco waarden (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotische controles (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) en bepalingen met teststoffen (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/g.uur). Specifieke ademhalingssnelheden worden berekend uit:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Indien R_N niet-significant is (bv. < 5 % van R_T in blanco controles) in een oriënterende test, kan worden aangenomen dat de heterotrofe zuurstofopname gelijk is aan de totale opname en dat er geen nitrificatie plaatsvindt. Er zou actief slib uit een andere bron nodig zijn als de tests bedoeld zijn om de effecten op heterotrofe en nitrificerende micro-organismen te onderzoeken. Een definitieve test wordt uitgevoerd indien bij verschillende concentraties teststof onderdrukte zuurstofopnamesnelheden worden gevonden.

Berekening van de procentuele remming

52. De procentuele remming, I_T, van het totale zuurstofverbruik bij elke concentratie teststof, wordt beschreven door vergelijking 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. De procentuele remming van de heterotrofe zuurstofopname, I_H, bij elke concentratie teststof, wordt beschreven door vergelijking 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. De remming van de zuurstofopname door nitrificatie, I_N, bij elke concentratie, wordt beschreven door vergelijking 9:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. De procentuele remming van de zuurstofopname moet worden uitgezet tegen de logaritme van de concentratie teststof (remmingscurve, zie figuur 3 van aanhangsel 4). Voor elke beluchtingsperiode van 3 uur, en eventueel ook na 30 min, worden remmingscurven maakt. De concentratie teststof die de zuurstofopname met 50 % remt (EC_{50}) moet uit de grafiek worden berekend of geïnterpoleerd. Als de meetgegevens dat toelaten kunnen de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen voor de $EC_{50,}$ de helling van de curve en geschikte markerende waarden voor het begin (bv. EC_{10} of EC_{20}) en het eind (bv. EC_{80} of EC_{90}) van het remmende bereik, worden berekend of geïnterpoleerd.

56. Met het oog op de vaak waargenomen variabiliteit in de resultaten kan het in veel gevallen voldoende zijn om de resultaten tevens uit te drukken in orde van grootte, bijvoorbeeld:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l tot 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l tot 100 mg/l

EC_{50} < 100 mg/l

Interpretatie van de resultaten

EC_x

▼M6

57. EC_x-waarden en de bijbehorende 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen worden berekend met een geschikte statistische methode (bv. probitanalyse, logistische functie of Weibull-functie, getrimde Spearman-Karber-methode of eenvoudige interpolatie (11)). Een EC_x wordt verkregen door de waarde die correspondeert met x % van het controlegemiddelde in de gevonden vergelijking in te vullen. Voor berekening van de EC_{50} of een andere EC_x wordt regressieanalyse uitgevoerd met de gemiddelden voor elke dosisgroep (x).

Bepaling van de NOEC

58. Voor het bepalen van de NOEC door middel van statistische analyse moeten de metingen per vat (individuele vaten worden als replicaten beschouwd) worden gebruikt. Er dienen passende statistische methoden te worden gebruikt als beschreven in het OESO-document „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application" (11). Negatieve effecten van de teststof, in vergelijking met de controle, worden in het algemeen onderzocht met behulp van eenzijdige hypothesetoetsing met $p \leq 0{,}05$.

Testverslag

59. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof

— triviale naam, chemische naam, CAS-nummer, zuiverheid;

— fysisch-chemische eigenschappen van de teststof (bv. log K_{ow}, oplosbaarheid in water, dampspanning, Henry-constante (H) en beschikbare informatie over het lot van de chemische stof, bv. adsorptie aan actief slib).

Testsysteem

— herkomst, bedrijfsomstandigheden van de afvalwaterbehandelingsinstallatie en het influent, concentratie, voorbehandeling en instandhouding van het actief slib.

Testomstandigheden

— testemperatuur, pH tijdens de test en duur van de blootstellingsfase(n).

Resultaten

— het specifieke zuurstofverbruik van de controles (mg O2/(g slib × uur);

— alle meetresultaten, remmingscurve(n) en methode voor het berekenen van EC50,

— EC50, indien mogelijk met 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen, eventueel EC20, EC80; eventueel NOEC en de gebruikte statistische methoden, als de EC50 niet kan worden bepaald;

— resultaten voor remming van totale, en indien van toepassing, heterotrofe en nitrificatie-ademhaling;

— abiotische zuurstofopname in de fysisch-chemische controle (indien uitgevoerd);

— naam van de referentiestof en de resultaten met deze chemische stof;

— alle waarnemingen en alle afwijkingen van de standaardprocedure die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

LITERATUUR

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and 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. and 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, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, 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. and 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 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼M6

Aanhangsel 1

Definities

De volgende definities zijn voor deze testmethode relevant:

Chemische stof: een stof of een mengsel.

EC_x (concentratie voor x % effect): de concentratie die binnen een bepaalde blootstellingsperiode x % effect op testorganismen veroorzaakt (bv. 50 %) in vergelijking met een controle.. De EC_{50} is bijvoorbeeld de geschatte concentratie die gedurende een bepaalde blootstellingsperiode bij 50 % van een blootgestelde populatie een effect op een testeindpunt zal hebben.

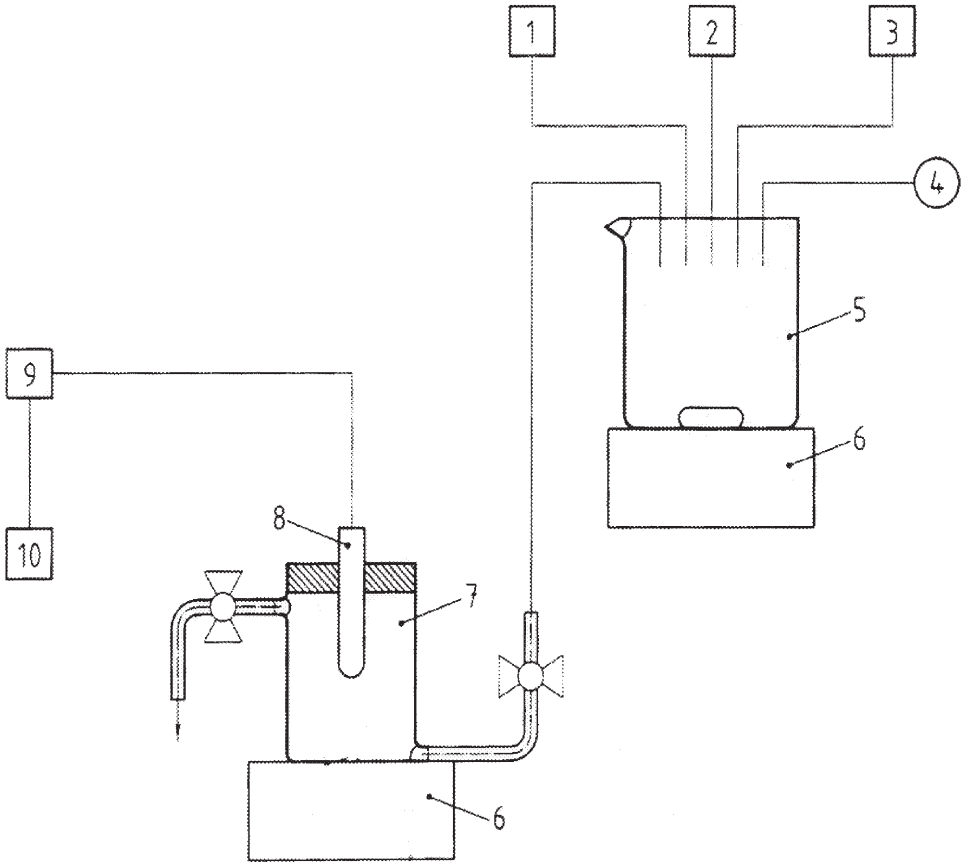
NOEC (concentratie zonder waargenomen effect): de concentratie teststof waarbij geen effect wordt waargenomen. In deze test heeft de concentratie die overeenkomt met de NOEC geen statistisch significant effect ($p < 0,05$) binnen een bepaalde blootstellingsperiode in vergelijking met de controle.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼**M6**

Aanhangsel 2

Figuur 1: **Voorbeeld van een meetsysteem**



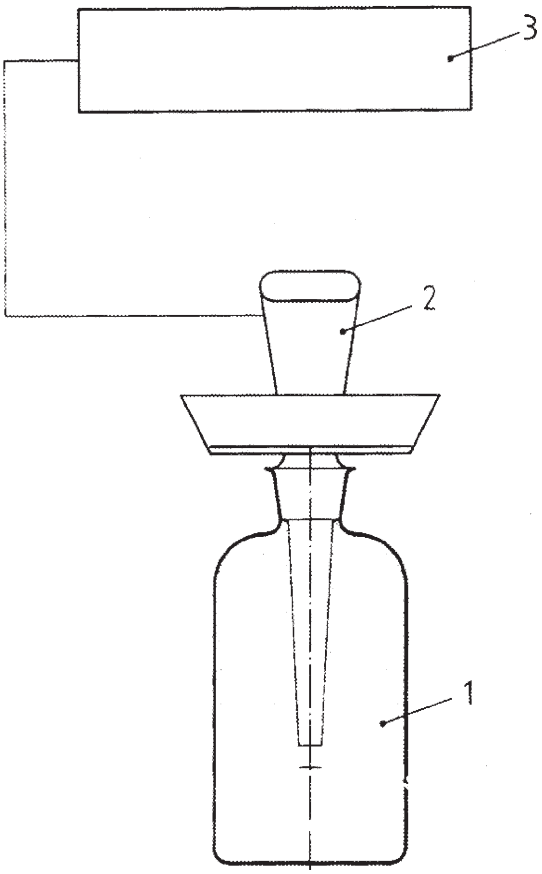
Legenda

1 actief slib	6 magneetroerder
2 kunstmatig medium	7 zuurstofmeetcel
3 teststof	8 zuurstofelektrode
4 lucht	9 zuurstofmeetinstrument
5 mengvat	10 recorder

▼**M6**

Aanhangsel 3

Figuur 2: **Voorbeeld van een meetsysteem met een BOD-fles**



Legenda

1 testvat

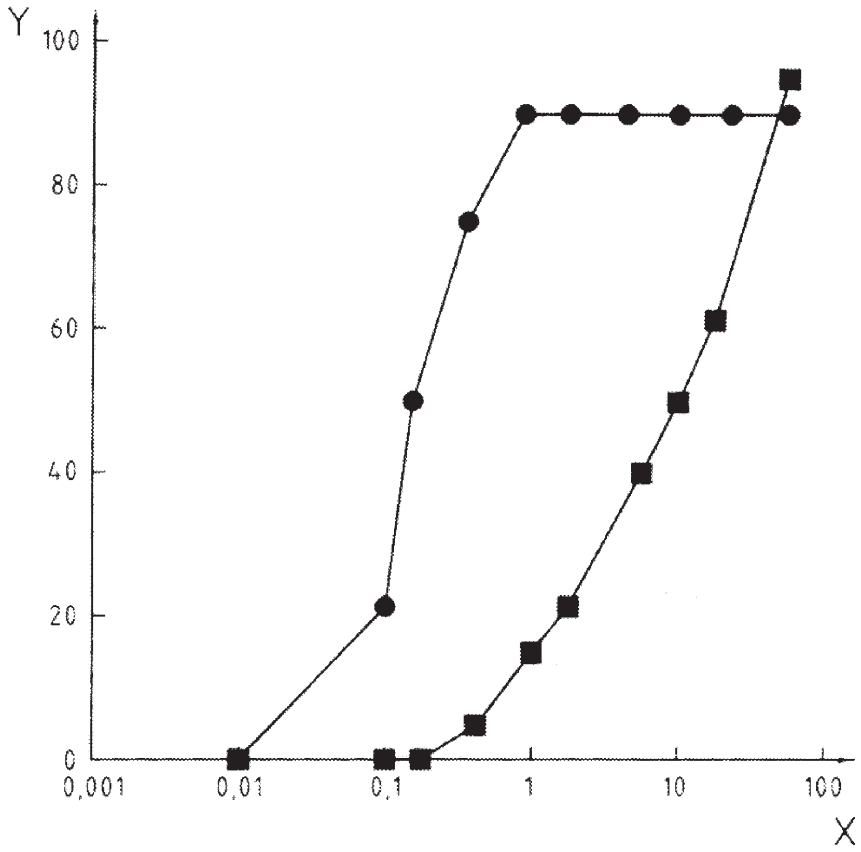
2 zuurstofelektrode

3 zuurstofmeetinstrument

▼**M6**

Aanhangsel 4

Figuur 3: **Voorbeeld van remmingscurven**



Legenda

X concentratie 3,5-dichloorfenol (mg/l)

Y remming (%)

■ remming van heterotrofe ademhaling bij gebruik van nitrificerend slib

● remming van nitrificatie bij gebruik van nitrificerend slib.

▼B

C.12. BIOLOGISCHE AFBRAAK

GEWIJZIGDE SCAS-TEST

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Doel van de methode is te bepalen in hoeverre in water oplosbare, niet-vluchtige organische verbindingen uiteindelijk biologisch afbreekbaar zijn, wanneer zij gedurende lange tijd worden blootgesteld aan relatief hoge concentraties micro-organismen. De micro-organismen worden gedurende deze tijd in leven gehouden door dagelijkse toevoeging van voorbezonken rioolwater. (Voor gebruik tijdens het weekend kan het rioolwater bij 4 ^{o}C worden bewaard. Tevens kan het synthetisch rioolwater van de OESO-bevestigende test worden gebruikt.)

Er kan fysisch-chemische adsorptie aan de gesuspendeerde deeltjes plaatsvinden; hiermee moet bij de interpretatie van de resultaten rekening worden gehouden (zie 3.2).

Vanwege de lange verblijftijd van de vloeibare fase (36 uur) en de tussentijdse toevoeging van nutriënten worden bij de test niet de omstandigheden in een rioolwaterzuiveringsinstallatie gesimuleerd. De resultaten met verschillende verbindingen wijzen erop dat de potentiële biologische afbraak bij de test hoog is.

De testomstandigheden zijn zeer gunstig voor de selectie en/of adaptatie van micro-organismen die de te testen verbinding kunnen afbreken. (De procedure kan ook worden gebruikt voor het verkrijgen van geadapteerde inocula voor andere tests).

Bij deze methode wordt de uiteindelijke biologische afbreekbaarheid van de te testen verbindingen beoordeeld door meting van de concentratie opgelost organisch koolstof (Concentration Dissolved Organic Carbon = DOC concentration). Het verdient de voorkeur de DOC-concentratie na aanzuren en zuiveren te bepalen en niet als het verschil van C_{totaal} — C_{anorg}.

Wanneer tegelijkertijd een specifieke analysemethode wordt gebruikt, kan tevens worden nagegaan in hoeverre primaire afbraak van de verbinding plaatsvindt (verdwijning van de oorspronkelijke chemische structuur).

De methode kan alleen worden toegepast bij die organische verbindingen die bij de in de test gebruikte concentratie:

— in water oplosbaar zijn (ten minste 20 mg opgelost organisch koolstof per liter),

— een verwaarloosbare dampspanning hebben,

— niet remmend werken op bacteriën,

— binnen het testsysteem niet in belangrijke mate worden geadsorbeerd,

— niet door schuimvorming uit de oplossing verdwijnen.

Het gehalte aan organisch koolstof van het testmateriaal moet worden bepaald.

▼B

Gegevens over de onderlinge verhoudingen van de belangrijkste bestanddelen van het testmateriaal zijn nuttig voor de interpretatie van de verkregen resultaten, met name als de gevonden waarden laag of zeer laag zijn.

Gegevens over de toxiciteit van de stof voor micro-organismen kunnen nuttig zijn voor de interpretatie van lage waarden en voor de keuze van geschikte testconcentraties.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

C_T = concentratie van de testverbinding uitgedrukt in organisch koolstof, zoals deze aan het begin van de beluchtingsperiode in het bezonken rioolwater aanwezig is of daaraan wordt toegevoegd (mg/l),

C_t = concentratie opgelost organisch koolstof in het supernatans van het testmengsel aan het eind van de beluchtingsperiode (mg/l),

C_c = concentratie opgelost organisch koolstof in het supernatans van het controlemengsel aan het eind van de beluchtingsperiode (mg/l).

Bij deze methode wordt biologische afbraak gedefinieerd als het verdwijnen van organisch koolstof. De biologische afbraak kan worden uitgedrukt als:

1. De verdwenen hoeveelheid als percentage van de per dag toegevoegde hoeveelheid verbinding (D_{da}):

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

D_{da} = afbraak/dagelijks toegevoegd („degradation/daily addinon”).

2. De verdwenen hoeveelheid als percentage van de aan het begin van elke dag aanwezige hoeveelheid verbinding

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ b)]$$

D_{ssd} = afbraak/begin dag aanwezig („degradation/substance start of day”),

de indexen i en (i + 1) verwijzen naar de dag van meting.

Vergelijking 2 a) wordt aanbevolen wanneer de DOC-concentratie in het effluent van dag tot dag verschilt, terwijl vergelijking 2 b) kan worden gebruikt wanneer de DOC-concentratie in het effluent van dag tot dag relatief constant blijft.

▼B

1.3. REFERENTIEVERBINDINGEN

In sommige gevallen kan bij het onderzoek van een nieuwe verbinding het gebruik van referentieverbindingen nuttig zijn; hier worden echter geen specifieke referentieverbindingen aanbevolen.

Er worden gegevens verschaft over een aantal verbindingen waarvoor een ringonderzoek is uitgevoerd (zie aanhangsel 1), voornamelijk om de methode zo nu en dan te kunnen ijken en om bij gebruik van een andere methode de resultaten te kunnen vergelijken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Actief slib uit een rioolwaterzuiveringsinstallatie wordt in een semicontinue actief-slibinstallatie (SCAS) gebracht. De te testen verbinding en voorbezonken rioolwater, worden toegevoegd en het mengsel wordt gedurende 23 uur belucht. Vervolgens wordt de beluchting gestopt, laat men het slib bezinken en wordt het supernatans verwijderd.

Het in de beluchtingskamer achtergebleven slib wordt vervolgens vermengd met een nieuwe hoeveelheid van de te testen verbinding en rioolwater en de cyclus wordt herhaald.

De biologische afbraak wordt gemeten door bepaling van de hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans. Deze waarde wordt vergeleken met de waarde die wordt verkregen voor het supernatans van controleslib, waaraan alleen voorbezonken rioolwater is toegevoegd.

Wanneer een specifieke analysemethode wordt gebruikt, kunnen ook veranderingen in de concentratie van de uitgangsstof ten gevolge van biologische afbraak worden gemeten (primaire biologische afbreekbaarheid).

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De reproduceerbaarheid van deze methode, gebaseerd op het verdwijnen van opgelost organisch koolstof, is nog niet aangetoond. (Wanneer rekening wordt gehouden met primaire biologische afbraak, worden zeer nauwkeurige gegevens verkregen voor materiaal dat in hoge mate afbreekbaar is.)

De gevoeligheid van de methode wordt grotendeels bepaald door de variatie in de blancobepaling en in mindere mate door de nauwkeurigheid van de bepaling van opgelost organisch koolstof en de concentratie van de te testen verbinding in de vloeistof aan het begin van elke cyclus.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTPROCEDURE

1.6.1. *Voorbereidingen*

Voor elke te testen verbinding en voor de blancobepalingen moet een voldoende aantal schone beluchtingskamers (de oorspronkelijke SCAS-testopstelling van 1,5 l kan tevens worden gebruikt) worden opgesteld, voorzien van luchtinlaatbuizen (figuur 1). De perslucht voor de testopstelling wordt gefiltreerd door een grof filter met watten, mag geen organisch koolstof bevatten en moet vooraf worden verzadigd met water om verliezen door verdamping zoveel mogelijk te voorkomen.

Uit een actief-slibinstallatie, waar voornamelijk huishoudelijk afvalwater wordt gereinigd, wordt een monster actief-slibsuspensie genomen, dat 1 tot 4 g gesuspendeerde stoffen/l bevat. Voor elke beluchtingskamer is ongeveer 150 ml van de gemengde vloeistof nodig.

▼B

Er worden voorraadoplossingen van de te testen verbinding in gedistilleerd water gemaakt; onder normale omstandigheden is een concentratie van 400 mg/l berekend als organisch koolstof nodig, zodat de concentratie van de te testen verbinding, als er geen biologische afbraak optreedt, aan het begin van elke beluchtingscyclus 20 mg koolstof/l is.

Hogere concentraties zijn mogelijk als de toxiciteit voor micro-organismen dit toelaat.

De concentratie organisch koolstof in de voorraadoplossingen wordt gemeten.

1.6.2. *Testomstandigheden*

De test dient te worden uitgevoerd bij 20 tot 25 °C.

Er wordt een hoge concentratie aerobe micro-organismen gebruikt (1 tot 4 % gesuspendeerd materiaal per liter) en de effectieve verblijfstijd is 36 uur. Het koolstofhoudend materiaal in het rioolwater wordt in hoge mate geoxideerd, onder normale omstandigheden binnen acht uur na het begin van elke beluchtingscyclus. Daarna is de ademhaling in het slib gedurende de rest van de beluchtingsperiode endogeen; gedurende deze periode is de te testen verbinding het enige beschikbare substraat, tenzij ook deze snel wordt gemetaboliseerd. Deze kenmerken, alsmede het feit dat het testmengsel bij gebruik van huishoudelijk afvalwater als medium elke dag opnieuw wordt geënt, leveren zeer gunstige omstandigheden op voor zowel adaptatie als een hoge mate van biologische afbraak.

1.6.3. *Uitvoering van de test*

Uit een actief-slibinstallatie voor in hoofdzaak huishoudelijk afvalwater of een laboratoriuminstallatie wordt een gemengd vloeistofmonster genomen en tot gebruik in het laboratorium aeroob bewaard. Elke beluchtingskamer (ook die voor de blancobepaling) wordt gevuld met 150 ml van de gemengde vloeistof (wanneer de oorspronkelijke SCAS-testapparatuur wordt gebruikt, moeten de genoemde volumes met 10 worden vermenigvuldigd) en de beluchting wordt gestart. Na 23 uur wordt de beluchting gestopt en laat men het slib gedurende 45 minuten bezinken. De kraan wordt opengedraaid en uit elke beluchtingskamer tapt men 100 ml van het supernatans af. Vlak voor gebruik wordt een hoeveelheid voorbezonken rioolwater genomen; 100 ml daarvan wordt toegevoegd aan het in elke beluchtingskamer achtergebleven slib. De beluchting wordt opnieuw gestart. In deze fase wordt geen testmateriaal toegevoegd; elke dag wordt uitsluitend huishoudelijk afvalwater in de beluchtingskamer gebracht, tot er na bezinken een helder supernatans wordt verkregen. Dit duurt meestal maximaal twee weken; de hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans aan het eind van elke beluchtingscyclus benadert dan een constante waarde.

Aan het eind van deze periode wordt het bezonken slib uit de verschillende kamers gemengd en wordt in elke kamer 50 ml van dit gemengde slib gebracht.

In het testvat voor de blanco-bepaling worden 95 ml voorbezonken rioolwater en 5 ml water gebracht. In de overige testvaten wordt 95 ml voorbezonken rioolwater en 5 ml van de voorraadoplossing (400 mg/l) van de te testen verbinding gebracht. De beluchting wordt opnieuw gestart en 23 uur later stopgezet. Vervolgens laat men het slib 45 minuten bezinken; het supernatans wordt afgetapt en de hoeveelheid opgeloste organische koolstof wordt bepaald.

Deze vul- en aftapprocedure wordt gedurende de hele test elke dag herhaald.

▼B

Het is wellicht nodig vóór het bezinken de wanden van de kamers schoon te maken, om te voorkomen dat zich hierop boven het vloeistofniveau vaste deeltjes gaan afzetten. Om onderlinge verontreiniging te voorkomen wordt voor elke kamer een afzonderlijke schraper of borstel gebruikt.

De hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans wordt bij voorkeur elke dag bepaald, hoewel het toelaatbaar is de analyse minder vaak uit te voeren. Vóór analyse wordt de vloeistof gefiltreerd door gewassen membraanfilters van 0,45 μm of gecentrifugeerd. Membraanfilters kunnen worden gebruikt, als vaststaat dat deze tijdens de filtratie geen koolstof afgeven en ook de testverbinding niet adsorberen. De temperatuur van het monster mag in de centrifuge niet hoger zijn dan 40 ^{o}C.

Er zijn geen vaste regels voor de tijdsduur van de test voor verbindingen die niet of nauwelijks biologisch worden afgebroken, maar de ervaring leert dat deze in het algemeen minimaal 12 weken en maximaal 26 weken moet zijn.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De hoeveelheid opgelost organisch koolstof in het supernatans bij de testbepalingen en de blancobepalingen worden tegen de tijd uitgezet.

Naarmate de biologische afbraak ten einde loopt, zullen de waarden voor de testbepalingen in de buurt komen te liggen van de blancowaarden. Wanneer het verschil tussen de twee waarden bij drie opeenvolgende metingen constant blijft, worden er nog zoveel metingen uitgevoerd dat statistische behandeling van de gegevens mogelijk is en wordt het percentage van de te testen verbinding dat biologisch wordt afgebroken berekend (D_{da} of D_{ssd}, zie 1.2).

3. RAPPORTAGE

3.1. TESTRAPPORT

Het testrapport moet, indien mogelijk, bevatten:

— alle gegevens over de aard van het rioolwater en de gebruikte proefopstelling en de resultaten van de bepalingen met de te testen verbinding en met de eventueel gebruikte referentieverbinding en de resultaten van de blancobepalingen,

— de temperatuur,

— de afbraakcurve met een beschrijving en de berekeningswijze (zie 1.2),

— datum en plaats van monsterneming van het actief slib en het rioolwater en gegevens over adaptatie daarvan, concentratie, enz.,

— wetenschappelijke motivering voor veranderingen in de testprocedure,

— handtekening en datum.

▼B

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Aangezien de via deze methode te testen verbinding niet gemakkelijk biologisch afbreekbaar zal zijn, zal een verlaging van de DOC-concentratie uitsluitend ten gevolge van biologische afbraak onder normale omstandigheden geleidelijk plaatsvinden in de loop van dagen of weken, behalve in gevallen waar een plotselinge adaptatie optreedt, hetgeen blijkt uit een abrupte concentratieverlaging na enkele weken.

Fysisch-chemische adsorptie kan echter soms een belangrijke rol spelen; in dat geval verdwijnt het toegevoegde DOC reeds in het begin volledig of gedeeltelijk. Wat er vervolgens gebeurt, is afhankelijk van factoren als de mate van adsorptie en de concentratie van gesuspendeerde deeltjes in het afgetapte effluent. Meestal is het verschil in DOC-concentratie in het supernatans tussen de blancobepaling en de testbepaling aanvankelijk gering en neemt dit geleidelijk toe tot een nieuwe waarde die gedurende de rest van het experiment constant blijft, tenzij adaptatie optreedt.

Om onderscheid te kunnen maken tussen biologische afbraak (of gedeeltelijke biologische afbraak) en adsorptie moeten andere tests worden uitgevoerd. Dit kan op een aantal manieren gebeuren, maar het meest ondubbelzinnig is het supernatans of het slib als inoculum te gebruiken bij een elementair (bij voorkeur respirometrisch) experiment.

Testverbindingen, waarbij in dit experiment een grote verlaging van de DOC-concentratie optreedt, welke verlaging niet wordt veroorzaakt door adsorptie, moeten worden beschouwd als eventueel biologisch afbreekbaar. Een gedeeltelijke, niet door adsorptie veroorzaakte verlaging wijst erop dat de verbinding althans enigermate biologisch wordt afgebroken.

Een geringe of in het geheel geen verlaging van de DOC-concentratie kan worden veroorzaakt door inhibitie van de micro-organismen door de te testen verbinding; dit kan ook blijken uit afbraak en verlies van slib, waarbij een troebel supernatans ontstaat. In dit geval moet de test worden herhaald met een lagere concentratie van de te testen verbinding.

Door het gebruik van specifieke analysemethoden of van met ^{14}C gelabelde testverbindingen kan een grotere gevoeligheid worden bereikt. In het geval van ^{14}C-testverbindingen wordt de biologische afbraak aangetoond door het ontstaan van $^{14}C0_2$.

Wanneer er bij de resultaten ook gegevens worden vermeld over primaire biologische afbraak, moet, indien mogelijk, worden verklaard door welke verandering in de chemische structuur een geringere hoeveelheid van de oorspronkelijke testverbinding wordt aangetroffen.

De bruikbaarheid van de analysemethode moet worden aangetoond en de resultaten van de blancobepaling moeten worden vermeld.

4. **REFERENTIES**

(1) OESO, Parijs, 1981, *Testrichtlijn 302 A,* Besluit C(81) 30 def. van de Raad.

▼B

Aanhangsel 1

SCAS-test: voorbeeld van resultaten

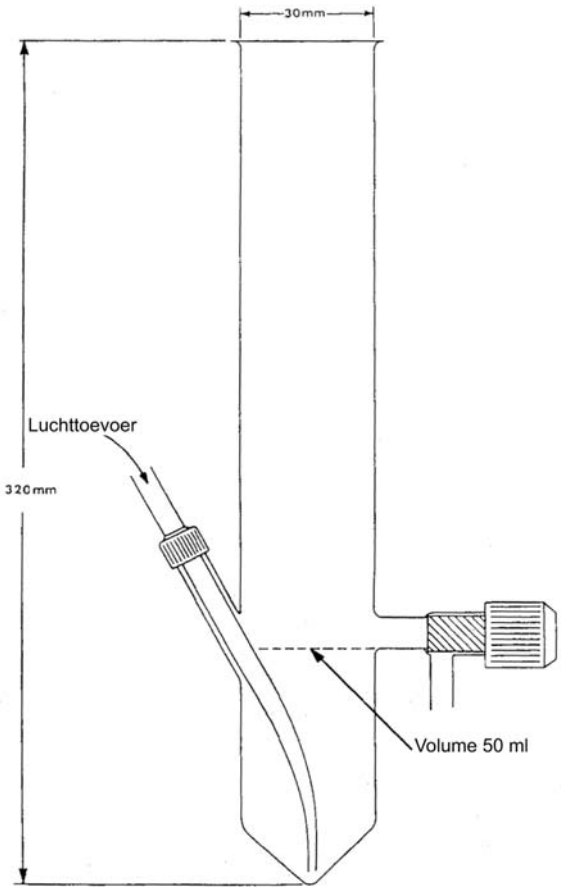
Chemische stof	C_t (mg/l)	C_t — C_c (mg/l)	Percentage biodegradatie, D_{da}	Testduur (dagen)
4-acetyl aminobenzeen sulfonaat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropyleenbenzeen sulfonaat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Diëthyleenglycol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentaan tetracarboxylaat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Aanhangsel 2

Voorbeeld van testopstelling

Figure 1



▼M7

C.13. BIOACCUMULATIE IN VISSEN: BLOOTSTELLING VIA WATER EN VOER

INLEIDING

Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 305 (2012) van de OESO. Het belangrijkste doel van deze herziening van de testmethode is tweeledig. De herziening is in de eerste plaats bedoeld om een test voor bioaccumulatie via het voer ([1]) vast te stellen die geschikt is om het bioaccumulatiegedrag van stoffen met een zeer lage oplosbaarheid in water te bepalen. Op de tweede plaats is zij bedoeld om een testmethode op te zetten die, wanneer van toepassing, met het oog op het dierenwelzijn minder vissen gebruikt en kosteneffectiever is.

In de jaren sinds de vaststelling van de geconsolideerde testmethode C.13 (1) zijn talrijke stoffen getest en is aanzienlijke ervaring opgedaan door zowel laboratoria als regelgevende autoriteiten. Dit heeft geleid tot de overtuiging dat de test minder complex kan worden gemaakt als aan specifieke criteria wordt voldaan (vgl. punt 88) en dat een getrapte aanpak mogelijk is. De ervaring leert ook dat biologische factoren zoals groei en vetgehalte van vissen grote invloed op de resultaten kunnen hebben en dat hiermee mogelijk rekening moet worden gehouden. Bovendien wordt erkend dat het testen van stoffen die zeer slecht oplosbaar zijn in water, technisch mogelijk niet haalbaar is. Voor stoffen met een zeer lage oplosbaarheid in water in het aquatische milieu is blootstelling via het water mogelijk ook van beperkt belang vergeleken met toediening via het voer. Dit heeft ertoe geleid dat een testmethode is ontwikkeld waarin vissen worden blootgesteld via hun voer (vgl. punten 7-14 en punt 97 en verder). Een validering (ringtest) van de test met blootstelling via het voer werd uitgevoerd in 2010 (51).

De belangrijkste wijzigingen zijn onder meer:

— Het testen van slechts één testconcentratie kan voldoende worden geacht wanneer het waarschijnlijk is dat de bioconcentratiefactor (BCF) onafhankelijk is van de testconcentratie.

— Een beperkte testopzet met blootstelling via het water waarin een kleiner aantal monsternamepunten mogelijk is, als aan bepaalde criteria is voldaan.

— Het vetgehalte van vissen moet worden gemeten, zodat de BCF kan worden uitgedrukt op basis van een vetgehalte van 5 %.

— Grotere nadruk op schatting van de kinetische BCF (indien mogelijk) in aanvulling op schatting van de BCF in stationaire toestand.

— Voor bepaalde groepen stoffen zal een test voor blootstelling via het voer worden voorgesteld, in gevallen waarin dit geschikter wordt geacht dan een test voor blootstelling via het water.

— Het gewicht van de vissen moet worden gemeten, zodat BCF_k kan worden gecorrigeerd voor groeiverdunning.

Vóór de uitvoering van een van de bioaccumulatietests moet de volgende informatie over de teststof bekend zijn:

a) Gevoeligheid van de analysetechniek voor het meten van concentraties van zowel de teststof als mogelijke metabolieten daarvan in weefsel en water of voer (vgl. punt 65);

b) Oplosbaarheid in water [TM A.6; (2)]; om een betrouwbare waarde te verkrijgen, moet deze worden bepaald volgens een methode die geschikt is voor het (geschatte) bereik van de oplosbaarheid. Voor hydrofobe stoffen zal dit gewoonlijk de kolomelutiemethode zijn;

([1]) Zie aanhangsel 1 voor definities en eenheden.

▼M7

c) Verdelingscoëfficiënt n-octanol/water, K_{OW} ([1]) [TM's A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; of andere passende informatie over het verdelingsgedrag (bv. sorptie aan lipiden, K_{OC}); om een betrouwbare waarde te verkrijgen, moet deze worden bepaald conform een methode die geschikt is voor het (geschatte) bereik van K_{OW}. Voor hydrofobe stoffen zal dit gewoonlijk de langzaam-roerenmethode zijn [TM A.23 (6)];

d) Stabiliteit van de stof in water (hydrolyse [TM C.7 (7)]);

e) Stabiliteit van de stof in voer (in het bijzonder wanneer wordt gekozen voor een test met blootstelling via het voer);

f) Informatie over fotochemische omzetting die relevant is voor de belichtingsomstandigheden in de test (8);

g) Oppervlaktespanning (d.w.z. voor stoffen waarvoor log K_{OW} niet kan worden bepaald) [TM A.5 (9)];

h) Dampspanning [TM A.4 (10)];

i) Alle informatie over biotische of abiotische afbreking in water, zoals (maar niet beperkt tot) gemakkelijke biologische afbreekbaarheid [delen II tot en met VII van TM C.4(11), TM C.29 (12)], indien van toepassing;

j) Informatie over metabolieten: structuur, log K_{OW}, vorming en afbreekbaarheid, indien van toepassing;

k) De dissociatieconstante van een zuur (pK_a) voor stoffen die kunnen ioniseren. Indien nodig moet de pH van het testwater worden aangepast om te verzekeren dat de stof in de test de niet-geïoniseerde vorm heeft, indien deze verenigbaar is met de vissoorten.

Ongeacht de gekozen blootstellingsmethode of het gekozen bemonsteringsschema, betreft deze methode een procedure voor de bepaling van het bioconcentratiegedrag van stoffen in vissen. Hoewel een doorstroomtest veruit te verkiezen is, mag eventueel ook in semistatische omstandigheden worden gewerkt, voorzover aan de validiteitscriteria wordt voldaan (vgl. punten 24 en 113). Bij blootstelling via het voer hoeft het doorstroomsysteem de concentraties van de teststof in het water niet noodzakelijk te handhaven, maar helpt het wel om adequate opgeloste zuurstofconcentraties in stand te houden, schoon water te verzekeren en invloeden van bijvoorbeeld excretieproducten te verwijderen.

Ongeacht de gekozen testmethode, omvat de beschrijving van deze testmethode alle bijzonderheden die nodig zijn om de test te kunnen uitvoeren; er blijft voldoende ruimte om de proefopzet aan te passen aan de omstandigheden in het betrokken laboratorium en aan de specifieke karakteristieken van de teststof. De test voor blootstelling via het water is het meest geschikt voor toepassing op stabiele organische stoffen met een log K_{OW}-waarde tussen 1,5 en 6,0 (13), maar mag niettemin ook worden toegepast op sterk hydrofobe stoffen (met een log $K_{OW} > 6,0$), als een stabiele en volledig opgeloste concentratie van de teststof in water kan worden aangetoond. Als een stabiele concentratie van de teststof in water niet kan worden aangetoond, is een onderzoek in water niet passend en moet de stof bij vissen dus via het voer worden getest (hoewel de interpretatie en het gebruik van de resultaten van de test via het voer kunnen afhangen van het regelgevingskader). Preliminaire schattingen van de bioconcentratiefactor (BCF, soms ook genoteerd als K_B) voor organische stoffen met log K_{OW}-waarden tot ongeveer 9,0 kunnen worden verkregen door toepassing van de vergelijking van Bintein et al. (14). De preliminaire schatting van de bioconcentratiefactor voor

([1]) Soms aangeduid als P_{OW}; bepaald door een schudflesmethode in TM A.8 (4), een HPLC-methode in TM A.24 (5) en een langzaam-roerenmethode in TM A.23 (6). Voor de bepaling van log K_{OW} wordt soms de generatorkolomtechniek gebruikt. Er is een beperkt aantal studies beschikbaar dat gebruikmaakt van deze techniek, voornamelijk voor gechloreerde bifenylen en dibenzodioxinen (bv. Li & Doucette, 1993) (3). Voor stoffen die kunnen ioniseren, moet log K_{OW} betrekking hebben op de niet-geïoniseerde vorm.

▼M7

zulke sterk hydrofobe stoffen kan hoger zijn dan de met behulp van laboratoriumexperimenten bepaalde bioconcentratiefactor in de stationaire situatie (BCF_{SS}), vooral wanneer voor de preliminaire schatting een eenvoudig lineair model wordt gebruikt. De parameters die het bioaccumulatiepotentieel karakteriseren, omvatten de opnamesnelheidsconstante (k_1), de eliminatiesnelheidsconstanten met inbegrip van de depuratiesnelheidsconstante (k_2), de bioconcentratiefactor in de stationaire situatie (BCF_{SS}), de kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) en de biomagnificatiefactor (BMF) voor opnamen uit het voedsel ([1]).

Radioactief gemerkte teststoffen kunnen de analyse van de water-, voedsel- en vismonsters vergemakkelijken en kunnen worden gebruikt om te bepalen of het noodzakelijk is eventuele metabolieten te identificeren en te kwantificeren. Indien uitsluitend de totale hoeveelheid radioactieve residuen wordt gemeten (bv. door verbranding of weefselsolubilisatie), heeft de BCF of BMF betrekking op de totale hoeveelheid van de oorspronkelijke stof, de eventueel achterblijvende metabolieten daarvan en de geassimileerde koolstof. De BCF- en BMF-waarden op basis van de totale hoeveelheid radioactieve residuen zijn derhalve mogelijk niet zonder meer vergelijkbaar met BCF- en BMF-waarden die worden verkregen door een specifieke chemische bepaling van uitsluitend de oorspronkelijke stof. Scheidingsprocedures, zoals TLC, HPLC of GC ([2]), kunnen worden gebruikt vóór de analyse in studies met radioactieve markers om de BCF- en BMF-waarden te bepalen op basis van de oorspronkelijke stof. Wanneer scheidingstechnieken worden toegepast, moeten de oorspronkelijke stof en de relevante metabolieten daarvan worden geïdentificeerd en gekwantificeerd ([3]) (vgl. punt 65) als de BCF- en BMF-waarden worden gebaseerd op de concentratie van de oorspronkelijke stof in vissen en niet op de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen. Ook kan door analyse en identificatie van de residuen in de weefsels een studie van het metabolisme van de vissen of in-vivoverdelingsonderzoek worden gecombineerd met een bioaccumulatieonderzoek. De kans op metabolisme kan met geschikte instrumenten (bv. QSAR-toolbox van de OESO (15) en particuliere QSAR-programma's) worden voorspeld.

Het besluit om een test met blootstelling via het water of via het voer uit te voeren en daarvoor een bepaalde opzet te gebruiken moet worden gebaseerd op de factoren in punt 3 en op het toepasselijke regelgevingskader. Voor bijvoorbeeld stoffen die een hoge log K_{OW} hebben maar toch nog een waarneembare oplosbaarheid in water hebben met betrekking tot de gevoeligheid van de beschikbare analysetechnieken, moet in eerste instantie een test met blootstelling via het water worden overwogen. Het is echter mogelijk dat de informatie over de oplosbaarheid in water niet afdoend is voor deze hydrofobe typen stoffen, en er moet dus worden onderzocht of stabiele, meetbare opgeloste waterige concentraties kunnen worden bereid (stabiele emulsies zijn niet toegestaan) die toepasbaar zijn voor een onderzoek naar blootstelling via het water, alvorens een besluit wordt genomen over de te gebruiken testmethode (16). Het is niet mogelijk exacte bindende richtsnoeren voor de te gebruiken methode te geven op basis van drempelcriteria voor de oplosbaarheid in water en de verdelingscoëfficiënt octanol/water, omdat andere factoren (analystechnieken, afbraak, adsorptie enz.) om de hierboven genoemde redenen een aanmerkelijke invloed kunnen hebben op de toepasbaarheid van een methode. Een log K_{OW}-waarde van meer dan 5 en een oplosbaarheid in water van minder dan ~0,01 tot 0,1 mg/l markeren het bereik van stoffen waarbij het testen door blootstelling via het water steeds moeilijker kan worden.

Er moet ook rekening worden gehouden met andere factoren die van invloed kunnen zijn op de keuze van de test, met inbegrip van het potentieel van de stof om zich aan testbakken en apparaten te binden, zijn stabiliteit in waterige oplossingen versus zijn stabiliteit in visvoer (17) (18) enz.

Informatie over dergelijke praktische aspecten is mogelijk beschikbaar uit andere voltooide studies in water. Nadere informatie over de beoordeling van aspecten die verband houden met de uitvoering van bioaccumulatiestudies is te vinden in de literatuur (bv. (19)).

Voor stoffen waarvan de oplosbaarheid of de instandhouding van de concentraties in water alsmede de bepaling van deze concentraties geen belemmering

([1]) Zie aanhangsel 1 voor definities en eenheden.

([2]) TLC: dunnelaagchromatografie; HPLC: hogedrukvloeistofchromatografie; GC: gaschromatografie

([3]) In sommige regelgevingskaders is bepaling van de metabolieten verplicht wanneer aan bepaalde voorwaarden wordt voldaan (vgl. punt 65).

▼M7

vormen voor de verwezenlijking van een testmethode met blootstelling via het water, geniet deze methode de voorkeur om het bioconcentratiegedrag van de stof te bepalen. Er moet in alle gevallen worden nagegaan dat de via het water toe te dienen concentraties binnen het oplosbaarheidbereik in water in het testmedium liggen. Er kunnen verschillende methoden worden gebruikt om stabiele concentraties van de opgeloste teststof te handhaven, zoals het gebruik van voorraadoplossingen of passieve doseringssystemen (bv. de kolomelutiemethode), zolang kan worden aangetoond dat de concentraties stabiel kunnen worden gehouden en de testmedia niet worden gewijzigd ten opzichte van de in punt 27 aanbevolen testmedia.

Voor sterk hydrofobe stoffen (log K_{OW} > 5 en een oplosbaarheid van minder dan ~0,01-0,1 mg/l) kan testen met blootstelling via het water steeds moeilijker worden. Redenen voor beperkingen kunnen zijn dat de concentratie in het water niet op een niveau kan worden gehouden dat voldoende constant wordt geacht (bv. door sorptie aan het glas van blootstellingsvaten of door snelle opname door de vissen) of dat de toe te passen concentraties in het water zo laag zijn dat ze in hetzelfde bereik liggen als de analytische bepaalbaarheidsgrens of zelfs onder deze grens liggen ([1]). Voor deze zeer hydrofobe stoffen wordt de test met blootstelling via het voer aangeraden, mits de test consistent is met het toepasselijke regelgevingskader en de vereiste risicobeoordelingen.

Voor oppervlakteactieve stoffen moet worden nagedacht over de vraag of de bioconcentratietest via het water haalbaar is, gezien de eigenschappen van de stoffen; anders is onderzoek via het voer waarschijnlijk geschikter. Oppervlakteactieve stoffen zijn stoffen die de grensvlakspanning tussen twee vloeistoffen verlagen. Hun amfifiele karakter (d.w.z. ze bevatten zowel een hydrofiel als een hydrofoob deel) zorgt ervoor dat ze zich ophopen op grensvlakken zoals het grensvlak tussen water en lucht, het grensvlak tussen water en voer, en glazen wanden, wat de bepaling van hun concentratie in water hindert.

De test via het voer kan voor complexe mengsels met componenten met verschillende oplosbaarheidsgrenzen in water enkele blootstellingsaspecten omzeilen, in de zin dat een vergelijkbare blootstelling aan alle componenten van het mengsel waarschijnlijker is dan bij blootstelling via het water (vgl. (20)).

Er zij opgemerkt dat de benadering met blootstelling via het voer een biomagnificatiefactor (BMF) voor opnamen uit het voedsel oplevert in plaats van een bioconcentratiefactor (BCF) ([2]). Er zijn benaderingen beschikbaar om een kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) te schatten op basis van gegevens die in het onderzoek via het voer zijn gegenereerd (zoals besproken in aanhangsel 8), maar deze benaderingen moeten met voorzichtigheid worden gebruikt. In het algemeen veronderstellen deze benaderingen eersteordekinetiek en zijn zij uitsluitend toepasbaar op bepaalde groepen van verbindingen. Het is onwaarschijnlijk dat deze benaderingen kunnen worden toegepast voor oppervlakteactieve stoffen (zie punt 12).

Een beperkte testopzet met blootstelling via het water met minder monsternamepunten om het aantal dieren en/of middelen te verlagen (vgl. punt 83 en verder) mag alleen worden toegepast op stoffen waarvoor er geen reden is te verwachten dat opname en depuratie ongeveer eersteordekinetiek zullen volgen (d.w.z. in het algemeen niet-geïoniseerde organische stoffen, vgl. punt 88).

C.13 — I: **BIOCONCENTRATIETEST MET VISSEN MET BLOOTSTELLING VIA HET WATER**

PRINCIPE VAN DE TEST

De test bestaat uit twee fasen: de blootstellingsfase (opnamefase) en de daaropvolgende depuratiefase. Gedurende de opnamefase wordt een groep vissen van dezelfde soort blootgesteld aan een of meer concentraties van de teststof, afhankelijk van de eigenschappen van de teststof (vgl. punt 49). Met de overbrenging

([1]) In het algemeen moeten de gemeten concentraties in water in de opnamefase ten minste een orde van grootte hoger zijn dan de bepaalbaarheidsgrens, zodat in de depuratiefase van het onderzoek meer dan één halvering van de lichaamsconcentratie kan worden gemeten.

([2]) Zie aanhangsel 1 voor definities en eenheden.

▼M7

van de vissen naar een medium dat de teststof niet bevat, wordt de depuratiefase ingeluid. Een depuratiefase is altijd vereist, tenzij de opname van de stof tijdens de opnamefase niet significant was. De concentratie van de teststof in of op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) wordt systematisch gedocumenteerd gedurende de beide fasen van de test. Naast de blootgestelde groep, wordt ook een controlegroep vissen gehouden onder — afgezien van de afwezigheid van de teststof — identieke omstandigheden. Op die manier kunnen de schadelijke effecten die eventueel in de bioconcentratietest worden waargenomen, worden gerelateerd aan waarnemingen op een passende controlegroep en kan een „nul-effectbepaling" van de concentraties van de teststof worden uitgevoerd. ([1])

In de test met blootstelling via het water duurt de opnamefase gewoonlijk 28 dagen. De fase kan worden verlengd, indien nodig (vgl. punt 18), of worden verkort als wordt aangetoond dat de stationaire toestand reeds eerder is bereikt (zie aanhangsel 1, Definities en eenheden). Een raming van de duur van de opnamefase en de tijd die nodig is om de stationaire toestand (dynamisch evenwicht) te bereiken, kan worden verkregen met behulp van de vergelijkingen in aanhangsel 5. De depuratiefase begint vervolgens wanneer de vissen niet langer worden blootgesteld aan de teststof, doordat ze worden overgebracht naar een schone bak die hetzelfde medium, maar geen teststof bevat. Zo mogelijk wordt de bioconcentratiefactor bij voorkeur berekend zowel als de verhouding van de concentratie in de vissen (C_f) en in het water (C_w) in de stationaire toestand (BCF_{SS}; zie aanhangsel 1, Definities en eenheden) en als kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K; zie aanhangsel 1, Definities en eenheden), d.w.z. als de verhouding van de snelheidsconstanten k_1 (opname) en k_2 (depuratie), uitgaande van een eersteordekinetiek ([2]).

Indien na 28 dagen nog geen stationaire toestand is bereikt, wordt de BCF berekend met behulp van de kinetische benadering (vgl. punt 38) of kan de opnamefase worden verlengd. Als dit leidt tot een onpraktisch lange opnamefase voordat de stationaire toestand wordt bereikt (vgl. punten 37 en 38, aanhangsel 5), wordt de kinetische benadering verkozen. Als alternatief kan voor zeer hydrofobe stoffen worden overwogen een onderzoek via het voer uit te voeren ([3]), mits de test via het voer verenigbaar is met het toepasselijke regelgevingskader.

De opnamesnelheidsconstante, de depuratie- (eliminatie-)snelheidsconstante (of -constanten, indien een complexer model vereist is), de bioconcentratiefactor (stationaire toestand of kinetisch) en, zo mogelijk, een betrouwbaarheidsinterval voor elk van deze parameters worden berekend aan de hand van het model dat de gemeten concentraties van de teststof in de vissen en het water het beste beschrijft (vgl. aanhangsel 5).

De toename van de massa van de vissen tijdens de test zal leiden tot een afname van de concentratie van de teststof in groeiende vissen (zogenoemde groeiverdunning) en dus zal de kinetische BCF worden onderschat als deze niet voor groei wordt gecorrigeerd (vgl. punten 72 en 73).

De BCF wordt berekend aan de hand van de totale concentratie in de vis (d.w.z. per totaal versgewicht van de vis). Voor bepaalde doeleinden mogen evenwel ook specifieke weefsels of organen (bijvoorbeeld spieren, lever) worden gebruikt als de vissen groot genoeg zijn of als zij kunnen worden opgedeeld in een eetbaar („filet") en een niet-eetbaar („ingewanden") gedeelte. Aangezien er voor veel organische stoffen een duidelijk verband bestaat tussen neiging tot bioconcentratie en hydrofobiciteit, bestaat er een overeenkomstig verband tussen het vetgehalte van de in de proeven gebruikte vissen en de waargenomen bioconcentratie van die stoffen. Om deze bron van variatie in de testresultaten voor

([1]) De meeste teststoffen worden in het ideale geval niet aangetoond in het controlewater. Nuleffectbepalingen van de concentraties van de teststof mogen alleen relevant zijn voor van nature voorkomende materialen (bv. sommige metalen) en stoffen die algemeen voorkomen in het milieu.

([2]) Indien het proces duidelijk geen eersteordekinetiek vertoont, moeten complexere modellen worden gebruikt (zie de referenties in aanhangsel 5) en moet het advies van een biostatisticus worden ingewonnen.

([3]) De opname kan beperkt zijn door lage blootstellingsconcentraties vanwege een lage oplosbaarheid in water in de bioconcentratietest, terwijl in de test met blootstelling via het voer veel hogere blootstellingsconcentraties kunnen worden bereikt.

▼M7

teststoffen met een hoge lipofiliciteit (d.w.z. met log K_{OW} > 3) te verkleinen, dient de mate van bioconcentratie daarom niet alleen rechtstreeks te worden bepaald uit de studie, maar ook te worden uitgedrukt als bioconcentratie genormaliseerd naar een vis met een vetgehalte van 5 % (gebaseerd op het versgewicht van het hele lichaam). Dit is nodig om een basis te krijgen waarop resultaten voor verschillende stoffen en/of soorten proefdieren met elkaar kunnen worden vergeleken. Het cijfer van 5 % voor het vetgehalte wordt veel gebruikt, omdat dit het gemiddelde vetgehalte is van de vissen die gewoonlijk in deze testmethode worden gebruikt (21).

GEGEVENS BETREFFENDE DE TESTSTOF

Behalve de eigenschappen van de teststof die zijn genoemd in de Inleiding (punt 3), zijn eveneens vereist gegevens over de toxiciteit van de teststof voor de in de test gebruikte vissoort, bij voorkeur in de vorm van de asymptotische LC_{50} (d.w.z. tijdonafhankelijk) en/of geraamde toxiciteit van de teststof uit langlopende tests met vissen (bv. TM's C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Er dient een passende analytische methode, met bekende nauwkeurigheid, precisie en gevoeligheid, voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen en in het biologisch materiaal beschikbaar te zijn, evenals een protocol voor de toebereiding en de opslag van de monsters. De analytische bepaalbaarheidsgrens van de teststof, zowel in water als in visweefsel, dient eveneens bekend te zijn. Wanneer een radioactief gemerkte teststof wordt gebruikt, dient deze van de hoogst mogelijke zuiverheid te zijn (bv. bij voorkeur > 98 %) en dient de procentuele radioactiviteit die in verband wordt gebracht met onzuiverheden bekend te zijn.

GELDIGHEID VAN DE TEST

Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig:

de schommelingen in de temperatuur van het water zijn minder dan ± 2 °C, omdat grote schommelingen van invloed kunnen zijn op biologische parameters die relevant zijn voor de opname en depuratie, en bovendien stress veroorzaken bij de dieren;

de concentratie van de opgeloste zuurstof mag nooit minder bedragen dan 60 % van het verzadigingsniveau;

de concentratie van de teststof in de bakken is gedurende de opnamefase nooit meer dan 20 % hoger of lager dan het gemiddelde van de gemeten waarden;

de concentratie van de teststof is lager dan zijn oplosbaarheidsgrens in water, rekening houdend met het mogelijke effect van het testwater op de effectieve oplosbaarheid ([1]);

de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren (ziekte) dienen aan het einde van de test zowel in de behandelde groep als in de controlegroep minder dan 10 % te bedragen; indien de test gedurende verscheidene weken of maanden wordt voortgezet, mogen de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren in elk van beide groepen vissen niet meer bedragen dan 5 % per maand en 30 % in het totaal. Substantiële verschillen in gemiddelde groei tussen de test- en controlegroep van bemonsterde vissen kunnen wijzen op een toxisch effect van de teststof.

REFERENTIESTOFFEN

Het gebruik van referentiestoffen waarvan het bioconcentratiegedrag bekend is en het metabolisme laag is, kan in sommige gevallen nuttig zijn om de experimentele procedure te toetsen (bv. wanneer een laboratorium geen eerdere ervaring met de test heeft of wanneer de experimentele omstandigheden zijn gewijzigd).

([1]) Voor stoffen die uit meerdere componenten bestaan, UVCB's en mengsels moet bij de bepaling van de passende blootstellingsconcentraties rekening worden gehouden met de oplosbaarheid in water van elk van de relevante bestanddelen.

▼M7

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

Voor alle onderdelen van de installatie moet het gebruik van materialen die oplossen of sorberen, waardoor stoffen in het water worden vrijgegeven of waardoor enig ander schadelijk effect op de vissen kan worden veroorzaakt, zoveel mogelijk worden vermeden. Er kunnen normale, uit een chemisch inert materiaal vervaardigde rechthoekige of cilindervormige bakken worden gebruikt die voldoende ruimte bieden, gegeven de beoogde populatiedichtheid (aantal vissen per liter water) (vgl. punt 43). Het gebruik van slangen uit zacht plastic moet zoveel mogelijk worden vermeden. Er moeten verbindingsbuizen van polytetrafluorethyleen, roestvrij staal en/of glas worden gebruikt. De ervaring wijst uit dat het voor teststoffen met een hoge adsorptiecoëfficiënt, zoals synthetische pyretroïden, noodzakelijk kan zijn gesilaniseerd glas te gebruiken. In een dergelijk geval moet de apparatuur na gebruik worden verwijderd. Bij voorkeur worden de testsystemen vóór de introductie van de testorganismen blootgesteld aan concentraties van de teststof die in het onderzoek worden gebruikt, zolang als nodig is om het behoud van stabiele blootstellingsconcentraties aan te tonen.

Water

Voor de test wordt normaliter water van natuurlijke oorsprong gebruikt dat wordt verkregen uit een niet-verontreinigde bron van uniforme kwaliteit. Synthetisch water (d.w.z. gedemineraliseerd water met daaraan toegevoegd kleine hoeveelheden van specifieke nutriënten) kan echter geschikter zijn om in de loop van de tijd een uniforme kwaliteit te waarborgen. Het verdunningswater, dat wil zeggen, het water dat met de teststof vermengd wordt voordat het in de testbak wordt gebracht (vgl. punt 30), moet zodanig zijn dat de gekozen vissoort daarin gedurende de acclimatisatie en de looptijd van de test kan overleven zonder dat de specimens een abnormaal aspect of gedrag gaan vertonen. In het ideale geval wordt aangetoond dat de gekozen vissoort in het verdunningswater kan overleven, groeien en zich voortplanten (bijvoorbeeld in een laboratoriumkweek of in een toxiciteitstest die de hele levenscyclus omvat). Van het verdunningswater moeten ten minste de pH, de hardheid, het totaalgehalte aan vaste stof en het totaalgehalte aan organische koolstof (TOC ([1])) worden bepaald, alsmede, zo mogelijk, het ammonium- en nitrietgehalte en de alkaliniteit en, voor mariene soorten, het zoutgehalte. De parameters die belangrijk zijn voor het optimale welzijn van de vissen zijn niet genoegzaam bekend; niettemin worden in aanhangsel 2 aanbevelingen gedaan wat betreft de maximumconcentratie van een aantal stoffen in het voor de tests gebruikte zoet en zeewater.

Het verdunningswater dient gedurende de test een constante kwaliteit te vertonen. De pH-waarde dient bij aanvang van de test in het interval van 6,0 tot 8,5 te liggen en mag bovendien in de loop van de test met niet meer dan ± 0,5 pH-eenheden schommelen. Om te garanderen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexatie van de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de vissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd, ten minste aan het begin en het einde van de test. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} en SO_4^{2-}), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld het totaalgehalte aan organofosforpesticiden en het totaalgehalte aan organochloorpesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de kwaliteit van het verdunningswater gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar.

Het natuurlijke gehalte aan zwevende deeltjes en het totaalgehalte aan organische koolstof (TOC) van het verdunningswater dienen zo laag mogelijk te zijn om te vermijden dat de teststof aan het organisch materiaal adsorbeert waardoor de biologische beschikbaarheid ervan zou afnemen en de BCF zou worden onderschat. De maximale toelaatbare concentraties bedragen 5 mg/l voor deeltjes (droge stof, achterblijvend op een 0,45 μm filter) en 2 mg/l voor het totaal aan organische koolstof (vgl. aanhangsel 2). Desnoods moet het verdunningswater vóór gebruik

([1]) TOC omvat organische koolstof van deeltjes en opgeloste organische koolstof, d.w.z. TOC = POC + DOC.

▼M7

worden gefilterd. Het gehalte aan organische koolstof in het testwater van de testvissen (excreta) en van de voedselresten dient zo laag mogelijk te worden gehouden (vgl. punt 46).

Testoplossingen

Maak een voorraadoplossing met een passende concentratie van de teststof klaar. De voorraadoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater. Een alternatief dat in sommige gevallen passend kan zijn, is het gebruik van een doseringssysteem voor desorptie vanuit de vaste fase. Het gebruik van oplosmiddelen en dispergeermiddelen (oplosbaarheidsbevorderende agentia) verdient doorgaans geen aanbeveling (vgl. punt 25); niettemin kan het gebruik van deze stoffen aanvaardbaar zijn om een voorraadoplossing van een passende concentratie te verkrijgen, maar al het mogelijke moet worden gedaan om het gebruik van deze stoffen tot een minimum te beperken en hun kritische micelconcentratie mag niet worden overschreden (indien van toepassing). Als oplosmiddelen mogen aceton, ethanol, methanol, dimethylformamide en triëthyleenglycol worden gebruikt. Dispergeermiddelen die zijn gebruikt, zijn Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40. De concentratie van het oplosmiddel in het uiteindelijke testmedium dient voor alle behandelingen gelijk te zijn (d.w.z. onafhankelijk van de concentratie van de teststof) en mag de overeenkomstige toxiciteitsdrempels die voor het oplosmiddel onder de testomstandigheden zijn bepaald, niet overschrijden. Het maximumniveau is een concentratie van 100 mg/l (of 0,1 ml/l). Het is onwaarschijnlijk dat een concentratie van een oplosmiddel van 100 mg/l de maximale opgeloste concentratie van de teststof die in het medium kan worden bereikt significant zal wijzigen (25). De bijdrage van het oplosmiddel en de teststof samen aan het totale organischekoolstofgehalte in het water in de testbakken moet bekend zijn. Gedurende de hele duur van de test mag het totale gehalte aan organische koolstof in de testbakken het gehalte aan organische koolstof in de teststof zelf en het oplosmiddel of het agens dat de oplosbaarheid daarvan dient te verhogen (solubisator) [1], in voorkomend geval, niet met meer dan 10 mg/l (± 20 %) overschrijden. Het gehalte aan organische stoffen kan tijdens doorstroomtests met vissen een aanmerkelijk effect hebben op de hoeveelheid vrij opgeloste teststof, vooral voor zeer lipofiele stoffen. Vaste-fase-microextractie (vgl. punt 60) kan belangrijke informatie verschaffen over de verhouding tussen gebonden en vrij opgeloste verbindingen, waarvan wordt aangenomen dat laatstgenoemde de biologisch beschikbare fractie vormen. De concentratie van de teststof dient onder de oplosbaarheidsgrens van de teststof in het testmedium te liggen, ondanks het gebruik van een oplosmiddel of solubisator. Wanneer biologisch gemakkelijk afbreekbare oplosmiddelen worden gebruikt, moet in het bijzonder worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in het doorstroomsysteem kunnen voordoen. Als het niet mogelijk is om zonder gebruik van een solubisator een voorraadoplossing te bereiden, moet worden nagedacht over de gepastheid van een onderzoek met blootstelling via het water in vergelijking tot blootstelling via het voer.

Voor doorstroomtests is een systeem dat de voorraadoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt (bijvoorbeeld doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning, saturatorsysteem), of een doseringssysteem voor desorptie vanuit de vaste fase vereist om ervoor te zorgen dat in de bakken met de proefdieren de gewenste testconcentratie wordt gehandhaafd. Laat bij voorkeur een verversingssnelheid van ten minste vijf bakvolumes per dag voor iedere testbak toe. Het gebruik van een doorstroomsysteem is verkieslijk, maar als dit niet mogelijk is (bijvoorbeeld omdat de gebruikte proefdieren daarvan schade ondervinden) mag een semistatisch systeem worden gebruikt op voorwaarde dat aan de validiteitscriteria wordt voldaan (vgl. punt 24). De stroomsnelheid van de voorraadoplossingen en het verdunningswater moet 48 uur vóór het begin van de test en vervolgens (gedurende de test) ten minste eenmaal per dag worden gecontroleerd. Neem in deze controle eveneens de bepaling van de stroomsnelheid door iedere testbak afzonderlijk op en zie erop toe dat de verschillen, zowel per bak als tussen de bakken onderling, niet meer dan 20 % bedragen.

[1] Hoewel het doorgaans niet wordt aanbevolen, moet, wanneer een oplosmiddel of solubisator wordt gebruikt, de organische koolstof afkomstig van dit agens worden opgeteld bij de organische koolstof afkomstig van de teststof om het gehalte aan organische koolstof in de testbakken te beoordelen.

▼M7

Keuze van de diersoort

Belangrijke criteria bij de keuze van de soort zijn dat zij gemakkelijk verkrijgbaar is, dat exemplaren van de geschikte grootte beschikbaar zijn en dat de soort op een bevredigende manier in het laboratorium kan worden gehouden. Andere keuzecriteria zijn het recreatieve, commerciële of ecologische belang van de soort alsmede haar relatieve gevoeligheid, het succes waarmee zij in het verleden is gebruikt enz. In aanhangsel 3 wordt een aantal aanbevolen soorten opgesomd. Ook andere soorten mogen worden gebruikt, maar in dat geval kan het nodig zijn de testprocedure aan te passen om geschikte proefomstandigheden te creëren. Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en moet tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast. In het algemeen zal het gebruik van kleinere vissoorten de tijd die nodig is om een stationaire toestand te bereiken verkorten, maar mogelijk meer vissen (vismonsters) vereisen om het vetgehalte en de concentraties van de teststof in de vissen adequaat te bepalen. Bovendien kunnen verschillen in ademhalingssnelheid en metabolisme tussen jongere en oudere vissen onderlinge vergelijkingen van de resultaten van verschillende tests en testsoorten hinderen. Er zij opgemerkt dat het testen van een vissoort in een (jonge) levensfase met snelle groei de interpretatie van gegevens kan bemoeilijken.

Leefomstandigheden van de vissen (relevant voor blootstelling zowel via water als via voer)

Laat het visbestand gedurende ten minste twee weken acclimatiseren in water (vgl. punt 28) dat de temperatuur heeft waarbij de test zal worden uitgevoerd; verschaf continu voldoende voedsel (vgl. punt 45). Zowel het water als het voer dient van het type te zijn dat in de test gebruikt wordt.

Na een aanpassingsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast:

— sterftecijfer groter dan 10 % van de populatie in zeven dagen: de hele partij wordt afgekeurd;

— sterftecijfer tussen 5 % en 10 % van de populatie in zeven dagen: verdere acclimatisatie gedurende zeven dagen; als de sterfte gedurende deze zeven dagen hoger dan 5 % is, wordt de gehele partij afgekeurd;

— sterftecijfer kleiner dan 5 % van de populatie in zeven dagen: de gehele partij wordt geaccepteerd.

De in de tests gebruikte vissen moeten vrij zijn van waarneembare ziekten en abnormaliteiten. Zieke vissen moeten worden verwijderd. De vissen mogen in de twee weken voorafgaande aan de test of tijdens de test niet worden behandeld voor ziekten.

UITVOERING VAN DE TEST

Verkennende test

Het verdient aanbeveling een verkennende proef uit te voeren om de proefomstandigheden bij de definitieve test (bijvoorbeeld teststofconcentraties, duur van de opname- en de depuratiefase) te optimaliseren of om te bepalen of een volledige test moet worden uitgevoerd. De opzet van de verkennende test moet zodanig zijn dat de vereiste informatie wordt verkregen. Een verkennende test kan worden overwogen als een beperkte test mogelijk voldoende is om een BCF te bepalen, of als een volledige test nodig is (vgl. punten 83-95 over de beperkte test).

Blootstellingsomstandigheden

Duur van de opnamefase

De duur van de opnamefase kan worden geschat op basis van bestaande praktijkervaring (bijvoorbeeld gegevens uit een eerdere studie of kennis van de accumulatiesnelheid van een verwante chemische stof) of op basis van bepaalde empirische relaties, stoelend op gegevens betreffende de oplosbaarheid in water of de verdelingscoëfficiënt octanol/water van de teststof (mits de opname verloopt volgens eersteordekinetiek, vgl. aanhangsel 5).

▼M7

De opnamefase dient 28 dagen te duren, tenzij kan worden aangetoond dat reeds eerder een stationaire toestand wordt bereikt (zie aanhangsel 1, Definities en eenheden). Een stationaire toestand wordt bereikt wanneer in een grafiek van de concentratie van de teststof in de vissen (C_f) als functie van de tijd de curve evenwijdig gaat lopen met de tijdas en drie opeenvolgende bepalingen van C_f op monsters die met tussenpozen van ten minste twee dagen worden genomen, niet meer dan ± 20 % van elkaar verschillen en er bovendien in de loop van de tijd geen significante toename van C_f tussen de eerste en laatste opeenvolgende bepaling is. Wanneer de analyse op samengevoegde monsters wordt uitgevoerd, zijn ten minste vier opeenvolgende bepalingen vereist. Voor teststoffen die langzaam worden opgenomen, verdient het de voorkeur om intervallen van zeven dagen te gebruiken. Indien de stationaire toestand na 28 dagen nog niet is bereikt, wordt de BCF berekend met uitsluitend de kinetische benadering, die niet vertrouwt op het al dan niet bereikt zijn van een stationaire toestand, of kan de opnamefase met 60 dagen worden verlengd, tenzij de stationaire toestand eerder wordt bereikt; gedurende de hele voortzetting van de opnamefase worden ook de metingen voortgezet. De concentratie van de teststof in de vissen aan het einde van de opnamefase moet zo hoog zijn dat k_2 betrouwbaar kan worden geschat op basis van de depuratiefase. Als er na 28 dagen geen bewijs van significante opname is, kan de test worden beëindigd.

Duur van de depuratiefase

Voor stoffen die eersteordekinetiek vertonen, is een tijd die half zo lang is als de opnamefase meestal voldoende voor een adequate reductie (bijvoorbeeld met 95 %) van de lichaamsconcentratie van de teststof (vgl. aanhangsel 5 voor een verklaring van deze raming). Indien de tijd die nodig is voor een vermindering met 95 % in de praktijk te lang is (bijvoorbeeld indien de depuratiefase dan meer dan twee keer zo lang als de normale duur van de opnamefase, dus meer dan 56 dagen, zou duren) mag een kortere periode worden gebruikt (bijvoorbeeld tot de concentratie van de teststof minder dan 10 % van de concentratie in de stationaire toestand bedraagt). Voor stoffen met een ingewikkelder opname- en depuratiepatroon dan kan worden beschreven met een ééncompartimentmodel dat een eersteordekinetiek vertoont, moet evenwel toch in een langere depuratiefase worden voorzien. Indien zulke ingewikkelde patronen worden waargenomen en/of verwacht, verdient het aanbeveling een biostatisticus en/of farmacokineticus te raadplegen om een juiste proefopzet te waarborgen. Wanneer de depuratieperiode wordt verlengd, kan het aantal benodigde vissen voor de monsterneming een beperkende factor worden en kunnen verschillen in groei tussen de vissen de resultaten beïnvloeden. De duur van de fase zal ook afhankelijk zijn van de tijd gedurende welke de concentratie van de teststof in de vissen boven de analytische bepaalbaarheidsgrens blijft.

Aantal proefdieren

Kies het aantal vissen per testconcentratie zo dat bij iedere bemonstering ten minste vier vissen per monster beschikbaar zijn. De vissen mogen uitsluitend worden gepoold wanneer analyse op basis van de afzonderlijke vissen niet haalbaar is. Als het de bedoeling is om de curve nauwkeuriger te fitten (en afgeleide parameters nauwkeurig te schatten) of als metabolismestudies noodzakelijk zijn (bv. om onderscheid te maken tussen metabolieten en de oorspronkelijke stof wanneer radioactief gemerkte teststoffen worden gebruikt), zullen meer vissen per bemonstering nodig zijn. Het vetgehalte dient te worden bepaald op hetzelfde biologisch materiaal waarop ook de concentratie van de teststof wordt bepaald. Als dit niet haalbaar is, kunnen aanvullende vissen nodig zijn (vgl. punten 56 en 57).

Als volwassen (d.w.z. geslachtsrijpe) vissen worden gebruikt, mogen deze vóór de test of tijdens de test niet in een voortplantingsfase verkeren of net hebben gepaaid (d.w.z. reeds kuit of hom hebben afgezet). Tevens moet worden gerapporteerd of in het experiment mannetjes of vrouwtjes of beide worden gebruikt. Als beide geslachten worden gebruikt, moeten verschillen in groei en vetgehalte tussen de geslachten vóór aanvang van de blootstelling worden gedocumenteerd als niet-significant, in het bijzonder als wordt verwacht dat het nodig zal zijn de gegevens van mannetjes en vrouwtjes samen te voegen om aantoonbare concentraties van de teststof en/of een aantoonbaar vetgehalte te verzekeren.

▼M7

Selecteer voor elke test vissen met een min of meer uniform lichaamsgewicht: het gewicht van de kleinste vis mag niet minder bedragen dan twee derde van dat van de grootste. Alle vissen moeten tot dezelfde jaarklasse behoren en dezelfde oorsprong hebben. Aangezien het gewicht en de leeftijd van een vis soms een significant effect op de BCF-waarden hebben (12), moeten deze gegevens nauwkeurig worden geregistreerd. Het verdient aanbeveling kort vóór aanvang van de test een steekproef uit het visbestand te wegen om een schatting van het gemiddelde gewicht te verkrijgen (vgl. punt 61).

Densiteit

Gebruik een grote water/visverhouding om de vermindering van de concentratie van de teststof in het water door de introductie van de vissen bij het begin van de test zo klein mogelijk te houden en een afname van het gehalte aan opgeloste zuurstof te vermijden. Van belang is ook dat de dichtheid van de vissen op de biologische kenmerken van de gekozen soort wordt afgestemd. De aanbevolen dichtheid bedraagt normaliter 0,1-1,0 gram vis (versgewicht) per liter water per dag. Een grotere dichtheid is toelaatbaar als wordt aangetoond dat de schommelingen van de concentratie van de teststof de ± 20 %-grenzen niet overschrijden en het gehalte aan opgeloste zuurstof nooit minder bedraagt dan 60 % van het verzadigingspunt (vgl. punt 24).

Houd bij de keuze van de geschikte vissendichtheid rekening met de normale biotoop van de betrokken vissoort. Zo kunnen demersale vissen bij eenzelfde watervolume in het aquarium een grotere bodemoppervlakte verlangen dan pelagische soorten.

Voeding

Verstrek de vissen gedurende de acclimatisatie- en de testperiode geschikt voer met een bekend vet- en totaal eiwitgehalte in een voldoende hoeveelheid om ze gezond te houden en hun lichaamsgewicht op peil te houden (enig groei is toegestaan). Geef gedurende de acclimatisatie- en de testperiode dagelijks een vaste hoeveelheid te eten, afhankelijk van de gebruikte soort, de experimentele omstandigheden en de calorische waarde van het voer (bijvoorbeeld voor regenboogforel ongeveer 1 à 2 % van hun lichaamsgewicht per dag). De dosering moet zo worden gekozen dat een snelle groei en een grote toename van het vetgehalte worden vermeden. Om de dosering constant te houden moet de hoeveelheid voer indien nodig worden herberekend, bijvoorbeeld eens per week. Voor die berekening kan het gewicht van de in iedere testbak overblijvende vissen worden geschat aan de hand van het gewicht van de vissen in de laatste uit die testbak getrokken steekproef. Het gewicht van de achterblijvende vissen zelf wordt niet bepaald.

Niet opgegeten voer en uitwerpselen moeten dagelijks, korte tijd (30 minuten tot een uur) na de voedering, met behulp van een hevel uit de testbakken worden verwijderd. Die bakken moeten in de loop van de test zo schoon mogelijk worden gehouden om de concentratie van organische stoffen zo laag mogelijk te houden (vgl. punt 29), aangezien de aanwezigheid van organische koolstof de biologische beschikbaarheid van de teststof negatief kan beïnvloeden (12).

Aangezien vele visvoeders uit vismeel worden vervaardigd, moet worden verzekerd dat het voer de testresultaten niet beïnvloedt en geen negatieve effecten induceert, bijvoorbeeld doordat het (sporen van) bestrijdingsmiddelen, zware metalen en/of de teststof zelf bevat.

Licht en temperatuur

Een fotoperiode van 12 tot 16 uur wordt aanbevolen, en de watertemperatuur (± 2 °C) moet worden afgestemd op de gekozen vissoort (vgl. aanhangsel 3). Het type belichting en de karakteristieken daarvan dienen bekend te zijn. Er dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid dat de teststof bij de gebruikte belichting fotochemisch in andere stoffen wordt omgezet. Door een passende belichting moet worden vermeden dat de vissen aan onnatuurlijke fotochemische omzettingsproducten worden blootgesteld. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn de UV-straling met een golflengte van minder dan 290 nm weg te filteren.

▼M7

Testconcentraties

De test werd oorspronkelijk opgezet voor apolaire organische stoffen. Voor dit type stoffen is blootstelling van de vissen aan één concentratie waarschijnlijk voldoende, aangezien er geen concentratie-effecten worden verwacht. Er kunnen echter twee concentraties vereist zijn voor het geldende regelgevingskader. Als andere stoffen dan apolaire organische stoffen worden getest, of als er andere aanwijzingen van mogelijke concentratieafhankelijkheid zijn, moet de test worden uitgevoerd met twee of meer concentraties. Indien slechts één concentratie wordt getest, dient een motivering voor het gebruik van één concentratie te worden gegeven (vgl. punt 79). De geteste concentratie moet zo laag zijn als praktisch en technisch mogelijk is (d.w.z. niet te dicht bij de oplosbaarheidsgrens).

In sommige gevallen kan worden verwacht dat de bioconcentratie van een stof afhangt van de concentratie in het water (bv. voor metalen, waar de opname in de vis slechts gedeeltelijk kan worden gereguleerd). In dit geval moeten ten minste twee, maar bij voorkeur meer, concentraties worden getest (vgl. punt 49) die relevant zijn in het milieu. Ook voor stoffen waarvoor de geteste concentraties om praktische redenen dicht bij de oplosbaarheidsgrens moeten liggen, verdient het aanbeveling ten minste twee concentraties te testen, omdat dit inzicht in de betrouwbaarheid van de blootstellingsconcentraties kan geven. De selectie van de testconcentraties moet de in het milieu realistische concentratie, alsook de concentratie die relevant is voor het doel van de specifieke beoordeling omvatten.

De concentratie(s) van de teststof moet(en) lager worden gekozen dan het niveau waarbij de teststof chronische effecten veroorzaakt of 1 % van zijn acute asymptotische LC_{50}, binnen een band die relevant is in het milieu en ten minste een orde van grootte hoger dan de bepaalbaarheidsgrens van de stof in water voor de gebruikte analysemethode. De hoogste toegestane testconcentratie kan ook worden bepaald door de acute 96 h-LC_{50} te delen door een passende acuut/chronisch-verhouding (passende verhoudingen variëren bijvoorbeeld tussen ongeveer 3 voor sommige stoffen en groter dan 100 voor enkele andere). Indien een tweede concentratie wordt gebruikt, moet zij ten minste een factor tien verschillen van de hierboven genoemde concentratie. Indien dit niet mogelijk is vanwege het toxiciteitscriterium (dat de hoogste testconcentratie beperkt) en de analytische grens (die de laagste testconcentratie beperkt), kan een lagere factor dan tien worden gebruikt en moet worden overwogen een radioactief gemerkte teststof (met een zo groot mogelijkheid zuiverheid, bv. bij voorkeur > 98 %) te gebruiken. Er dient op te worden gelet dat geen van de gebruikte concentraties hoger is dan de oplosbaarheidsgrens van de teststof in de testmedia.

Controles

Naast de experimentele reeks dient één controlegroep te worden behandeld met verdunningswater of, in voorkomend geval (vgl. punten 30 en 31), met dat water en het oplosmiddel.

Frequentie van de metingen van de waterkwaliteit

In de loop van de test moeten het gehalte aan opgeloste zuurstof, de TOC, pH en temperatuur in alle test- en controlebakken worden gemeten. De totale hardheid en, voor zover relevant, het zoutgehalte moeten worden gemeten in de controlegroep(en) en in een testbak. Meet deze parameters bij de hogere (of hoogste) concentratie als twee of meer concentraties worden getest. De zuurstofconcentratie en, voor zover relevant, het zoutgehalte moeten ten minste drie keer worden gemeten tijdens de opnamefase — aan het begin, omstreeks het midden en aan het einde van die fase — en vervolgens om de week gedurende de depuratiefase. De TOC moet worden bepaald bij het begin van de opnamefase (24 uur en 48 uur vóór de vissen in de bakken worden geïntroduceerd) en vervolgens ten minste wekelijks, zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. De temperatuur moet dagelijks worden gemeten en geregistreerd, de pH aan het begin en aan het einde van elke periode en de hardheid eenmaal in de loop van de test. Het is wenselijk de temperatuur in ten minste één bak continu te registreren.

▼M7

Bemonstering en analyse van de vissen en het water

Bemonsteringsschema voor vissen en water

Met het oog op de bepaling van de teststofconcentratie moet het water in de testbakken worden bemonsterd vóór de vissen worden geïntroduceerd en voorts zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. Het water moet vóór de voedering en tegelijk met de vissen worden bemonsterd. Het kan nuttig zijn vaker monsters te nemen om stabiele concentraties na de introductie van de vissen te waarborgen. Gedurende de opnamefase moeten de concentraties van de teststof worden bepaald om te controleren of aan de validiteitscriteria is voldaan (punt 24). Als uit de analyse van watermonsters aan het begin van de depuratiefase blijkt dat de teststof niet wordt gedetecteerd, kan dit worden gebruikt als rechtvaardiging om test- en controlewater gedurende de resterende tijd van de depuratiefase niet te analyseren op de concentratie van de teststof.

De vissen moeten ten minste vijfmaal in de loop van de opnamefase en ten minste viermaal in de loop van de depuratiefase op teststof worden bemonsterd. Omdat het in bepaalde gevallen moeilijk is op basis van dit aantal monsters een voldoende precieze schatting van de BCF-waarde te berekenen (met name wanneer er aanwijzingen bestaan dat een andere dan een simpele eersteordeopname- en depuratiekinetiek wordt gevolgd), is het raadzaam gedurende beide periodes een hogere bemonsteringsfrequentie aan te houden (vgl. aanhangsel 4).

Het vetgehalte moet worden bepaald op hetzelfde biologische materiaal dat wordt gebruikt om de concentratie van de teststof te bepalen, ten minste aan het begin en aan het einde van de opnamefase en aan het einde van de depuratiefase. Als dit niet haalbaar mocht zijn, moeten ten minste drie onafhankelijke vissen worden bemonsterd om het vetgehalte op elk van deze drie tijdstippen te bepalen. Het aantal vissen per bak aan het begin van het experiment moet dienovereenkomstig worden aangepast ([1]). Indien in de controlevissen (d.w.z. vissen uit het visbestand) geen significante hoeveelheden van de teststof worden gedetecteerd, kunnen de controlevissen uit de test ook worden geanalyseerd op alleen het vetgehalte en kan de bepaling van de teststof in de testgroep(en) (en de daarmee samenhangende opnamesnelheidsconstante, depuratiesnelheidsconstante en BCF-waarde) worden gecorrigeerd voor wijzigingen overeenkomstig het vetgehalte van de controlegroep tijdens de test ([2]).

Dode of zieke vissen hoeven niet te worden geanalyseerd op de teststof of hun vetgehalte.

Aanhangsel 4 bevat een voorbeeld van een goed bemonsteringsschema. Uitgaande van andere hypothetische K_{OW}-waarden ter bepaling van de blootstellingstijd die nodig is voor 95 % opname, kunnen probleemloos andere schema's worden doorgerekend (zie aanhangsel 5 voor de berekeningen).

De bemonstering wordt tijdens de opnamefase voortgezet tot een stationaire toestand is bereikt (zie aanhangsel 1, Definities en eenheden) of tot de opnamefase om een andere reden wordt beëindigd (na 28 dagen of 60 dagen, vgl. punten 37 en 38). Voor de start van de depuratiefase worden de vissen naar schone bakken overgebracht.

Bemonstering en monstervoorbereiding

De watermonsters voor de analyse moeten bijvoorbeeld worden verkregen door afheveling uit het midden van de testbak met behulp van een slang uit inert materiaal. Noch filtratie noch centrifugatie garandeert in alle omstandigheden een

([1]) Als het vetgehalte niet in dezelfde vis wordt bepaald als de teststof, moeten de vissen ten minste een vergelijkbaar gewicht hebben en, voor zover relevant, van hetzelfde geslacht zijn.

([2]) Dit is alleen een geldig alternatief als de vissen in alle testgroepen worden gehouden in groepen van gelijke grootte, de vissen volgens hetzelfde patroon worden verwijderd en ze op dezelfde wijze worden gevoerd. Dit waarborgt dat de groei van de vissen in alle testgroepen vergelijkbaar is, mits de geteste concentratie lager is dan het toxisch bereik. Als de groei vergelijkbaar is, zal naar verwachting ook het vetgehalte vergelijkbaar zijn. Een andere groei in de controle wijst op een effect van de stof en maakt de studie ongeldig.

▼M7

volledige scheiding van de biologisch beschikbare en biologisch niet-beschikbare fractie van de teststof. Wanneer een scheidingstechniek wordt toegepast, moet in het testverslag altijd een motivering voor, of een validering van, de scheidingstechniek worden gegeven gezien de problemen met de biologische beschikbaarheid (25). Met name voor zeer hydrofobe stoffen (d.w.z. stoffen met een log K_{OW} > 5) (12) (26), waar adsorptie aan de filermatrix of centrifugebak kan optreden, mogen deze bewerkingen niet op de monsters worden toegepast. In plaats daarvan moeten maatregelen worden getroffen om de bakken zo schoon mogelijk te houden (vgl. punt 46) en moet het totale gehalte organische koolstof (TOC) zowel gedurende de opnamefase als gedurende de depuratiefase bestendig worden gecontroleerd (vgl. punt 53). Om mogelijke problemen met verminderde biologische beschikbaarheid te voorkomen, kunnen voor slecht oplosbare en zeer hydrofobe stoffen technieken voor vaste-fase-microextractie worden gebruikt.

De bemonsterde vissen worden onverwijld gedood, met behulp van de meest geschikte en humane manier (voor bepaling op de hele vis dienen geen verdere bewerkingen plaats te vinden dan de vis met water spoelen (vgl. punt 28) en droog deppen). Weeg de vis en meet zijn totale lengte ([1]). Voor elke vis dient het gemeten gewicht en de gemeten lengte te worden gekoppeld aan de bepaalde concentratie van de teststof (en het bepaalde vetgehalte, voor zover van toepassing), bijvoorbeeld met behulp van een unieke identificatiecode voor elke bemonsterde vis.

Het verdient de voorkeur de vissen en het water onmiddellijk na de monsterneming te analyseren om afbraakprocessen en andere verliezen te vermijden. Bovendien kunnen op deze wijze naargelang de test vordert benaderde opname- en depuratiesnelheidsconstanten worden berekend. Indien de analyse meteen wordt uitgevoerd, wordt ook vermeden dat te veel tijd voorbijgaat alvorens het bereiken van het plateau (stationaire toestand) wordt geconstateerd.

Indien de analyse niet onmiddellijk wordt uitgevoerd, worden de monsters op passende wijze bewaard. In dit geval moeten, vooraleer de studie wordt aangevat, gegevens worden vergaard over de geschikte wijze van bewaring voor de teststof in kwestie — bijvoorbeeld diepvriezen of bewaren bij 4 °C, wijze van extractie enz. De duur van de bewaring moet zo worden gekozen dat de stof tijdens de bewaring niet wordt afgebroken.

Kwaliteit van de analysemethode

Aangezien de nauwkeurigheid, de precisie en de gevoeligheid van de analysemethode ten aanzien van de teststof bepalend zijn voor de kwaliteit van de hele procedure, moet experimenteel worden gecontroleerd of de nauwkeurigheid, de precisie en de reproduceerbaarheid van de bepaling van de stof alsmede de terugvinding van de teststof in de water- en vismonsters bevredigend zijn voor de gekozen methode. Dit moet deel uitmaken van de verkennende tests. Controleer eveneens dat geen teststof aantoonbaar is in het verdunningswater. Corrigeer zo nodig de bij de test gemeten waarden van de concentratie van de teststof in het water en in de vissen aan de hand van de terugvinding en de nuleffectmetingen bij de controlegroepen. De vis- en watermonsters moeten consequent op zodanige wijze behandeld worden dat contaminatie en verliezen (bijvoorbeeld als gevolg van adsorptie aan de bemonsteringsapparatuur) zoveel mogelijk worden vermeden.

Analyse van de vismonsters

Indien in de test radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, kan hetzij de totale hoeveelheid radioactiviteit (d.w.z. in de oorspronkelijke stof én de metabolieten daarvan) worden geanalyseerd, hetzij een zuivering worden uitgevoerd waardoor de oorspronkelijke stof afzonderlijk kan worden geanalyseerd. Indien de BCF wordt gebaseerd op de oorspronkelijke stof, moeten de belangrijkste metabolieten worden gekarakteriseerd, ten minste aan het einde van de opnamefase (vgl. punt 6). De belangrijkste metabolieten zij de metabolieten die ≥ 10 % van de totale hoeveelheid residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, die ≥ 5 % op twee opeenvolgende bemonsteringstijdstippen vertegenwoordigen, die gedurende de hele opnamefase toenemende niveaus vertonen, en die waarvan bekend is dat ze toxicologisch van belang zijn. Indien de BCF voor de hele vis, gemeten op

([1]) Behalve het gewicht moet ook de totale lengte worden geregistreerd, omdat vergelijking van de lengtegroei tijdens de test een goede indicator is voor het optreden van negatieve effecten.

▼M7

basis van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen, ≥ 500 is, kan het raadzaam zijn — en voor bepaalde categorieën stoffen zoals bestrijdingsmiddelen ten stelligste aan te bevelen — de metabolieten te identificeren en te kwantificeren. Kwantificering van deze metabolieten kan door sommige regelgevende autoriteiten worden geëist. Indien de afbraakproducten die 10 % of meer van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, worden geïdentificeerd en gekwantificeerd, verdient het aanbeveling de afbraakproducten in de geanalyseerde testwatermonsters op dezelfde wijze uit te splitsen. Indien dit niet mogelijk is, moet hiervoor in het verslag een verklaring worden gegeven.

De concentratie van de teststof dient normaliter voor iedere gewogen vis afzonderlijk te worden bepaald. Als zulks niet mogelijk is, mogen de gelijktijdig genomen vismonsters worden samengevoegd, maar een dergelijke samenvoeging houdt restricties in voor de statistische procedures die op de gegevens kunnen worden toegepast, dus de test moet een toereikend aantal vissen omvatten om de gewenste samenvoeging, de gewenste statistische procedure en het gewenste onderscheidingsvermogen mogelijk te maken. Referenties (27) en (28) kunnen worden gebruikt als inleiding op de relevante samenvoegingsprocedures.

De BCF dient niet alleen rechtstreeks te worden bepaald uit de studie maar ook te worden uitgedrukt als BCF genormaliseerd naar een vis met een vetgehalte van 5 % (op basis van het versgewicht) (vgl. punt 21), tenzij kan worden beargumenteerd dat de teststof zich niet primair in lipiden ophoopt. Het vetgehalte van de vissen wordt zo mogelijk bij iedere bemonstering bepaald, als het kan op hetzelfde extract als datgene dat voor de bepaling van de teststof wordt gebruikt, omdat de vetten meestal toch moeten worden verwijderd alvorens het extract chromatografisch kan worden geanalyseerd. Voor de bepaling van teststoffen zijn echter vaak specifieke extractieprocedures nodig, die in tegenspraak kunnen zijn met de testmethoden voor de bepaling van het vetgehalte. In dit geval (tot geschikte niet-destructieve instrumentele methoden beschikbaar zijn) wordt aanbevolen een andere strategie te hanteren om het vetgehalte van de vissen te bepalen (vgl. punt 56). Voor de bepaling van het vetgehalte moeten geschikte methoden worden gebruikt (20). De extractietechniek met chloroform/methanol (29) kan als standaardmethode worden aanbevolen (30), maar de Smedes-methode (31) wordt als alternatieve methode aanbevolen. Deze laatste methode wordt gekenmerkt door een vergelijkbare efficiëntie van de extractie, een hoge nauwkeurigheid, het gebruik van minder toxische organische oplosmiddelen en uitvoeringsgemak. Andere methoden waarvan de nauwkeurigheid gunstig afsteekt bij die van de aanbevolen methoden mogen worden gebruikt, mits naar behoren gemotiveerd. Het is van belang dat bijzonderheden over de gebruikte methode worden verstrekt.

Meting van de groei van de vissen

Aan het begin van de test moeten vijf tot tien vissen uit het visbestand apart worden gewogen en moet hun totale lengte worden gemeten. Dit kunnen dezelfde vissen zijn als die voor de bepaling van het vetgehalte worden gebruikt (vgl. punt 56). Het gewicht en de lengte van de vissen uit de test- en controlegroepen die bij elke monstername worden gebruikt, moeten worden gemeten voordat het gehalte van de chemische stof of het vetgehalte wordt bepaald. De metingen van deze bemonsterde vissen kunnen worden gebruikt om het gewicht en de lengte te schatten van de vissen die in de test- en controlebakken achterblijven (vgl. punt 45).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

De opnamecurve van de teststof moet worden verkregen door de concentratie in/op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) in de opnamefase uit te zetten tegen de tijd in een lineair coördinatenstelsel. Als de curve een plateau bereikt, d.w.z. ongeveer asymptotisch evenwijdig gaat lopen met de tijdas, wordt de BCF in de stationaire toestand (BCF_{SS}) berekend als:

$$\frac{C_f \textit{ in stationaire toestand} (\textit{gemiddeld})}{C_w \textit{ in stationaire toestand} (\textit{gemiddeld})}$$

▼M7

De ontwikkeling van C_f kan worden beïnvloed door de groei van de vissen (vgl. punten 72 en 73). De gemiddelde blootstellingsconcentratie (C_w) varieert in de tijd. Een tijdgewogen gemiddelde concentratie is waarschijnlijk relevanter en preciezer voor bioaccumulatiestudies, zelfs als de variatie binnen het toepasselijke geldigheidsbereik ligt (vgl. punt 24). Een tijdgewogen gemiddelde concentratie in water kan worden berekend overeenkomstig aanhangsel 5, punt 1.

De kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) wordt berekend als de verhouding k_1/k_2 van de twee kinetische eersteordesnelheidsconstanten. De snelheidsconstanten k_1 en k_2 en BCF_K kunnen worden afgeleid door simultane fitting van de opname- en de depuratiefase. Als alternatief kunnen k_1 en k_2 ook sequentieel worden bepaald (zie aanhangsel 5 voor een beschrijving en vergelijking van deze methoden). De depuratiesnelheidsconstante (k_2) moet mogelijk worden gecorrigeerd voor groeiverdunning (vgl. punten 72 en 73). Indien de opname- en/of depuratiecurve duidelijk geen eersteordekinetiek vertoont, moeten complexere modellen worden gebruikt (zie de referenties in aanhangsel 5 en het ingewonnen advies van een biostatisticus en/of farmacokineticus).

Gewichts- en lengtegegevens van de vissen

Het versgewicht en de totale lengte van afzonderlijke vissen voor alle bemonsteringsintervallen worden voor de test- en controlegroepen tijdens de opnamefase (met inbegrip van het visbestand voor het begin van de opnamefase) en de depuratiefase in aparte tabellen geplaatst. Voor elke vis wordt het gemeten gewicht en de gemeten lengte gekoppeld aan de bepaalde concentratie van de teststof, bijvoorbeeld met behulp van een unieke identificatiecode voor elke bemonsterde vis. Voor de doeleinden van het corrigeren van kinetische BCF-waarden voor groeiverdunning geniet het gewicht de voorkeur als maat voor de groei (zie punt 73 en aanhangsel 5 voor de gebruikte methode om gegevens te corrigeren voor groeiverdunning).

Correctie voor groeiverdunning en normalisatie naar vetgehalte

Groei van de vissen tijdens de depuratiefase kan de concentraties van chemische stoffen in de vissen verlagen, met als effect dat de algemene depuratiesnelheidsconstante (k_2) groter is dan zij zou zijn als zij uitsluitend werd ontleend aan verwijderingsprocessen (bv. ademhaling, metabolisme, egestie). Kinetische bioconcentratiefactoren moeten worden gecorrigeerd voor groeiverdunning. Een BCF_{SS} zal ook worden beïnvloed door groei, maar er is geen overeengekomen procedure beschikbaar om een BCF_{SS} te corrigeren voor groei. In geval van significante groei, moet ook de BCF_K, gecorrigeerd voor groei (BCF_{Kg}), worden afgeleid, aangezien deze mogelijk een relevantere maat voor de bioconcentratiefactor is. Het vetgehalte van testvissen (dat sterk samenhangt met de bioaccumulatie van hydrofiele stoffen) kan in de praktijk zoveel schommelen dat normalisatie naar een vastgesteld vetgehalte (5 % g/g) noodzakelijk is om zowel kinetische bioconcentratiefactoren als bioconcentratiefactoren in stationaire toestand op een zinvolle manier te kunnen presenteren, tenzij kan worden aangevoerd dat de teststof zich niet primair in vetten ophoopt (sommige geperfluoreerde stoffen kunnen zich bijvoorbeeld binden aan eiwitten). Vergelijkingen voor en voorbeelden van deze berekeningen zijn te vinden in aanhangsel 5.

Om een kinetische BCF te corrigeren voor groeiverdunning, moet de depuratiesnelheidsconstante worden gecorrigeerd voor groei. Deze voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (k_{2g}) wordt berekend door de groeisnelheidsconstante (k_g, zoals verkregen uit de gemeten gewichtsgegevens) in mindering te brengen op de algemene depuratiesnelheidsconstante (k_2). De voor groei gecorrigeerde kinetische bioconcentratiefactor wordt vervolgens berekend door de opnamesnelheidsconstante (k_1) te delen door de voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (k_{2g}) (vgl. aanhangsel 5). In sommige gevallen komt deze aanpak in gevaar. Zo kan de afgeleide k_{2g} voor zeer traag depurerende stoffen die worden getest met snel groeiende vissen bijvoorbeeld heel klein zijn, waardoor de fout in de twee snelheidsconstanten die worden gebruikt om de voor groei gecorrigeerde kinetische bioconcentratiefactor te bepalen kritisch wordt, en

▼M7

in sommige gevallen kunnen de schattingen van k_g groter zijn dan k_2. Een alternatieve aanpak waarbij niet voor groeiverdunning hoeft te worden gecorrigeerd, maakt gebruik van depuratiegegevens met betrekking tot de massa van de teststof per vis (op basis van hele vissen) in plaats van de gebruikelijke (concentratie)gegevens met betrekking tot de massa van de teststof per massaeenheid vis. Deze aanpak kan probleemloos worden gebruikt, aangezien tests volgens deze testmethode de geregistreerde weefselconcentraties dienen te koppelen aan het gewicht van de afzonderlijke vissen. De eenvoudige procedure hiervoor is uiteengezet in aanhangsel 5. Er zij opgemerkt dat k_2 toch moet worden gerapporteerd, zelfs als deze alternatieve aanpak wordt gebruikt.

Kinetische bioconcentratiefactoren en bioconcentratiefactoren in stationaire toestand moeten ook worden gerapporteerd ten opzichte van een standaardvetgehalte van de vis van 5 % (g/g), tenzij kan worden aangevoerd dat de teststof zich niet primair in vetten ophoopt. De gegevens van de concentratie in vissen, of de BCF, worden genormaliseerd volgens de verhouding tussen 5 % en het werkelijke (individuele) gemiddelde vetgehalte (in % versgewicht) (vgl. aanhangsel 5).

Als de bepalingen van de chemische stof en het vetgehalte zijn uitgevoerd op dezelfde vis, moeten de genormaliseerde gegevens van het vetgehalte van de afzonderlijke vis worden gebruikt om een naar vetgehalte genormaliseerde BCF te berekenen. Indien de groei in de controlevissen en blootgestelde vissen vergelijkbaar is, kan ook alleen het vetgehalte van de controlevissen worden gebruikt om voor het vetgehalte te corrigeren (vgl. punt 56). Een methode voor het berekenen van de BCF genormaliseerd naar vetgehalte is beschreven in aanhangsel 5.

Interpretatie van de resultaten

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten concentraties van de teststofoplossingen in de buurt liggen van de analytische aantoonbaarheidsgrens.

De gemiddelde groei mag zowel in de testgroep als in de controlegroep in beginsel niet significant verschillen om toxische effecten uit te sluiten. De groeisnelheidsconstanten of de groeicurven van de twee groepen moeten worden vergeleken met behulp van een passende procedure ([1]).

Bioconcentratiegegevens van goede kwaliteit resulteren in scherp afgetekende opname- en depuratiecurven. Voor de snelheidsconstanten moet het resultaat van een χ^2 goodness-of-fit-toets een goede fit laten zien (d.w.z. klein meetfoutenpercentage (32)) voor het bioaccumulatiemodel, zodat de snelheidsconstanten als betrouwbaar kunnen worden beschouwd (vgl. aanhangsel 5). Indien meer dan één testconcentratie wordt gebruikt, behoort het verschil tussen de waarden voor de opname- c.q. de depuratieconstante als bepaald voor de testconcentraties niet meer te bedragen dan 20 % ([2]). Als dit niet het geval is, kan er sprake zijn van concentratieafhankelijkheid. Indien tussen de gemeten waarden van de opname- c.q. de depuratiesnelheidsconstante voor de gebruikte testconcentraties een significant verschil bestaat, moet dit worden genoteerd en moeten mogelijk verklaringen worden gesuggereerd. Bij goed opgezette studies is het 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de BCF's in het algemeen niet veel ruimer dan (puntschatting) ± 20 %.

Indien twee of meer concentraties worden getest, worden de resultaten van beide of alle concentraties gebruikt om na te gaan of de resultaten consistent zijn en of

([1]) Er kan een *t*-toets op de groeisnelheidsconstanten worden uitgevoerd om te toetsen of de groei tussen de controle- en testgroepen verschilt, of er kan een *F*-toets worden uitgevoerd in geval van een variantieanalyse. Indien nodig kan een *F*-toets of likelihood-ratiotoets worden gebruikt als hulpmiddel bij het kiezen van het juiste groeimodel (monografie 54 van de OESO, (32)).

([2]) Deze percentages veronderstellen dat de analysemethoden betrouwbaar zijn en dat de halveringsperiode korter dan 14 dagen is. Als de analysemethoden minder betrouwbaar zijn of als de halveringsperiode (veel) langer is, worden deze cijfers hoger.

▼M7

er sprake is van concentratieafhankelijkheid. Indien slechts één concentratie wordt getest om het gebruik van dieren en/of middelen te beperken, moet een motivering voor het gebruik van slechts één concentratie worden gegeven.

De resulterende BCF_{SS} is verdacht als de BCF_K significant groter is dan de BCF_{SS}, aangezien dit een aanwijzing kan zijn dat geen stationaire toestand is bereikt of dat geen rekening is gehouden met groeiverdunning en verliesprocessen. Indien de BCF_{SS} heel veel hoger is dan de BCF_K, moet worden gecontroleerd of er fouten zijn gemaakt in de afleiding van de opname- en depuratiesnelheidsconstanten en moeten de constanten opnieuw worden berekend. Een andere fittingsprocedure kan de schatting van BCF_K mogelijk verbeteren (vgl. aanhangsel 5).

Testverslag

Behalve de gegevens over de teststof die in punt 3 zijn genoemd, moeten in het verslag over de test de volgende gegevens worden opgenomen:

Teststof:

fysische toestand en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz. (met inbegrip van het gehalte aan organische koolstof, indien van toepassing);

— voor stoffen die uit meerdere componenten bestaan en UVCB's (stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen), een beschrijving, voor zover mogelijk, van de chemische identiteit van de afzonderlijke bestanddelen en voor elk daarvan zijn percentage van de totale massa van de stof. Er moet worden samengevat hoe de in de test gebruikte analysemethode een maat voor de concentratie van de stof weerspiegelt; alle analyseprocedures moeten worden beschreven, met inbegrip van de nauwkeurigheid van de methode, de aantoonbaarheidsgrens van de methode, en de bepaalbaarheidsgrens;

— indien radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, de precieze positie van het radioactieve atoom (de radioactieve atomen) en het percentage van de radioactiviteit dat met onzuiverheden is geassocieerd;

— informatie over de toxiciteit van de teststof voor vissen (idealiter de soort die in de test is gebruikt). De toxiciteit dient te worpen gerapporteerd als een acute 96 h-LC_{50} en een NOAEC & LOAEC uit een chronisch onderzoek (d.w.z. een test over de eerste levensfase of een test over de volledige levenscyclus, indien beschikbaar);

— de bewaaromstandigheden voor de (chemische) teststof en de stabiliteit van de (chemische) teststof onder de bewaaromstandigheden, indien deze vóór gebruik werd opgeslagen.

Proefdiersoort:

wetenschappelijke naam, stam, oorsprong, eventuele voorafgaande behandeling, acclimatisatie, leeftijd, geslacht (indien relevant), grootte-interval (gewicht en lengte) enz.

Testomstandigheden:

— gebruikte testprocedure (bijvoorbeeld doorstroomsysteem of semistatisch systeem); normaal onderzoek of beperkt onderzoek (met inbegrip van redenen en motivering);

— aard en kenmerken van de gebruikte verlichting en de fotoperiode(s);

— proefopzet (bijvoorbeeld aantal en grootte van de testbakken, verversingssnelheid van het water, populatiedichtheid, aantal replicaties, aantal vissen per replicatie, aantal testconcentraties, duur van de opname- en de depuratiefase, frequentie van de bemonstering van vissen en water);

▼M7

— wijze waarop de voorraadoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (het oplosmiddel, zijn concentratie en zijn bijdrage aan het gehalte aan organische koolstof van het testwater moeten worden vermeld, indien gebruikt) of een beschrijving van een alternatief doseringssysteem;

— de nominale testconcentraties, de gemiddelden en standaardafwijkingen van de desbetreffende in de testbakken gemeten waarden en de methode en frequentie waarmee zij zijn bepaald;

— de oorsprong van het verdunningswater, een beschrijving van de eventuele voorafgaande behandeling daarvan, de resultaten van eventuele proeven betreffende het vermogen van de proefdieren om in dat water te overleven en de kenmerken van dat water: pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof (TOC) en zwevende deeltjes, zoutgehalte van het testmedium (indien van toepassing), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;

— waterkwaliteit in de testbakken, pH, hardheid, TOC, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof; de gebruikte methoden en frequentie van de metingen;

— nadere gegevens over het voer, bijvoorbeeld aard, herkomst, samenstelling (zo mogelijk ten minste het vet- en het eiwitgehalte), gekozen dosering, voederfrequentie en -hoeveelheid;

— gegevens over de behandeling van de vis- en watermonsters, met inbegrip van bijzonderheden over de voorbereiding, de opslag, de extractie en de procedures (met inbegrip van de precisie daarvan) voor de analytische bepaling van de teststof en het vetgehalte;

— de gebruikte methoden voor de randomisatie van de behandeling en de toewijzing van de vissen aan de testbakken;

— gegevens over de introductie van de testorganismen in de testoplossingen en de duur van de test;

— een beschrijving van de bereikbepalingstests en de resultaten daarvan, indien beschikbaar.

Resultaten:

— resultaten van eventuele voorbereidende experimenten;

— sterfte van de vissen in de controlegroep(en) en de vissen in iedere testbak, alsmede eventuele waarnemingen van abnormaal gedrag;

— informatie over eventuele waargenomen negatieve effecten;

— een volledige beschrijving van alle gebruikte procedures voor chemische analyses, met inbegrip van aantoonbaarheids- en bepaalbaarheidsgrenzen, variabiliteit en terugvinding;

— het vetgehalte van de vissen, met inbegrip van de gebruikte methode, en normalisatiefactor voor het vetgehalte (L_n, factor om resultaten uit te drukken op basis van een vetgehalte van de vissen van 5 %), indien bepaald;

— gegevens in tabelvorm over het gewicht (en de lengte) van de vissen, gekoppeld aan concentraties van de chemische stof (en het vetgehalte, indien van toepassing) in de afzonderlijke vissen, zowel voor controle- als blootstellingsgroepen (bijvoorbeeld met behulp van een unieke identificatiecode voor elke bemonsterde vis) en berekeningen voor de afgeleide groeisnelheidsconstante(n);

▼M7

— gegevens in tabelvorm over de concentratie van de teststof in de vissen (C_f, gekoppeld aan afzonderlijke vissen) en in het water water (C_w) (met gemiddelde waarden voor de testgroep en controle, de standaardafwijking en het bereik, indien van toepassing) voor alle bemonsteringstijdstippen (C_f in mg/kg versgewicht van het hele lichaam of specifieke weefsels daarvan, bv. lipiden, en C_w in mg/l). De C_w-waarden voor de controlegroepen en de nuleffectmetingen dienen eveneens te worden gerapporteerd;

— grafieken, inclusief alle gemeten gegevens, van het volgende (indien van toepassing, kunnen concentraties worden uitgedrukt in verhouding tot het hele lichaam en het vetgehalte genormaliseerd naar 5 % van het dier of specifieke weefsels daarvan):

  — groei, d.w.z. gewicht van de vissen vs. tijd dan wel natuurlijke logaritme van het gewicht vs. tijd (met inbegrip van de afgeleide groeisnelheidsconstante, k_g);

  — de opname en depuratie van de teststof in de vissen (in één grafiek);

  — de tijd die nodig is om de stationaire toestand te bereiken (indien bereikt);

  — natuurlijke logaritme van de concentratie vs. opnametijd (met inbegrip van de afgeleide opnamesnelheidsconstante k_1);

  — natuurlijke logaritme van de concentratie vs. depuratietijd (met inbegrip van de afgeleide depuratiesnelheidsconstante k_2); en

  — zowel de opname- als de depuratiefasecurve, die zowel de gegevens als het gefitte model laten zien;

— indien uit een visuele inspectie van een grafiek duidelijke uitschieters naar voren komen, kan een statistisch geldige uitschietertoets worden toegepast om verkeerde gegevenspunten te verwijderen en moet een rechtvaardiging voor het weglaten van deze gegevens worden gedocumenteerd;

— de bioconcentratiefactor in stationaire toestand (BCF_{SS}), indien de stationaire toestand (bijna) is bereikt;

— de kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) en de afgeleide opname- en depuratiesnelheidsconstanten k_1 en k_2, met de schommelingen in k_2 (helling en snijpunt met de y-as) indien sequentiële fitting heeft plaatsgevonden;

— de betrouwbaarheidsgrenzen, standaardafwijking (zoals beschikbaar) en wijze van berekening/gegevensanalyse voor elke parameter voor elke gebruikte concentratie van de teststof;

  — eventuele informatie over metabolieten van de radioactief gemerkte teststof en de accumulatie daarvan;

  — groeisnelheidsconstante(n), met 95 %-betrouwbaarheidsinterval(len) en de berekende voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (k_{2g}), de halveringsperiode en de BCF (BCF_{Kg}) -waarden;

  — alle ongewone verschijnselen die zich in de loop van de test hebben voorgedaan, alle afwijkingen van voornoemde procedures en alle andere relevante gegevens;

  — een samenvattende tabel met relevante gemeten en berekende gegevens, zoals hierna:

▼M7

Opname- en depuratiesnelheidsconstanten en bioconcentratiefactoren (BCF) van de stof	
k_g (groeisnelheidsconstante; dag^{-1}):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
k_1 (algemene opnamesnelheidsconstante; $l\ kg^{-1}\ dag^{-1}$):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
k_2 (algemene depuratiesnelheidsconstante; dag^{-1}):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
k_{2g} (voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante; dag^{-1}):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
C_f (concentratie van chemische stof in de vissen in stationaire toestand; $mg\ kg^{-1}$):	Voeg waarde in ± SD (2)
C_w (concentratie van chemische stof in het water; $mg\ l^{-1}$):	Voeg waarde in ± SD (2)
L_n (normalisatiefactor vetgehalte):	Voeg waarde in(3)
BCF_{SS} (BCF in stationaire toestand; $l\ kg^{-1}$)	Voeg waarde in ± SD (2)
BCF_{SSL} (naar vetgehalte genormaliseerde BCF in stationaire toestand; $l\ kg^{-1}$):	Voeg waarde in(3) ± SD (2)
BCF_K (kinetische BCF; $l\ kg^{-1}$)	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
BCF_{Kg} (voor groei gecorrigeerde kinetische BCF; $l\ kg^{-1}$)	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
$t_{1/2g}$ (voor groei gecorrigeerde halveringsperiode; dag):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
BCF_{KL} (naar vetgehalte genormaliseerde kinetische BCF; $l\ kg^{-1}$):	Voeg waarde in
BCF_{KLG} (naar vetgehalte genormaliseerde en voor groei gecorrigeerde kinetische BCF; $l\ kg^{-1}$):	Voeg waarde in

(1) BI: Betrouwbaarheidsinterval (indien schatting mogelijk is)
(2) SD: Standaarddeviatie (indien schatting mogelijk is)

Resultaten die vóór de test bij de ontwikkeling van de testmethode en proefopzet werden gerapporteerd als „niet aantoonbaar/bepaalbaar bij de gegeven aantoonbaarheidsgrens/bepaalbaarheidsgrens”, moeten worden vermeden, aangezien dergelijke resultaten onbruikbaar zijn voor het berekenen van de snelheidsconstanten.

C.13 — II: **BEPERKTE TEST MET VISSEN MET BLOOTSTELLING VIA HET WATER**

INLEIDING

De toenemende ervaring die is opgedaan met het uitvoeren en interpreteren van de volledige test door zowel laboratoria als regelgevende instanties, laat zien dat — enkele uitzonderingen daargelaten — voor het schatten van de opname- en depuratiesnelheidsconstanten eersteordekinetiek van toepassing is. De opname- en depuratiesnelheidsconstanten kunnen derhalve worden geschat met een minimum aan monsternamepunten, en de kinetische BCF kan worden afgeleid.

Het aanvankelijke doel van het onderzoeken van alternatieve opzetten voor BCF-studies was een kleine test te ontwikkelen die kan worden gebruikt als tussenstap om schattingen van de BCF op basis van K_{OW} en QSAR's te verwerpen of te

▼M7

bevestigen en zo voor veel stoffen de noodzaak van een volledig onderzoek uit te sluiten, en om de kosten en het gebruik van dieren te minimaliseren door beperking van de bemonstering en van het aantal uitgevoerde analysereeksen. Terwijl in grote lijnen de opzet van de eerdere testmethode werd gevolgd om integratie van de testresultaten met bestaande BCF-gegevens mogelijk te maken en om de uitvoering van de test en de interpretatie van de gegevens te vergemakkelijken, was het doel BCF-schattingen te verschaffen die voldoende nauwkeurig en precies zijn om op basis van risicobeoordelingen besluiten te kunnen nemen. Veel overwegingen van de volledige test zijn ook van toepassing op de beperkte test, bijvoorbeeld de validiteitscriteria (vgl. punt 24) en de beëindiging van een test als aan het einde van de opnamefase geen significante opname wordt gezien (vgl. punten 16 en 38).

Stoffen die in aanmerking kunnen komen voor de beperkte testopzet, moeten tot het algemene domein behoren waarvoor deze testmethode werd ontwikkeld, d.w.z. apolaire organische stoffen (vgl. punt 49). Als er enige aanwijzing is dat de te testen stof afwijkend gedrag kan vertonen (bv. een duidelijke afwijking van eersteordekinetiek), moet voor regelgevingsdoeleinden een volledige test worden uitgevoerd.

Gewoonlijk duurt de beperkte test niet korter dan de standaard BCF-test, maar worden er wel minder monsters van vissen genomen (zie aanhangsel 6 voor de grondgedachte). De depuratieperiode kan voor snel depurerende stoffen echter worden verkort om te voorkomen dat de concentraties in de vissen vóór het einde van de test dalen tot onder de aantoonbaarheidsgrens/bepaalbaarheidsgrens. Een beperkte blootstellingstest met vissen met één concentratie kan worden gebruikt om vast te stellen of een volledige test noodzakelijk is, en als de resulterende gegevens die worden gebruikt voor het berekenen van de snelheidsconstanten en de BCF robuust zijn (vgl. punt 93), kan worden afgezien van de volledige test als de resulterende BCF sterk verschilt van de wettelijke waarden van belang.

In sommige gevallen kan het voordelig zijn om de beperkte testopzet met meer dan één testconcentratie uit te voeren bij wijze van oriënterende test om vast te stellen of schattingen van de BCF voor een stof concentratieafhankelijk zijn. Indien uit de schattingen van de BCF op basis van de beperkte test concentratieafhankelijkheid blijkt, moet de volledige test worden uitgevoerd. Indien de schattingen van de BCF op basis van zo'n beperkte test niet concentratieafhankelijk blijken te zijn, maar de resultaten niet als afdoend worden beschouwd, kan een eventuele daaropvolgende volledige test worden uitgevoerd met één concentratie, zodat minder dieren worden gebruikt dan in een volledige test met twee (of meer) concentraties.

Stoffen die voor de beperkte test in aanmerking kunnen komen moeten:

— waarschijnlijk ongeveer eersteordeopname- en depuratiekinetiek vertonen, bv. afgeleid uit „read-across” met vergelijkbare stoffen;

— een log K_{OW} < 6 hebben, tenzij snel metabolisme wordt verwacht ([1]);

— voldoende oplosbaar zijn in water voor de analysetechniek (vgl. punt 24);

— duidelijk bepaalbaar zijn (d.w.z. de concentraties moeten ten minste een orde van grootte hoger zijn dan de bepaalbaarheidsgrens), zowel in de vissen als in het water, en radioactieve merking wordt aanbevolen (vgl. punt 23); en

— een depuratieperiode hebben die langer is dan de voorspelde halveringsperiode van de stof (vgl. aanhangsel 5 voor berekeningen), of de duur van de depuratie moet dienovereenkomstig worden aangepast (vgl. punt 91). Een uitzondering op deze regel is toegestaan als snel metabolisme van de stof wordt verwacht.

([1]) De beperkte test kan in feite worden gebruikt om snel metabolisme aan te tonen, wanneer bekend is dat snel metabolisme waarschijnlijk is.

▼M7

BEMONSTERINGSSCHEMA VOOR STUDIES VOLGENS DE BEPERKTE OPZET

Bemonstering van de vissen

De bemonstering van de vissen wordt beperkt tot vier monsternamepunten:

— In het midden en aan het einde van de opnamefase (het laatste is ook het begin van de depuratiefase), bv. na 14 en 28 dagen (33).

— In het midden van de depuratiefase en aan het einde van de studie (wanneer de concentratie van de stof minder dan 10 % van de maximumconcentratie is, of ten minste duidelijk later dan één halveringsperiode van de stof), bv. na 7 en 14 dagen depuratie (33). Indien snelle depuratie wordt verwacht of wordt waargenomen, kan het nodig zijn de depuratieperiode te verkorten om te voorkomen dat de concentraties in de vissen dalen tot onder de bepaalbaarheidsgrens.

— De meting van het vetgehalte vindt plaats zoals in een volledige studie.

— De correctie voor groei vindt plaats zoals in een volledige studie.

— De BCF wordt berekend als een kinetische BCF.

Bemonstering water

Voor de beperkte opzet wordt water bemonsterd als in een volledige studie (vgl. punt 54) of ten minste vijf keer gelijkelijk verdeeld over de opnamefase, en wekelijks in de depuratiefase.

Wijzigingen in de opzet

Rekening houdend met de eigenschappen van de teststof, geldige QSAR-voorspellingen en het specifieke doel van de studie, kunnen enkele wijzigingen in de opzet van de studie worden overwogen:

— Indien een grotere precisie nodig is, kunnen voor de bemonstering aan het einde van de opnamefase meer vissen (6 of 8 in plaats van 4) worden gebruikt.

— Opneming van een 'extra' groep vissen die wordt gebruikt als de depuratie na 14 dagen (of het geraamde einde van de depuratiefase) onvoldoende is voor adequate depuratie (d.w.z > 50 %). Indien de geraamde duur van de depuratiefase korter of langer dan 14 dagen is, moet het bemonsteringsschema worden aangepast (d.w.z. een groep vissen bij het geraamde einde van de depuratiefase, en een groep na de helft daarvan).

— Gebruik van twee testconcentraties om mogelijke concentratieafhankelijkheid te onderzoeken. Indien de resultaten van de beperkte test, uitgevoerd met twee testconcentraties, laten zien dat de BCF niet concentratieafhankelijk is (d.w.z. dat ze minder dan 20 % verschillen), kan één concentratie als voldoende worden beschouwd in een volledige test, indien deze wordt uitgevoerd.

— Het lijkt waarschijnlijk dat modellen voor bioaccumulatieprocessen zoals de modellen die zijn voorgesteld door Arnot et al. (35), kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het plannen van de lengte van de opnamefase en de depuratiefase (zie ook aanhangsel 5).

Berekeningen

De grondgedachte van deze aanpak is dat de bioconcentratiefactor in een volledige test kan worden bepaald als een bioconcentratiefactor in stationaire toestand (BCF_{SS}) door de verhouding tussen de concentratie van de teststof in het weefsel van de vissen en de concentratie van de teststof in het water te berekenen, of door de kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) te berekenen als de verhouding tussen de opnamesnelheidsconstante k_1 en de depuratiesnelheidsconstante k_2. De BCF_K is ook geldig als tijdens de opname geen concentratie van de stof in stationaire toestand wordt bereikt, mits die opname- en depuratieprocessen ongeveer eersteordekinetiek vertonen. Als absoluut minimum zijn twee gegevenspunten vereist om de opname- en depuratiesnelheidsconstanten te schatten, één

▼M7

aan het einde van de opnamefase (d.w.z. het begin van de depuratiefase) en één aan het einde (of na een aanzienlijk deel) van de depuratiefase. Het tussenliggende monsternamepunt wordt aanbevolen ter controle van de opname- en depuratiekinetiek ([1]). Zie de aanhangsels 5 en 6 voor de berekeningen.

Interpretatie van de resultaten

Ga na dat depuratiefase langer is dan één halveringsperiode, om de geldigheid en informatieve waarde van de test te kunnen beoordelen. Ook moet de BCF_{Km} (kinetische BCF afgeleid uit een beperkte test) worden vergeleken met de beperkte BCF_{SS}-waarde (dat wil zeggen, de BCF_{SS} zoals berekend aan het einde van de opnamefase, onder de aanname dat de stationaire toestand is bereikt; dit kan slechts een aanname zijn, want het aantal monsternamepunten is onvoldoende om dit aan te tonen). Indien de BCF_{Km} kleiner is dan de beperkte BCF_{SS}, is de beperkte BCF_{SS} de waarde die de voorkeur geniet. Indien BCF_{Km} kleiner is dan 70 % van de beperkte BCF_{SS}, zijn de resultaten niet geldig en moet een volledige test worden uitgevoerd.

Als de beperkte test een BCF_{Km} oplevert in de buurt van een waarde die wettelijk van belang is, moet een volledige test worden uitgevoerd. Als het resultaat ver van een waarde van wettelijk belang ligt (ruim erboven of ruim eronder), is een volledige test mogelijk niet nodig, of kan een volledige test met één concentratie worden uitgevoerd, indien deze door het toepasselijke regelgevingskader wordt geëist.

Indien na een beperkte test met één concentratie een volledige test noodzakelijk wordt bevonden, kan deze met een tweede concentratie worden uitgevoerd. Indien de resultaten consistent zijn, kan worden afgezien van een verdere volledig test met een andere concentratie, aangezien de bioconcentratie van de stof waarschijnlijk niet concentratieafhankelijk zal zijn. Indien de resultaten van de beperkte test, uitgevoerd met twee concentraties, geen concentratieafhankelijkheid laten zien, kan een volledige test met slechts één concentratie worden uitgevoerd (vgl. punt 87).

Testverslag

In het verslag over de beperkte test moet alle informatie worden opgenomen die verlangd wordt voor een verslag van een volledige test (vgl. punt 81), behalve de informatie die niet kan worden verstrekt (d.w.z. een curve die de tijd die nodig is om de stationaire toestand te bereiken laat zien, en de bioconcentratiefactor in de stationaire toestand; in plaats van laatstgenoemde moet de beperkte BCF_{ss} worden gegeven). In het verslag moeten tevens de motivering voor het gebruik van de beperkte test en de resulterende BCF_{Km} worden opgenomen.

C.13 — III: BIOACCUMULATIETEST MET VISSEN MET BLOOTSTELLING VIA HET VOER

INLEIDING

De in deze paragraaf beschreven methode moet worden gebruikt voor stoffen waarvoor de methode met blootstelling via het water niet praktisch is (bijvoorbeeld omdat geen stabiele, meetbare concentraties in het water in stand kunnen worden gehouden, of omdat het niet mogelijk is om binnen 60 dagen na de blootstelling adequate lichaamsconcentraties te bereiken; zie de eerdere paragrafen over de methode met blootstelling via het water). Men moet evenwel beseffen dat het eindpunt van deze test een biomagnificatiefactor (BMF) voor opnamen uit het voedsel zal zijn in plaats van een bioconcentratiefactor (BCF)([2])).

In mei 2001 werd op de SETAC Europe-conferentie in Madrid een nieuwe methode gepresenteerd voor het testen van de bioaccumulatie van organische stoffen die slecht oplosbaar zijn in water (36). Dit werk bouwde voort op verschillende gerapporteerde bioaccumulatiestudies in de literatuur waarin een doseringsmethode met verrijkt voer werd gebruikt (bv. (37)). Begin 2004 werd bij

([1]) Wanneer slechts twee gegevenspunten worden gemeten, kunnen de betrouwbaarheidsgrenzen voor BCF_{Km} worden geschat met behulp van bootstrapmethoden. Wanneer ook tussenliggende gegevenspunten beschikbaar zijn, kunnen betrouwbaarheidsgrenzen voor BCF_{Km} worden berekend als in de volledige test.

([2]) Zie aanhangsel 1 voor definities en eenheden.

▼M7

een PBT-werkgroep van de EU een ontwerpprotocol (38) ingediend voor het meten van het bioaccumulatiepotentieel van organische stoffen die slecht oplosbaar zijn in water en waarvoor de standaard bioconcentratiemethode met blootstelling via het water niet praktisch is, tezamen met een ondersteunend achtergronddocument (39). Als verdere motivering voor de methode werd genoemd dat de potentiële blootstelling aan dergelijke slecht oplosbare stoffen (d.w.z. log K_{OW} >5) in het milieu grotendeels via het voedsel kan plaatsvinden (vgl. (40) (41) (42) (43) (44)). In sommige gepubliceerde verordeningen inzake chemische stoffen wordt daarom verwezen naar blootstellingstests via het voer ([1]). Men moet evenwel beseffen dat blootstelling via de waterfase in de hier beschreven methode zorgvuldig wordt vermeden, zodat een uit deze testmethode verkregen BMF-waarde niet zonder meer kan worden vergeleken met een BMF-waarde uit een veldonderzoek (waarin blootstelling via het water en via het voedsel kunnen zijn gecombineerd).

Deze paragraaf van de onderhavige testmethode is gebaseerd op dit protocol (38) en is een nieuwe methode die niet voorkwam in de eerdere versie van TM C.13. Deze alternatieve test maakt het mogelijk om blootstelling via het voer rechtstreeks onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden te onderzoeken.

Potentiële onderzoekers dienen de punten 1 tot en met 14 van deze testmethode te raadplegen voor informatie over de situaties waarin de test met blootstelling via het voer kan worden verkozen boven de test met blootstelling via het water. Informatie over de verschillende overwegingen met betrekking tot stoffen wordt er uiteengezet en dient in overweging te worden genomen alvorens een test wordt uitgevoerd.

Het gebruik van radioactief gemerkte stoffen kan worden overwogen, waarvoor dezelfde overwegingen gelden als voor de methode met blootstelling via het water (vgl. punten 6 en 65).

De methode via het voer kan worden gebruikt om in één test meerdere stoffen te testen, mits aan bepaalde criteria wordt voldaan; hierop wordt nader ingegaan in punt 112. Voor de eenvoud wordt de methode hier beschreven voor een test waarin slechts één teststof wordt gebruikt.

De test via het voer is in veel opzichten, natuurlijk uitgezonderd de blootstellingsroute, gelijk aan de methode met blootstelling via het water. Veel aspecten van de hier beschreven methode vertonen daarom een overlap met de methode met blootstelling via het water die in de vorige paragraaf is beschreven. Er worden zo veel mogelijk kruisverwijzingen naar relevante punten in de vorige paragraaf gegeven, maar een zekere mate van duplicatie is onvermijdelijk ten behoeve van de leesbaarheid en begrijpelijkheid.

PRINCIPE VAN DE TEST

Er kan gebruik worden gemaakt van doorstroom- of semistatische omstandigheden (vgl. punt 4); doorstroomomstandigheden worden aanbevolen om de potentiële blootstelling aan de teststof via het water als gevolg van eventuele desorptie van verrijkt voer of fecaliën te beperken. De test bestaat uit twee fasen: de opnamefase (voer verrijkt met de teststof) en de depuratiefase (schoon, onbehandeld voer) (vgl. punt 16). In de opnamefase ontvangt een „testgroep” van vissen dagelijks een vastgesteld voer bestaande uit een commercieel visvoer van bekende samenstelling dat is verrijkt met de teststof. In het ideale geval consumeren de vissen al het aangeboden voedsel (vgl. punt 141). De vissen ontvangen vervolgens gedurende de depuratiefase het zuivere, onbehandelde commerciële visvoer. Net als bij de methode met blootstelling via het water kunnen, indien nodig, meerdere testgroepen worden gebruikt die voer krijgen dat met verschillende concentraties van de teststof is verrijkt, maar voor de meeste zeer hydrofobe organische teststoffen volstaat één testgroep (vgl. punten 49 en 107).

([1]) Voor de toepassing van Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH) (PB L 396 van 30.12.2006, blz. 1) wordt dit onderwerp behandeld in het richtsnoer voor informatie-eisen en chemische veiligheidsbeoordeling („Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment”), hoofdstukken R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1; en figuur R7.10-2.

▼M7

Indien semistatische omstandigheden worden gebruikt, moeten de vissen aan het einde van de opnamefase naar een nieuw medium en/of een nieuwe testbak worden overgebracht (indien het medium en/of de gebruikte apparatuur in de opnamefase door uitloging verontreinigd is met de teststof). De concentraties van de teststof in de vissen worden in beide fasen van de test gemeten. Naast de groep vissen die het verrijkte voer krijgt (de testgroep), wordt onder identieke omstandigheden ook een controlegroep vissen gehouden die op dezelfde wijze wordt gevoederd, behalve dat het commerciële visvoer voor de controlegroep niet wordt verrijkt met de teststof. Deze controlegroep maakt het mogelijk achtergrondniveaus van de teststof in niet-blootgestelde vissen te kwantificeren en dient ter vergelijking voor eventueel met de behandeling samenhangende negatieve effecten die in de testgroep(en) worden waargenomen ([1]). De controlegroep maakt het ook mogelijk groeisnelheidsconstanten tussen groepen te vergelijken om te controleren dat vergelijkbare hoeveelheden van het aangeboden voedsel zijn geconsumeerd (bij het geven van verklaringen voor verschillende groeisnelheidsconstanten moet ook rekening worden gehouden met mogelijke verschillen in smakelijkheid tussen de voeders; vgl. punt 138). Het is belangrijk dat de test- en controlegroepen tijdens de opnamefase en de depuratiefase voer met een gelijke voedingswaarde krijgen.

Uit de ervaring van de ontwikkelaars van de methode is gebleken dat een opnamefase van 7-14 dagen in het algemeen voldoende is (38) (39). Dit bereik zou de kosten van het uitvoeren van de test tot een minimum moeten beperken en tegelijk voor de meeste stoffen voldoende blootstelling verzekeren. In sommige gevallen kan de opnamefase echter worden verlengd (vgl. punt 127). Tijdens de opnamefase zal de concentratie van de teststof in de vissen mogelijk niet de stationaire toestand bereiken, en daarom worden de gegevensverwerking en de resultaten van deze methode gewoonlijk gebaseerd op een kinetische analyse van residuen in weefsels. (Noot: Vergelijkingen voor het schatten van de tijd die nodig is om een stationaire toestand te bereiken, kunnen hier op dezelfde wijze worden toegepast als voor de test met blootstelling via het water — zie aanhangsel 5.) De depuratiefase vangt aan wanneer de vissen voor het eerst niet-verrijkt voer krijgen, en duurt doorgaans niet meer dan 28 dagen of totdat de teststof niet meer kan worden gekwantificeerd in de hele vissen, indien dat tijdstip vroeger is. De depuratiefase kan worden verkort of worden verlengd tot meer dan 28 dagen, afhankelijk van de veranderingen in de gemeten concentraties van de chemische stof en in de grootte van de vissen in de loop van de tijd.

Deze methode maakt het mogelijk de voor de stof specifieke halveringsperiode ($t_{1/2}$, uit de depuratiesnelheidsconstante k_2) te bepalen, alsmede het rendement van de assimilatie (absorptie via de darm; a), de kinetische biomagnificatiefactor voor opnamen uit het voedsel (BMF_K), de voor groei gecorrigeerde kinetische biomagnificatiefactor voor opnamen uit het voedsel (BMF_{Kg}), en de voor vetgehalte gecorrigeerde ([2]) kinetische biomagnificatiefactor voor opnamen uit het voedsel (BMF_{KL}) (en/of de voor groei en vetgehalte gecorrigeerde kinetische biomagnificatiefactor voor opnamen uit het voedsel, BMF_{KgL}) voor de teststof in de vissen. Net als voor de methode met blootstelling via het water, zal de toename van de massa van de vissen tijdens de test leiden tot een afname van de concentratie van de teststof in groeiende vissen en zal de (kinetische) BMF dus worden onderschat als deze niet voor groei wordt gecorrigeerd (vgl. punten 162 en 163). Als wordt geraamd dat in de opnamefase de stationaire toestand werd bereikt, kan bovendien een indicatieve BMF in de stationaire toestand worden berekend. Er zijn benaderingen beschikbaar die het mogelijk maken een kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) te schatten op basis van gegevens die in het onderzoek via het voer zijn gegenereerd (bv. (44) (45) (46) (47) (48)). De voor- en nadelen van deze benaderingen worden besproken in aanhangsel 8.

([1]) De meeste teststoffen worden in het ideale geval niet aangetoond in het controlewater. Nuleffectbepalingen van de concentraties van de teststof mogen alleen relevant zijn voor van nature voorkomende materialen (bv. sommige metalen) en stoffen die algemeen voorkomen in het milieu.

([2]) Aangezien de BMF is gedefinieerd als de verhouding tussen de concentratie van een stof in een organisme en de concentratie daarvan in het voer van het organisme in de stationaire toestand, wordt rekening gehouden met het vetgehalte door te corrigeren voor het vetgehalte in het organisme en in het voer en is het dus juister om te spreken van een „correctie”. Deze benadering verschilt van „normalisatie” naar een bepaald vetgehalte van het organisme zoals geschiedt in de bioconcentratietest met blootstelling via het water.

▼M7

De test is in de eerste plaats opgezet voor apolaire organische stoffen die slecht oplosbaar zijn in water en die in vissen ongeveer eersteordeopname- en depuratiekinetiek vertonen. Indien een stof wordt getest die niet ongeveer eersteorde-opname- en depuratiekinetiek vertoont, moeten complexere modellen worden gebruikt (zie de referenties in aanhangsel 5) en moet advies van een biostatisticus en/of farmacokineticus worden ingewonnen.

De BMF wordt normaal gesproken bepaald met behulp van een bepaling van het gehalte van de teststof in de hele vis (op basis van het versgewicht). Indien relevant voor de doelstellingen van het onderzoek, kunnen specifieke weefsels (bv. spier, lever) worden bemonsterd, als de vis kan worden opgedeeld in een eetbaar en een niet-eetbaar gedeelte (vgl. punt 21). Bovendien kan het maag-darmkanaal worden verwijderd en apart worden geanalyseerd om de bijdrage aan de concentraties in de hele vissen te bepalen voor monsternamepunten aan het einde van de opnamefase en rond het begin van de depuratiefase, of in het kader van een massabalansaanpak.

Het vetgehalte van bemonsterde hele vissen moet worden gemeten zodat de concentraties kunnen worden gecorrigeerd voor vetgehalte, rekening houdend met het vetgehalte van zowel het voer als de vissen (vgl. punten 56 en 57 en aanhangsel 7).

Het gewicht van de bemonsterde vissen moet worden gemeten en geregistreerd en worden gekoppeld aan de concentratie van de teststof die voor die vis is bepaald (bv. met behulp van een unieke identificatiecode voor elke bemonsterde vis), om de groei te kunnen berekenen die tijdens de test kan optreden. De totale lengte van de vissen moet eveneens worden gemeten, indien dit mogelijk is ([1]). Gewichtsgegevens zijn ook nodig om de BCF tijdens de depuratiefase van de test via het voer te schatten.

GEGEVENS BETREFFENDE DE TESTSTOF

Er dient informatie over de teststof zoals beschreven in de punten 3 en 22 beschikbaar te zijn. Gewoonlijk is een analysemethode voor concentraties van de teststof in water niet nodig; vereist zijn methoden met een geschikte gevoeligheid voor het meten van concentraties in visvoer en visweefsel.

De methode kan worden gebruikt om meerdere stoffen in één test te testen. De teststoffen moeten echter met elkaar verenigbaar zijn, zodat ze niet met elkaar reageren of een andere chemische identiteit krijgen nadat ze als verrijking aan het visvoer zijn toegevoegd. Het is de bedoeling dat de gemeten resultaten voor elk van de stoffen die tezamen worden getest, niet sterk afwijkt van de resultaten die zouden zijn verkregen als voor elke teststof een afzonderlijke test was uitgevoerd. Door middel van voorafgaande analyses moet worden vastgesteld dat elke teststof kan worden teruggevonden in het meervoudig verrijkte voer en het visweefselmonster met i) hoge recovery's (bv. > 85 % van de nominale concentratie) en ii) de vereiste gevoeligheid voor de tests. De totale dosis van de samen geteste stoffen moet lager zijn dan de gecombineerde concentratie die toxische effecten zou kunnen veroorzaken (vgl. punt 51). Bij de proefopzet moet bovendien rekening worden gehouden met mogelijke negatieve effecten in vissen en het risico van interactie-effecten (bv. metabolische effecten) die verband houden met het gelijktijdig testen van meerdere stoffen. Het gelijktijdig testen van ioniseerbare stoffen moet worden vermeden. Op het punt van blootstelling is de methode ook geschikt voor complexe mengsels (vgl. punt 13, hoewel dezelfde beperkingen voor de analyse zullen gelden als voor andere methoden).

GELDIGHEID VAN DE TEST

Voor een valide test moet aan de volgende voorwaarden worden voldaan (vgl. punt 24):

— de schommelingen in de temperatuur van het water zijn minder dan ± 2 °C in de behandelings- en controlegroepen;

([1]) De totale lengte moet tijdens de test ook worden geregistreerd, omdat deze een goede indicator is voor het optreden van negatieve effecten.

▼M7

— de concentratie van de opgeloste zuurstof mag nooit minder bedragen dan 60 % van de verzadigingswaarde van lucht;

— de concentratie van de teststof in het visvoer vóór en aan het einde van de opnamefase ligt binnen ± 20 % van de nominale concentratie (op basis van ten minste drie monsters op beide tijdstippen);

— in voorafgaande analyses van het verrijkte voedsel moet een hoge mate van homogeniteit van de verdeling van de teststof in het voedsel zijn aangetoond; de concentraties van de stof in ten minste drie monsters die aan het begin van de test zijn genomen, mogen niet meer dan ± 15 % afwijken van het gemiddelde;

— in niet-verrijkt voer en in weefsels van controlevissen worden, vergeleken met monsters die zijn genomen van behandelde vissen, geen concentraties van de teststof aangetoond, of de teststof is alleen aanwezig op een niveau dat typisch is voor sporen;

— de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren (ziekte) moeten aan het einde van de test zowel in de testgroep van vissen als in de controlegroep minder dan 10 % bedragen; als de test om enige reden wordt verlengd, zijn de negatieve effecten in beide groepen ≤ 5 % per maand, en cumulatief ≤ 30 %. Substantiële verschillen in gemiddelde groei tussen de test- en controlegroep van bemonsterde vissen kunnen wijzen op een toxisch effect van de teststof.

REFERENTIESTOFFEN

Als een laboratorium de test niet eerder heeft uitgevoerd of als er sprake is van materiële wijzigingen (bijvoorbeeld een verandering van visstam of leverancier, een andere vissoort, een significante verandering in de grootte van de vissen, het visvoer of de verrijkingsmethode enz.), wordt aanbevolen een technische bekwaamheidsstudie uit te voeren met behulp van een referentiestof. De referentiestof wordt vooral gebruikt om vast te stellen of de techniek voor het verrijken van het voer geschikt is om maximale homogeniteit en biologische beschikbaarheid van de teststoffen te verzekeren. Een voorbeeld van een referentiestof die is gebruikt in geval van apolaire hydrofobe stoffen, is hexachloorbenzeen (HCB), maar andere stoffen waarvoor betrouwbare gegevens over opname en biomagnificatie beschikbaar zijn, moeten worden overwogen vanwege de gevaarlijke eigenschappen van HCB ([1]). Indien een referentiestof is gebruikt, moeten in het verslag van de test basisgegevens over de referentiestof worden opgenomen als voor teststoffen, met inbegrip van de naam, de zuiverheid, het CAS-nummer, de structuur en toxiciteitsgegevens (indien beschikbaar) van de referentiestof (vgl. punten 3 en 22).

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

Materialen en apparatuur moeten worden gebruikt zoals beschreven in de methode met blootstelling via het water (vgl. punt 26). Voor de test moet een doorstroom- of statisch verversingssysteem worden gebruikt dat een voldoende hoeveelheid verdunningswater naar de testbakken doet stromen. De stroomsnelheden moeten worden genoteerd.

Water

Het testwater moet worden gebruikt zoals beschreven in de methode met blootstelling via het water (vgl. punten 27-29). Het testmedium moet worden gekarakteriseerd als beschreven en de kwaliteit ervan moet gedurende de test constant blijven. Het natuurlijke gehalte aan zwevende deeltjes en het totaalgehalte aan organische koolstof dienen vóór aanvang van de test zo laag mogelijk te zijn (≤ 5 mg/l deeltjes; ≤ 2 mg/l totaalgehalte aan organische koolstof). TOC hoeft uitsluitend vóór de test te worden gemeten, in het kader van de karakterisering van het testwater (vgl. punt 53).

([1]) HCB is opgenomen in de bijlagen A en C bij het Verdrag van Stockholm en in de bijlagen I en III van Verordening (EG) nr. 850/2004 betreffende persistente organische verontreinigende stoffen (PB L 158 van 30.4.2004, blz. 7).

▼M7

Voer

Het is aan te bevelen een in de handel verkrijgbaar visvoer (zwevend en/of langzaam zinkend voer in korrelvorm) te gebruiken dat is gekarakteriseerd op het punt van ten minste zijn eiwit- en vetgehalte. Het voer moet bestaan uit korrels van uniforme grootte om de efficiëntie van de blootstelling via het voer te vergroten, dat wil zeggen, dat de vis meer van het voedsel zal eten in plaats van dat hij de grotere stukken zal opeten en de kleinere zal laten liggen. De korrels moeten een grootte hebben die geschikt is voor de grootte van de vissen bij aanvang van de test (voor vissen met een totale lengte van 3 tot 7 cm kan bijvoorbeeld voer worden gebruikt met een korreldiameter van ongeveer 0,6-0,85 mm, en voor vissen met een totale lengte van 6 tot 12 cm voer met een korreldiameter van 0,85-1,2 mm). De korrelgrootte kan aan het begin van de depuratiefase worden aangepast, afhankelijk van de groei van de vissen. Een voorbeeld van een geschikte samenstelling van het voer, zoals in de handel verkrijgbaar, wordt gegeven in aanhangsel 7. Bij de ontwikkeling van deze methode zijn veelal testvoeders met een totaal vetgehalte van 15 tot 20 % (g/g) gebruikt. Visvoer met zo'n hoge vetconcentratie is in sommige gebieden mogelijk niet verkrijgbaar. In dergelijke gevallen kunnen studies met een lagere vetconcentratie in het voer worden uitgevoerd, en indien nodig kan de dosering worden aangepast om de vissen gezond te houden (op basis van voorbereidende tests). Het totale vetgehalte van de voeders voor de test- en controlegroepen moet vóór aanvang van de test en aan het einde van de opnamefase worden gemeten en geregistreerd. In het verslag van de studie moeten de bijzonderheden over de bepaling van het nutriënten-,vocht-, vezel- en asgehalte, en indien mogelijk mineralen en residuen van pesticiden (bv. „standaard" prioritaire verontreinigende stoffen), worden opgenomen die door de leverancier van het commerciële voer worden verstrekt.

Wanneer het voer wordt verrijkt met teststof, moet al het mogelijk worden gedaan om te verzekeren dat het voer gedurende de test homogeen is. Bij de selectie van de concentratie van de teststof in het voer voor de testgroep moet rekening worden gehouden met de gevoeligheid van de analysetechniek, de toxiciteit (NOEC, indien bekend) en relevante fysisch-chemische gegevens van de teststof. Indien een referentiestof wordt gebruikt, wordt de referentiestof bij voorkeur toegevoegd in een concentratie van ongeveer 10 % van de concentratie van de teststof (of in elk geval zo laag als praktisch haalbaar is), rekening houdend met de gevoeligheid van de analyse (voor bijvoorbeeld hexachloorbenzeen is een concentratie van 1-100 μg/g in het voer aanvaardbaar bevonden; vgl. (47) voor meer informatie over de rendementen van de assimilatie van HCB).

De teststof kan op verschillende manieren als verrijking aan het visvoer worden toegevoegd, afhankelijk van de fysische kenmerken en oplosbaarheid van de stof (zie aanhangsel 7 voor meer bijzonderheden over verrijkingsmethoden):

— Indien de stof oplosbaar en stabiel is in triglyceriden, kan de stof worden opgelost in een kleine hoeveelheid visolie of eetbare plantaardige olie voordat de stof door het visvoer wordt gemengd. In dit geval moet zorgvuldig worden vermeden dat voedsel wordt bereid dat te veel vet bevat, rekening houdend met het natuurlijke vetgehalte van het verrijkte voer, door de kleinste bekende hoeveelheid olie toe te voegen die nodig is om een goede verdeling en homogeniteit van de teststof in het voer te bereiken, of;

— Het voeder kan worden verrijkt met behulp van een geschikt organisch oplosmiddel, zolang de homogeniteit en de biologische beschikbaarheid niet in het gedrang komen (door verdamping van het oplosmiddel kunnen zich in het voer (micro)kristallen van de teststof vormen en er is geen gemakkelijke manier om aan te tonen dat dit niet is gebeurd; vgl. (49)), of;

— Er kunnen niet-viskeuze vloeistoffen rechtstreeks aan het visvoer worden toegevoegd, maar deze moeten wel goed worden vermengd om de homogeniteit te vergroten en goede assimilatie te bevorderen. De mengtechniek moet homogeniteit van het verrijkte voer verzekeren.

▼M7

In enkele gevallen, bijvoorbeeld in geval van minder hydrofobe teststoffen die met grotere waarschijnlijkheid uit het voer zullen desorberen, kan het nodig zijn de bereide voederkorrels een coating te geven met een kleine hoeveelheid mais/visolie (zie punt 142). In zulke gevallen moet het controlevoer op dezelfde wijze worden behandeld en moet het uiteindelijke bereide voer worden gebruikt voor de meting van de vetconcentratie.

Indien een referentiestof wordt gebruikt, moeten de resultaten van de referentiestof vergelijkbaar zijn met gegevens in de literatuur van onderzoeken die onder min of meer dezelfde omstandigheden en met een vergelijkbare dosering zijn uitgevoerd (vgl. punt 45) en moeten parameters die specifiek zijn voor de referentiestof, voldoen aan de relevante criteria in punt 113 (3e, 4e en 5e gedachtestreepje).

Indien een olie of een oplosmiddel als draagvloeistof voor de teststof wordt gebruikt, moet dezelfde hoeveelheid van hetzelfde medium (exclusief de teststof) door het controlevoer worden gemengd, zodat het controlevoer gelijkwaardig blijft aan het verrijkte voer. Het is belangrijk dat de test- en controlegroepen tijdens de opnamefase en de depuratiefase voer met een gelijke voedingswaarde krijgen.

Het verrijkte voer moet worden bewaard onder omstandigheden waarbij de stabiliteit van de teststof in het voermengsel behouden blijft (bv. gekoeld) en deze omstandigheden moeten worden gerapporteerd.

Keuze van de vissoort

In de test via het voer mogen vissoorten worden gebruikt die zijn gespecificeerd voor blootstelling via het water (vgl. punt 32 en aanhangsel 3). Vóór de publicatie van deze testmethode zijn in bioaccumulatiestudies met organische stoffen via het voer veelal regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*), karper (*Cyprinus carpio*) en Amerikaanse dikkop-elrits („fathead minnow”, *Pimephales promelas*) gebruikt. De proefdiersoort moet een eetpatroon hebben dat leidt tot snelle consumptie van de toegediende portie voedsel om ervoor te zorgen dat factoren die van invloed zijn op de concentratie van de teststof in het voer (bv. uitloging naar het water en de mogelijkheid van blootstelling via het water), tot een minimum worden beperkt. Er moeten vissen worden gebruikt met een grootte en gewicht die binnen het aanbevolen bereik liggen (vgl. aanhangsel 3). De vissen mogen niet zo klein zijn dat analyses op individuele basis worden bemoeilijkt. Het testen van soorten in een levensfase met snelle groei kan de interpretatie van de gegevens bemoeilijken, en een hoge groeisnelheid kan de berekening van het rendement van de assimilatie beïnvloeden ([1]).

Leefomstandigheden van de vis

De criteria met betrekking tot acclimatisering, sterfte en de aanvaardbaarheid van ziekte zijn hetzelfde als voor de methode met blootstelling via het water voordat de test wordt uitgevoerd (vgl. punten 33-35).

UITVOERING VAN DE TEST

Voorstudie en bereikbepalingstest

Voorafgaande analyses zijn noodzakelijk om terugvinding van de stof in verrijkt voer/verrijkt visweefsel aan te tonen. Een bereikbepalingstest om een geschikte concentratie in het voer te selecteren is niet altijd nodig. Om aan te tonen dat geen negatieve effecten worden waargenomen en om de smakelijkheid van het verrijkte voer, de gevoeligheid van de analysemethode voor visweefsel en voer, en de selectie van geschikte doseringen en bemonsteringsintervallen tijdens de depuratiefase enz., te beoordelen, kunnen voorafgaande voederexperimenten worden uitgevoerd, maar dit is niet verplicht. Een voorafgaande studie kan waardevol zijn om de aantallen vissen te ramen die nodig zullen zijn voor de bemonstering

([1]) Door snelle groei tijdens de opnamefase zal de werkelijke dosering dalen tot onder de dosering die aan het begin van de blootstelling werd vastgesteld.

▼M7

tijdens de depuratiefase. Dit kan leiden tot een aanzienlijke daling van het gebruikte aantal vissen, vooral voor teststoffen die bijzonder ontvankelijk zijn voor metabolisme.

Blootstellingsomstandigheden

Duur van de opnamefase

In het algemeen is een opnamefase van 7-14 dagen voldoende, gedurende welke één groep vissen dagelijks het controlevoer krijgt en een andere groep vissen dagelijks het testvoer in een vaste dosering afhankelijk van de proefdiersoort en de experimentele omstandigheden, bv. 1-2 % van het lichaamsgewicht (versgewicht) in geval van regenboogforel. De dosering moet zo worden gekozen dat een snelle groei en een grote toename van het vetgehalte worden vermeden. Indien nodig, kan de opnamefase worden verlengd op basis van de praktische ervaring uit eerdere studies of kennis van de opname/depuratie van de teststof (of een analoge stof) in vissen. Het begin van de test is het tijdstip van de eerste verstrekking van verrijkt voer. Een experimentele dag loopt vanaf het tijdstip van de voedselverstrekking tot kort voor het tijdstip van de volgende voedselverstrekking (bv. één uur). De eerste experimentele dag van de opnamefase begint dus op het tijdstip van de eerste verstrekking van verrijkt voer en eindigt kort vóór de tweede verstrekking van verrijkt voer. In de praktijk eindigt de opnamefase kort vóór (bv. één uur) de eerste verstrekking van niet-verrijkt voer, omdat de vissen in de tussenliggende 24 uur verrijkt voer zullen blijven verteren en de teststof zullen blijven absorberen. Het is belangrijk ervoor te zorgen dat voor de analysemethode een voldoende hoge (niet-toxische) lichaamsconcentratie van de teststof wordt bereikt, zodat tijdens de depuratiefase een daling van ten minste een orde van grootte kan worden gemeten. In speciale gevallen kan een verlengde opnamefase (van maximaal 28 dagen) met aanvullende bemonstering worden gebruikt om inzicht te krijgen in de opnamekinetiek. Tijdens de opname mag de concentratie in de vissen geen stationaire toestand bereiken. Vergelijkingen voor het ramen van de tijd die nodig is om de stationaire toestand te bereiken, als indicatie voor de waarschijnlijke tijdsduur die nodig is om significante concentraties in de vissen te bereiken, kunnen hier worden toegepast zoals voor de test met blootstelling via het water (vgl. aanhangsel 5).

In sommige gevallen is mogelijk bekend dat de opname van de teststof in de vissen gedurende 7-14 dagen onvoldoende zal zijn om bij de gebruikte concentratie in het voer een concentratie in de vissen te bereiken die hoog genoeg is om tijdens de depuratie een daling van ten minste een orde van grootte te bepalen, hetzij door geringe analytische gevoeligheid hetzij door een laag rendement van de assimilatie. In dergelijke gevallen kan het nuttig zijn de initiële voederfase te verlengen tot meer dan 14 dagen of moet, in het bijzonder voor zeer omzetbare stoffen, een hogere concentratie in het voer worden overwogen. Er moet echter voor worden gezorgd dat de lichaamsconcentratie tijdens de opname niet hoger wordt dan de (geschatte) chronische concentratie zonder waargenomen effecten (NOEC) in visweefsel (vgl. punt 138).

Duur van de depuratiefase

De depuratiefase duurt gewoonlijk niet langer dan 28 dagen en begint zodra de testgroep vissen na de opnamefase zuiver, onbehandeld voer verstrekt krijgt. De depuratie begint met de eerste verstrekking van „niet-verrijkt” voer, in plaats van onmiddellijk na de laatste verstrekking van „verrijkt” voer, aangezien de vissen in de tussenliggende 24 uur het voedsel zullen blijven verteren en de teststof zullen blijven absorberen, zoals werd opgemerkt in punt 126. Het eerste monster in de depuratiefase wordt daarom kort voor de tweede verstrekking van niet-verrijkt voer genomen. Deze depuratiefase is bedoeld om stoffen te detecteren met een potentiële halveringsperiode van niet meer dan 14 dagen, wat overeenkomst met de halveringsperiode van bioaccumulerende stoffen ([1]), zodat een fase

([1]) In een studie met blootstelling via het water zou een halveringsperiode van 14 dagen overeenkomen met een BCF van ongeveer 10 000 l/kg bij gebruik van vissen van 1 g met een bijbehorende opnamesnelheid van ongeveer 500 l/kg/d (volgens de vergelijking van Sijm et al. (46)).

▼M7

van 28 dagen twee halveringsperioden van zulke stoffen bestrijkt. In geval van zeer sterk bioaccumulerende stoffen kan het nuttig zijn de depuratiefase te verlengen (indien de noodzaak daarvan is aangetoond door voorafgaande tests).

Indien een stof zo traag wordt gedepureerd dat in de depuratiefase geen exacte halveringsperiode kan worden bepaald, kan de informatie voor beoordelingsdoeleinden toch voldoende zijn om te duiden op een hoog bioaccumulatieniveau. Omgekeerd, als een stof zo snel wordt gedepureerd dat geen betrouwbare tijdstip-nul-concentratie (concentratie aan het einde van de opname/begin van de depuratie, $C_{0,d}$) en k_2 kunnen worden afgeleid, kan een conservatieve schatting van k_2 worden gemaakt (vgl. aanhangsel 7).

Indien analyses van vissen op eerdere momenten (bv. 7 of 14 dagen) laten zien dat de stof tot onder de bepaalbaarheidsgrens is gedepureerd voordat de volledige periode van 28 dagen is verstreken, kunnen de latere bemonsteringen worden geschrapt en kan de test worden beëindigd.

In enkele gevallen zal aan het einde van de opnameperiode (of bij de tweede bemonstering in de depuratiefase) geen meetbare opname van de teststof hebben plaatsgevonden. Als kan worden aangetoond dat: i) wordt voldaan aan de geldigheidscriteria in punt 113, en ii) het gebrek aan opname niet te wijten is aan een andere tekortkoming van de test (bv. duur van de opname niet lang genoeg, gebrekkige techniek voor het verrijken van het voer met als gevolg een slechte biologische beschikbaarheid, gebrek aan gevoeligheid van de analysemethode, geen voedselverbruik door de vissen enz.), kan de studie mogelijk worden beëindigd zonder dat deze opnieuw hoeft te worden uitgevoerd met een langere opnameduur. Indien uit voorafgaand onderzoek is gebleken dat hiervan sprake kan zijn, kan het aan te bevelen zijn om als onderdeel van een „massabalansaanpak” fecaliën, indien mogelijk, te analyseren op onverteerde teststof.

Aantal proefdieren

Net als bij de test met blootstelling via het water moeten vissen met een min of meer uniform lichaamsgewicht en min of meer uniforme lichaamslengte worden geselecteerd, waarbij het gewicht van de kleinste vis niet minder mag bedragen dan twee derde van dat van de grootste (vgl. punten 40-42).

Het totale aantal vissen voor de studie moet worden geselecteerd op basis van het bemonsteringsschema (een minimum van één monster aan het einde van de opnamefase en vier tot zes monsters gedurende de depuratiefase, maar afhankelijk van de duur van de fasen), rekening houdend met de gevoeligheid van de analysetechniek, de concentratie die waarschijnlijk aan het einde van de opnamefase wordt bereikt (op basis van eerder opgedane kennis) en de duur van de depuratiefase (indien deze kan worden geraamd op grond van eerder opgedane kennis). Bij elke bemonstering moeten vijf tot tien vissen worden bemonsterd, waarbij de groeiparameters (gewicht en totale lengte) worden gemeten voordat de concentratie van de teststof en het vetgehalte worden bepaald.

Door de inherente verschillen in de grootte, groeisnelheid en fysiologie tussen de vissen en de waarschijnlijke variatie in de hoeveelheid toegediend voer die elke vis consumeert, moeten op elk bemonsteringstijdstip ten minste vijf vissen uit de testgroep en vijf vissen uit de controlegroep worden bemonsterd om de gemiddelde concentratie en de variabiliteit daarin goed te kunnen vaststellen. De variabiliteit tussen de gebruikte vissen zal waarschijnlijk meer bijdragen aan de algemene ongecontroleerde variabiliteit in de test dan de variabiliteit die inherent is aan de gebruikte analysemethoden, en rechtvaardigt in sommige gevallen derhalve het gebruik van maximaal tien vissen per monsternamepunt. Als de achtergrondconcentraties van de teststof in de controlevissen aan het begin van de depuratie echter niet meetbaar zijn, kan chemische analyse van slechts twee of drie controlevissen op uitsluitend het laatste bemonsteringstijdstip voldoende zijn, zolang op alle monsternamepunten wel het gewicht en de totale lengte van een steekproef van achterblijvende controlevissen wordt bepaald (zodanig dat uit de testgroep en controlegroep hetzelfde aantal wordt bemonsterd voor groei). De vissen moeten worden bewaard en moeten individueel worden gewogen (zelfs als het nodig blijkt de resultaten van de monsters later samen te voegen) en hun totale lengte moet worden gemeten.

▼M7

Voor een standaardtest met bijvoorbeeld een depuratiefase van 28 dagen met vijf depuratiemonsters komt dit neer op een totaal van 59-120 vissen uit de testgroep en 50-110 vissen uit de controlegroep, aannemende dat de analysetechniek voor de stof toelaat het vetgehalte op basis van dezelfde vissen te bepalen. Indien de bepaling van het vetgehalte niet op dezelfde vissen kan worden uitgevoerd als de bepaling van de concentratie van de teststof, en indien het ook niet haalbaar is om uitsluitend controlevissen voor de bepaling van het vetgehalte te gebruiken (vgl. punt 56), zijn 15 vissen extra nodig (drie uit het visbestand aan het begin van de test, drie uit de controlegroep en drie uit de testgroep aan het begin van de depuratie, en drie uit de controlegroep en drie uit de testgroep aan het einde van het experiment). Aanhangsel 4 bevat een voorbeeld van een bemonsteringsschema met aantallen vissen.

Densiteit

Er moeten even grote water/visverhoudingen worden gebruikt als voor de methode met blootstelling via het water (vgl. punten 43 en 44). Hoewel het aantal vissen per liter water in deze test niet van invloed is op de blootstellingsconcentraties, is het aan te bevelen 0,1-1,0 g vis (versgewicht) per liter water per dag te gebruiken om adequate opgeloste zuurstofconcentraties in stand te houden en stress bij de testorganismen tot een minimum te beperken.

Testvoer en voeding

Gedurende de acclimatiseringsperiode moet de vissen een passend voer worden verstrekt zoals hierboven beschreven (punt 117). Indien de test wordt uitgevoerd onder doorstroomomstandigheden, moet de doorstroming tijdens het voeren van de vissen worden opgeschort.

Gedurende de test moet het voer voor de testgroep voldoen aan de hierboven beschreven voorwaarden (punten 116-121). Er moet niet alleen rekening worden gehouden met stofspecifieke factoren, analytische gevoeligheid, verwachte concentratie in het voer onder milieuomstandigheden en chronische toxiciteitsniveaus/lichaamsconcentratie, maar bij de selectie van de beoogde concentratie van de verrijking moet ook rekening worden gehouden met de smakelijkheid van het voedsel (zodat de vissen niet weigeren het voedsel te eten). De nominale concentratie van de verrijking met de teststof moet in het verslag worden gedocumenteerd. De ervaring heeft geleerd dat 1-1000 μg/g een praktisch werkbereik voor verrijkingsconcentraties is voor teststoffen die geen specifiek toxisch mechanisme vertonen. Voor stoffen die via een niet-specifiek mechanisme werken, mogen de niveaus van de residuen in weefsels niet hoger zijn dan 5 μmol/g vet, aangezien hogere niveaus aan residuen waarschijnlijk chronische effecten veroorzaken (19) (48) (50) [1]. Voor andere stoffen dienen negatieve effecten als gevolg van geaccumuleerde blootstelling te worden voorkomen (vgl. punt 127). Dit geldt in het bijzonder indien gelijktijdig meer dan één stof wordt getest (vgl. punt 112).

De aangewezen hoeveelheid teststof kan op drie manieren als verrijking aan het visvoer worden toegevoegd, zoals beschreven in punt 119 en aanhangsel 7. De gebruikte methoden en procedures voor het verrijken van het voer moeten in het verslag worden gedocumenteerd. De controlevissen krijgen onbehandeld voer verstrekt, dat een gelijke hoeveelheid niet-verrijkt oliemedium bevat als het verrijkte voer voor de opnamefase, indien olie wordt gebruikt, of dat is behandeld met „zuiver" oplosmiddel indien bij de bereiding van het voer voor de testgroep een oplosmiddelmedium wordt gebruikt. De concentratie van de teststof in het behandelde en het onbehandelde voer moet vóór het begin en aan het einde van de opnamefase ten minste in drievoud worden bepaald. Na de blootstelling aan het behandelde voer (opnamefase) krijgen de vissen (beide groepen) onbehandeld voer verstrekt (depuratiefase).

De vissen krijgen een vaste rantsoen (afhankelijk van de soort; bijvoorbeeld ongeveer 1-2 % van het lichaamsgewicht (versgewicht) per dag in het geval van regenboogforel). De dosering moet zo worden gekozen dat een snelle groei

[1] Aangezien de werkelijke inwendige concentratie in vissen uitsluitend kunnen worden bepaald nadat de test is uitgevoerd, is een schatting van de verwachte inwendige concentratie nodig (bijvoorbeeld op basis van de geraamde BMF en de concentratie in het voer; vgl. vergelijking A5.8 in aanhangsel 5).

▼M7

en een grote toename van het vetgehalte worden vermeden. De exacte dosering die tijdens het experiment wordt ingesteld, moet worden geregistreerd. De eerste voedselverstrekking moet worden gebaseerd op de geplande metingen van het gewicht van het visbestand vlak vóór het begin van de test. De hoeveelheid voer moet bij elke bemonstering worden aangepast aan het versgewicht van de bemonsterde vissen om rekening te houden met groei tijdens het experiment. Het gewicht en de lengte van de vissen in de test- en controlebakken kan worden geraamd uit het gewicht en de totale lengte van de vissen die bij elke bemonstering worden gebruikt; de vissen die in de test- en controlebakken achterblijven, worden niet gewogen of gemeten. Het is belangrijk gedurende het experiment dezelfde vastgestelde dosering te handhaven.

Bij de verstrekking van voer moet erop worden gelet dat de vissen al het aangeboden voedsel zichtbaar consumeren, om te verzekeren dat in de berekeningen de juiste ingestiesnelheden worden gebruikt. Bij de selectie van een dosering die garandeert dat alle voedsel van een dagelijkse voedselverstrekking wordt geconsumeerd, moet rekening worden gehouden met voorafgaande voederexperimenten en eerder opgedane ervaring. Indien voedsel consequent niet volledig worden opgegeten, kan het raadzaam zijn de dosis te spreiden over een extra voederperiode op elke experimentele dag (bijvoorbeeld door voedselverstrekking eenmaal daags te vervangen door verstrekking van de helft van de dosis tweemaal daags). Indien dit noodzakelijk is, moet de tweede voedselverstrekking plaatsvinden op een vast tijdstip dat zodanig is dat de tijd tot de bemonstering van de vissen maximaal is (de tijd voor de tweede voedselverstrekking wordt bijvoorbeeld bepaald op een tijdstip in de eerste helft van een experimentele dag).

Hoewel de vissen het voedsel gewoonlijk snel consumeren, is het toch belangrijk ervoor te zorgen dat de teststof aan het voedsel geadsorbeerd blijft. Er moet zoveel mogelijk worden gezorgd dat de teststof niet uit het voedsel in het water wordt gedispergeerd, waardoor de vissen zowel via het water als via het voer aan concentraties van de teststof zouden kunnen worden blootgesteld. Dit kan worden bereikt door niet-opgegeten voedsel (en fecaliën) binnen één uur, maar bij voorkeur binnen 30 minuten na de voedselverstrekking uit de test- en controlebakken te verwijderen. Daarnaast kan een systeem worden gebruikt waarin het water voortdurend via een actief koolstoffilter wordt gereinigd om 'opgeloste' verontreinigende stoffen te absorberen. Doorstroomsystemen kunnen helpen om snel voedseldeeltjes en opgeloste stoffen weg te spoelen ([1]). In sommige gevallen kan een enigszins gewijzigde methode om voedsel te verrijken helpen om dit probleem te verminderen (zie punt 119).

Licht en temperatuur

Net als voor de methode met blootstelling via het water (vgl. punt 48), wordt een fotoperiode van 12 tot 16 uur aanbevolen en een temperatuur (± 2 °C) die geschikt is voor de gebruikte proefdiersoort (vgl. aanhangsel 3). Het type belichting en de karakteristieken van de belichting dienen bekend te zijn en te worden gedocumenteerd.

Controles

Er moet één controlegroep worden gebruikt met vissen die hetzelfde voedsel krijgen als de testgroep, maar zonder dat daarin de teststof aanwezig is. Indien een olie- of oplosmiddelmedium wordt gebruikt om het voer voor de testgroep te verrijken, moet het voedsel voor de controlegroep op precies dezelfde manier worden behandeld, maar zonder aanwezigheid van de teststof, zodat de voeders van de testgroep en controlegroep gelijkwaardig zijn (vgl. punten 121 en 139).

([1]) Aanwezigheid van de teststof in het testmedium als gevolg van uitscheiding door de vissen of uitloging uit het voedsel kan mogelijk niet helemaal worden voorkomen. Een optie is daarom aan het einde van de opnameperiode de concentratie van de teststof in het water te meten, in het bijzonder als een semistatische opzet wordt gebruikt, om te helpen vaststellen of blootstelling via het water heeft plaatsgehad.

▼M7

Frequentie van de metingen van de waterkwaliteit

De voorwaarden beschreven in de methode met blootstelling via het water zijn ook hier van toepassing, behalve dat de TOC uitsluitend vóór de test hoeft te worden gemeten in het kader van de karakterisering van het testwater (vgl. punt 53).

Bemonstering en analyse van de vissen en het voer

Analyse van de voermonsters

Monsters van de test- en controlevoeders moeten ten minste vóór het begin en aan het einde van de opnamefase en ten minste in drievoud worden geanalyseerd op de concentratie van de teststof en op het vetgehalte. In het verslag moeten de analysemethoden en procedures om de homogeniteit van het voer te waarborgen worden beschreven.

De teststofconcentratie in de monsters wordt bepaald met behulp van de erkende en gevalideerde methode. Er moet een voorstudie worden uitgevoerd om de bepaalbaarheidsgrens, het percentage recovery, interferenties en de analytische variabiliteit in de beoogde monstermatrix vast te stellen. Indien een radioactief gemerkt materiaal wordt getest, moeten vergelijkbare overwegingen als die voor de methode met blootstelling via het water worden gemaakt, waarbij analyse van het water wordt vervangen door analyse van het voer (vgl. punt 65).

Analyse van de vissen

Bij elke bemonstering van vissen worden 5-10 vissen uit de blootstellings- en controlegroepen bemonsterd (in sommige gevallen kunnen de aantallen controlevissen worden verlaagd; vgl. punt 134).

De bemonsteringen moeten op elke experimentele dag op hetzelfde tijdstip (ten opzichte van het voedertijdstip) plaatsvinden en wel op een zodanig tijdstip dat de waarschijnlijkheid dat voedsel tijdens de opnamefase en het eerste begin van de depuratiefase in de darm achterblijft, tot een minimum wordt beperkt, teneinde foute bijdragen aan de totale concentraties van de teststof te voorkomen (dat wil zeggen, bemonsterde vissen moeten aan het einde van een experimentele dag worden verwijderd, in gedachten houdend dat een experimentele dag begint op het tijdstip van voedselverstrekking en eindigt op het tijdstip van de volgende voedselverstrekking, ongeveer 24 uur later; de depuratie begint bij de eerste verstrekking van niet-verrijkt voedsel; vgl. punt 128). Het eerste monster in de depuratiefase (genomen kort voor de tweede verstrekking van niet-verrijkt voer) is van belang omdat extrapolatie naar één dag vóór deze meting wordt gebruikt om de tijdstip-nul-concentratie te schatten ($C_{0,d}$, de concentratie in de vissen aan het einde van de opnamefase/begin van de depuratiefase). Facultatief kan het maag-darmkanaal van de vissen worden verwijderd en apart worden geanalyseerd aan het einde van de opnamefase en op dag 1 en dag 3 van de depuratiefase.

Bij elke bemonstering moeten de vissen uit beide testbakken worden verwijderd en op dezelfde wijze worden behandeld als beschreven in de methode met blootstelling via het water (vgl. punten 61-63).

Concentraties van de teststof in hele vissen (versgewicht) worden ten minste aan het einde van de opnamefase en gedurende de depuratiefase in zowel de controle- als de testgroep gemeten. Het is aan te bevelen gedurende depuratiefase vier tot zes monsternamepunten te gebruiken (bv. 1, 3, 7, 14 en 28 dagen). Facultatief kan een aanvullend monsternamepunt na 1-3 dagen opname worden opgenomen om nog dicht bij het begin van de blootstellingsperiode uit de lineaire fase van de opname voor de vissen het rendement van de assimilatie te schatten. Er zijn twee belangrijke afwijkingen van het schema: i) indien de opnamefase is verlengd om de opnamekinetiek te onderzoeken, zullen er gedurende de opnamefase aanvullende monsternamepunten zijn en zullen er dus meer vissen moeten worden opgenomen (vgl. punt 126); ii) indien de studie aan het einde van de opnamefase is beëindigd omdat er geen meetbare opname was (vgl. punt 131). De individuele vissen die worden bemonsterd, moeten worden gewogen (en hun totale lengte moet worden gemeten) zodat de groeisnelheidsconstanten kunnen worden bepaald. De concentraties van de stof in specifiek visweefsel (eetbare en

▼M7

niet-eetbare gedeelten) kunnen ook aan het einde van de opnamefase en op geselecteerde depuratietijdstippen worden gemeten. Indien een radioactief gemerkt materiaal wordt getest, gelden vergelijkbare overwegingen als voor de methode met blootstelling via het water, waarbij analyse van het water wordt vervangen door analyse van het voer (vgl. punt 65).

Voor het periodiek gebruik van een referentiestof (vgl. punt 25) geniet het de voorkeur de concentraties in de testgroep te meten aan het einde van de opnamefase en op alle depuratietijdstippen die voor de teststof zijn gespecificeerd (hele vissen); concentraties in de controlegroep hoeven alleen aan het einde van de opnamefase te worden bepaald (hele vissen). In bepaalde situaties (bijvoorbeeld indien de analysemethoden voor de teststof en referentiestof niet verenigbaar zijn, zodat meer vissen nodig zijn om het bemonsteringsschema uit te voeren) kan als volgt een andere aanpak worden gebruikt om het vereiste aantal extra vissen tot een minimum te beperken. Concentraties van de referentiestof worden tijdens de depuratie uitsluitend gemeten op dag 1 en dag 3 en op nog twee monsternamepunten, die zodanig zijn gekozen dat voor de referentiestof betrouwbare schattingen van de tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,d}$) en k_2 kunnen worden verkregen.

Indien mogelijk, moet het vetgehalte van de afzonderlijke vissen worden bepaald bij elke bemonstering, of ten minste aan het begin en het einde van de opnamefase en aan het einde van de depuratiefase (vgl. punten 56 en 67). Afhankelijk van de analysemethode (zie punt 67 en aanhangsel 4) kunnen voor de bepaling van het vetgehalte en de concentratie van de teststof mogelijk dezelfde vissen worden gebruikt. Dit heeft de voorkeur, omdat dit het aantal vissen tot een minimum beperkt. Mocht dit niet mogelijk zijn, dan kan dezelfde aanpak worden gebruikt als hierboven is beschreven voor de methode met blootstelling via het water (zie punt 56 voor opties voor deze alternatieve vetmeting). In het verslag moet worden opgenomen welke methode werd gebruikt om het vetgehalte te kwantificeren.

Kwaliteit van de analysemethode

Er moeten experimentele controles worden uitgevoerd om de specificiteit, nauwkeurigheid, precisie en reproduceerbaarheid van de voor de stof specifieke analysetechniek, alsook recovery's van de teststof uit zowel het voedsel als de vissen te verzekeren.

Meting van de groei van de vissen

Aan het begin van de test moet een steekproef van vissen uit het visbestand worden gewogen (en moet hun totale lengte worden gemeten). Deze vissen moeten kort (bv. één uur) voor de eerste verstrekking van verrijkt voer worden bemonsterd en worden toegewezen aan experimentele dag 0. Het aantal vissen voor deze bemonstering moet ten minste hetzelfde zijn als dat voor de bemonsteringen tijdens de test. Sommige van deze vissen kunnen dezelfde zijn als gebruikt voor de bepaling van het vetgehalte vóór het begin van de opnamefase (vgl. punt 153). Op elk bemonsteringstijdstip worden de vissen eerst gewogen en wordt hun lengte gemeten. Voor elke vis dient het gemeten gewicht (en de gemeten lengte) te worden gekoppeld aan de bepaalde concentratie van de teststof (en het bepaalde vetgehalte, voor zover van toepassing), bijvoorbeeld met behulp van een unieke identificatiecode voor elke bemonsterde vis. De metingen van deze bemonsterde vissen kunnen worden gebruikt om het gewicht (en de lengte) te schatten van de vissen die in de test- en controlebakken achterblijven.

Evaluatie van het experiment

De sterfte moet dagelijks worden geobserveerd en geregistreerd. Er moeten aanvullende observaties voor negatieve effecten worden verricht en geregistreerd, bijvoorbeeld voor afwijkend gedrag of afwijkende pigmentatie. Vissen worden als dood beschouwd indien er geen ademhaling meer is en geen reactie op een lichte mechanische stimulus meer kan worden waargenomen. Elke dode of duidelijk stervende vis moet worden verwijderd.

▼M7

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

De testresultaten worden gebruikt om de depuratiesnelheidsconstante (k_2) af te leiden als functie van het totale versgewicht van de vissen. De groeisnelheidsconstante, k_g, op basis van de gemiddelde gewichtstoename van de vissen, wordt berekend en gebruikt om de voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante, k_{2g}, te berekenen, indien van toepassing. Daarnaast moeten het rendement van de assimilatie (a, absorptie uit de darm), de kinetische biomagnificatiefactor (BMF_K) (indien nodig gecorrigeerd voor groei, BMF_{Kg}), de voor vetgehalte gecorrigeerde waarde (BMF_{KL} of BMF_{KgL}, indien gecorrigeerd voor groeiverdunning) en de dosering worden gerapporteerd. Indien een schatting kan worden gemaakt van de tijd die nodig is om in de opnamefase de stationaire toestand te bereiken (bv. 95 % van de stationaire toestand of $t_{95} = 3{,}0/k_2$), kan ook een schatting van de BMF in stationaire toestand (BMF_{SS}) worden opgenomen (vgl. punten 105 en 106 en aanhangsel 5), indien de t_{95}-waarde aangeeft dat mogelijk stationaire omstandigheden zijn bereikt. Op deze BMF_{SS} moet dezelfde correctie voor het vetgehalte worden toegepast als op de kinetisch afgeleide BMF (BMF_K), zodat een voor vetgehalte gecorrigeerde waarde, BMF_{SSL}, wordt verkregen (er zij opgemerkt dat er geen overeengekomen procedure beschikbaar is voor het corrigeren van een BMF in stationaire toestand voor groeiverdunning). In aanhangsel 7 worden formules en voorbeeldberekeningen gegeven. Er zijn benaderingen die het haalbaar maken om een kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) te schatten uit gegevens die in het onderzoek via het voer zijn gegenereerd. Dit wordt besproken in aanhangsel 8.

Gewichts- en lengtegegevens van de vissen

Het versgewicht en de lengte van afzonderlijke vissen voor alle tijdsperioden worden apart in tabellen geplaatst voor de testgroep en controlegroep en voor alle bemonsteringsdagen tijdens de opnamefase (visbestand voor het begin van de opname; controlegroep en testgroep voor einde van de opname en, indien uitgevoerd, de vroege fase (bv. dag 1-3 van de opname) en depuratiefase (bv. dagen 1, 2, 4, 7, 14 en 28, voor de controlegroep en testgroep)). Voor de doeleinden van het corrigeren voor groeiverdunning geniet het gewicht de voorkeur als maat voor de groei. Zie de punten 162 en 163 en aanhangsel 5 voor de gebruikte methode(n) voor het corrigeren van gegevens voor groeiverdunning.

Gegevens over de concentratie van de teststof in de vissen

Metingen van residuen van de teststof in afzonderlijke vissen (of in samengevoegde vismonsters indien metingen bij afzonderlijke vissen niet mogelijk zijn), uitgedrukt in concentratie ten opzichte van het versgewicht (g/g), worden voor de testvissen en controlevissen voor de afzonderlijke bemonsteringstijdstippen in tabellen geplaatst. Indien voor elke bemonsterde vis een bepaling van het vetgehalte is uitgevoerd, kunnen afzonderlijke voor het vetgehalte gecorrigeerde concentraties, uitgedrukt in vetconcentratie (g/g vet), worden afgeleid en in een tabel worden opgenomen.

— Metingen van residuen van de teststof in afzonderlijke vissen (of samengevoegde vismonsters indien metingen bij afzonderlijke vissen niet mogelijk zijn, vgl. punt 66) voor de depuratiefase worden geconverteerd naar hun natuurlijke logaritme en in een grafiek uitgezet tegen de tijd (dag). Indien uit een visuele inspectie van de grafiek duidelijke uitschieters naar voren komen, kan een statistisch geldige uitschietertoets worden toegepast om verkeerde gegevenspunten te verwijderen en moet een rechtvaardiging voor het weglaten van deze gegevens worden gedocumenteerd.

— Voor de natuurlijke logaritme van de concentratie vs. de depuratie(dag) wordt een lineaire kleinste-kwadratencorrelatie berekend. De helling en het intercept van de lijn worden gerapporteerd als de algemene depuratiesnelheidsconstante (k_2) en de natuurlijke logaritme van de afgeleide tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,d}$) (vgl. aanhangsel 5 en aanhangsel 7 voor verdere bijzonderheden). Indien dit niet mogelijk mocht zijn omdat de concentraties voor de tweede bemonstering in de depuratiefase tot onder de bepaalbaarheidsgrens dalen, kan een conservatieve schatting van k_2 worden gemaakt (vgl. aanhangsel 7).

— De varianties van de helling en van het intercept van de lijn worden berekend met behulp van standaard statistische procedures, en de 90 %- (of 95 %-) betrouwbaarheidsintervallen rond deze resultaten worden beoordeeld en gepresenteerd.

▼M7

— De gemiddelde gemeten concentratie in de vissen voor de laatste dag van de opname (gemeten tijdstip-nul-concentratie, $C_{0,m}$) wordt ook berekend en wordt vergeleken met de afgeleide waarde $C_{0,d}$. In geval de afgeleide waarde lager is dan de gemeten waarde, kan het verschil wijzen op de aanwezigheid van onverteerd verrijkt voedsel in de darm. Indien de afgeleide waarde heel veel hoger is dan de gemeten waarde, kan dit een aanwijzing zijn dat de waarde die is afgeleid uit de lineaire regressie met de depuratiegegevens, onjuist is en opnieuw moet worden bepaald (zie aanhangsel 7).

Depuratiesnelheid en biomagnificatiefactor

Om uit de gegevens de biomagnificatiefactor te berekenen, moet eerst het rendement van de assimilatie (absorptie van teststof via de darm, α) worden verkregen. Daarvoor moet vergelijking A7.1 in aanhangsel 7 worden gebruikt, waarvoor de afgeleide concentratie in de vissen op tijdstip nul van de depuratiefase ($C_{0,d}$), de (algemene) depuratiesnelheidsconstante (k_2), de concentratie in het voedsel ($C_{voedsel}$), de voedselingestiesnelheidsconstante (I) en de duur van de opnameperiode (t) bekend moeten zijn. De helling en het intercept van het lineaire verband tussen de natuurlijke logaritme van de concentratie en de depuratietijd worden gerapporteerd als de algemene depuratiesnelheidsconstante (k_2 = helling) en tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,d} = e^{intercept}$), zoals hierboven. De afgeleide waarden moeten worden gecontroleerd op hun biologische aannemelijkheid (het rendement van de assimilatie als fractie mag bijvoorbeeld niet groter dan 1 zijn). I wordt berekend door de massa van het voer te delen door de massa van de vissen die elke dag worden gevoederd (indien ze 2 % van hun lichaamsgewicht aan voer krijgen, zal I gelijk zijn aan 0,02). Het kan echter nodig zijn de in de berekening gebruikte dosering aan te passen voor de groei van de vissen (dit kan geschieden met de bekende groeisnelheidsconstante om het gewicht van de vissen op elk tijdstip tijdens de opnamefase te schatten; vgl. aanhangsel 7). In gevallen waarin k_2 en $C_{0,d}$ niet kunnen worden afgeleid omdat bijvoorbeeld de concentraties voor de tweede bemonstering tijdens de depuratie zijn gedaald tot onder de aantoonbaarheidsgrens, kan een conservatieve schatting van k_2 worden gemaakt en een „bovengrens” voor BMF_k worden geschat (vgl. aanhangsel 7).

Wanneer het rendement van de assimilatie (α) is verkregen, kan de biomagnificatiefactor worden berekend door α te vermenigvuldigen met de ingestiesnelheidsconstante (I) en te delen door de (algemene) depuratiesnelheidsconstante (k_2). De voor groei gecorrigeerde biomagnificatiefactor wordt op dezelfde manier berekend, maar met gebruik van de voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (k_{2g}; vgl. punten 162 en 163). Een alternatieve schatting van het rendement van de assimilatie kan worden afgeleid als een weefselanalyse werd verricht op de vissen die werden bemonsterd in de vroege, lineaire fase van de opnamefase; vgl. punten 151 en aanhangsel 7. Deze waarde staat voor een onafhankelijke schatting van het rendement van de assimilatie voor een in wezen niet-blootgesteld organisme (d.w.z. de vissen bevinden zich ongeveer aan het begin van de opnamefase). Het rendement van de assimilatie geschat uit de depuratiegegevens wordt gewoonlijk gebruikt om de BMF af te leiden.

Correctie voor vetgehalte en correctie voor groeiverdunning

De groei van de vissen tijdens de depuratiefase kan de concentraties van chemische stoffen in de vissen verlagen, met als effect dat de algemene depuratiesnelheidsconstante, k_2, groter is dan zij zou zijn als zij uitsluitend werd ontleend aan verwijderingsprocessen (bv. metabolisme, egestie) (vgl. punt 72). Het vetgehalte van testvissen (dat sterk in verband wordt gebracht met de bioaccumulatie van hydrofiele stoffen) en het vetgehalte van het voer kunnen in de praktijk zoveel schommelen dat het noodzakelijk is ervoor te corrigeren om bioconcentratiefactoren op een zinvolle manier te kunnen presenteren. De biomagnificatiefactor moet worden gecorrigeerd voor groeiverdunning (net als de kinetische BCF in de methode met blootstelling via het water) en worden gecorrigeerd voor het vetgehalte van het voer in verhouding tot dat van de vissen (de vetcorrectiefactor). Vergelijkingen voor en voorbeelden van deze berekeningen zijn te vinden in respectievelijk aanhangsel 5 en aanhangsel 7.

Om voor groeiverdunning te corrigeren moet de voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (k_{2g}) worden berekend (zie aanhangsel 5 voor vergelijkingen).

▼M7

Deze voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (k_{2g}) wordt vervolgens gebruikt om de voor groei gecorrigeerde biomagnificatiefactor te berekenen, als in punt 73. In sommige gevallen is deze aanpak niet mogelijk. Een alternatieve aanpak waarbij niet voor groeiverdunning hoeft te worden gecorrigeerd, maakt gebruik van depuratiegegevens met betrekking tot de massa van de teststof per vis (op basis van hele vissen) in plaats van de gebruikelijke (concentratie)gegevens met betrekking tot de massa van de teststof per massaeenheid vis. Deze aanpak kan probleemloos worden gebruikt, aangezien in tests die volgens deze methode worden uitgevoerd, de geregistreerde weefselconcentraties dienen te worden gekoppeld aan het gewicht van de afzonderlijke vissen. De eenvoudige procedure hiervoor is uiteengezet in aanhangsel 5. Er zij opgemerkt dat k_2 toch moet worden geschat en gerapporteerd, zelfs als deze alternatieve aanpak wordt gebruikt.

Om voor het vetgehalte van het voer en de vissen te corrigeren wanneer het vetgehalte niet voor alle bemonsterde vissen is bepaald, worden de gemiddelde vetfracties (g/g) in de vissen en in het voer afgeleid ([1]). De vetcorrectiefactor (L_c) wordt vervolgens berekend door de gemiddelde vetfractie van de vissen te delen door de gemiddelde vetfractie van het voer. De biomagnificatiefactor, al dan niet voor groei gecorrigeerd, naar gelang van hetgeen van toepassing is, wordt gedeeld door de vetcorrectiefactor om de voor vetgehalte gecorrigeerde biomagnificatiefactor te berekenen.

Indien de bepalingen van de stofconcentraties en het vetgehalte bij elk monsternamepunt op dezelfde vissen werden verricht, kunnen de voor vetgehalte gecorrigeerde gegevens van weefsels voor afzonderlijke vissen worden gebruikt om rechtstreeks een voor vetgehalte gecorrigeerde BMF te berekenen (vgl. (37)). De grafiek van de voor vetgehalte gecorrigeerde concentratiegegevens levert $C_{0,d}$ op op basis van vetgehalte en k_2. De wiskundige analyse kan daarna worden voortgezet met behulp van dezelfde vergelijkingen in aanhangsel 7, maar het rendement van de assimilatie (a) wordt berekend met behulp van de voedselingestiesnelheidsconstante genormaliseerd naar vetgehalte (I_{lipiden}) en de concentratie in het voer op basis van het vetgehalte ($C_{\text{voedsel-lipiden}}$). Voor vetgehalte gecorrigeerde parameters worden daarna op dezelfde manier gebruikt om BMF te berekenen (opgemerkt zij dat correctie van de groeisnelheidsconstante ook moet worden toegepast op de vetfractie in plaats van het versgewicht van de vissen om de voor vetgehalte en groei gecorrigeerde BMF_{KgL} te berekenen).

Interpretatie van de resultaten

De gemiddelde groei mag zowel in de testgroep als in de controlegroep in beginsel niet significant verschillen om toxische effecten uit te sluiten. De groeisnelheidsconstanten of de groeicurven van de twee groepen moeten worden vergeleken met behulp van een passende procedure ([2]).

Testverslag

Na afloop van de studie wordt een eindverslag opgesteld met daarin informatie over de *teststof*, *proefdiersoort* en *testomstandigheden* zoals vermeld in punt 81 (als voor de methode met blootstelling via het water). Daarnaast is de volgende informatie vereist:

Teststof:

— alle informatie over de stabiliteit van de teststof in het bereide voer;

([1]) Deze aanpak is specifiek voor onderzoek via het voer en wijkt af van de procedure die wordt gevolgd bij blootstelling via het water, vandaar dat er gesproken wordt van „correctie” in plaats van „normalisatie” om verwarring te voorkomen — zie ook voetnoot in punt 106.

([2]) Er kan een *t*-toets op de groeisnelheidsconstanten worden uitgevoerd om te toetsen of de groei tussen de controle- en testgroepen verschilt, of er kan een *F*-toets worden uitgevoerd in geval van een variantieanalyse. Indien nodig kan een F-toets of likelihood-ratiotoets worden gebruikt als hulpmiddel bij het kiezen van het juiste groeimodel (monografie 54 van de OESO, (32)).

▼M7

Testomstandigheden:

— de nominale concentratie van de stof in het voer, de gebruikte methode om het voer te verrijken, de hoeveelheid (vet)medium die werd gebruikt bij het verrijken van het voer (indien gebruikt), de metingen van de concentratie van de teststof in het verrijkte voer voor elke analyse (ten minste in drievoud vóór het begin van het onderzoek en aan het einde van de opnamefase) en gemiddelde waarden;

— indien gebruikt, het type en de kwaliteit (klasse, leverancier enz.) van de olie die of het oplosmiddel dat als draagvloeistof is gebruikt voor het verrijken van het voer;

— het gebruikte type voer (globale analyse [1]), klasse of kwaliteit, leverancier enz.), de dosering tijdens de opnamefase, de hoeveelheid voedsel die werd toegediend en de toedieningsfrequentie (met inbegrip van eventuele aanpassingen op basis van het gewicht van de bemonsterde vissen);

— de tijdstippen waarop de vissen werden verzameld en gedood voor chemische bepalingen voor elk monsternamepunt (bv. één uur vóór de voedselverstrekking van de volgende experimentele dag);

Resultaten:

— resultaten van eventuele voorbereidende experimenten;

— informatie over eventuele waargenomen negatieve effecten;

— een volledige beschrijving van alle gebruikte procedures voor chemische analyses, met inbegrip van aantoonbaarheids- en bepaalbaarheidsgrenzen, variabiliteit en terugvinding;

— gemeten vetconcentraties in het voedsel (verrijkt en controlevoer), voor afzonderlijke vissen, met gemiddelde waarden en standaardafwijkingen;

— gegevens in tabelvorm over het gewicht (en de lengte) van de vissen gekoppeld aan afzonderlijke vissen, zowel voor controle- als blootstellingsgroepen (bijvoorbeeld met behulp van een unieke identificatiecode voor elke vis) en berekeningen, afgeleide groeisnelheidsconstante(n) en 95 %-betrouwbaarheidsinterval(len);

— gegevens in tabelvorm over de concentratie van de teststof in de vissen, de gemiddelde gemeten concentratie aan het einde van de opnamefase ($C_{0,m}$), en de afgeleide (algemene) depuratiesnelheidsconstante (k_2) en concentratie in de vissen aan het begin van de depuratiefase ($C_{0,d}$) tezamen met de varianties van deze waarden (helling en intercept);

— gegevens in tabelvorm over het vetgehalte van de vissen (samen met de specifieke stofconcentraties, indien van toepassing), gemiddelde waarden voor de testgroep en de controlegroep aan het begin van de test, het einde van de opnamefase en het einde van de depuratiefase;

— grafieken, inclusief alle gemeten gegevens, van het volgende (indien van toepassing, kunnen concentraties worden uitgedrukt in verhouding tot het hele lichaam van het dier of specifieke weefsels daarvan):

  — groei (d.w.z. gewicht (en lengte) van de vissen vs. tijd) of natuurlijke logaritme van het gewicht vs. tijd;

[1] Een methode voor het analyseren van levensmiddelen op eiwit-, vet, ruwe celstof- en asgehalte; deze informatie is gewoonlijk verkrijgbaar bij de leverancier van het voer.

▼M7

— de depuratie van de teststof in de vissen; en

— de natuurlijke logaritme van de concentratie (ln concentratie) vs. depuratietijd (met inbegrip van de afgeleide depuratiesnelheidsconstante k_2, en de natuurlijke logaritme van de afgeleide concentratie in de vissen aan het begin van de depuratiefase, $C_{0,d}$);

— indien uit een visuele inspectie van een grafiek duidelijke uitschieters naar voren komen, kan een statistisch geldige uitschietertoets worden toegepast om verkeerde gegevenspunten te verwijderen en moet een rechtvaardiging voor het weglaten van deze gegevens worden gedocumenteerd;

— berekende voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante en voor groei gecorrigeerde halveringsperiode;

— berekend rendement van de assimilatie (α);

— „ruwe" BMF voor opnamen uit het voedsel, voor vetgehalte en groeiverdunning gecorrigeerde kinetische BMF („ruw" en voor vetgehalte gecorrigeerd op basis van het versgewicht van de hele vis), weefselspecifieke BMF, indien van toepassing;

— eventuele informatie over metabolieten van de radioactief gemerkte teststof en de accumulatie daarvan;

— alle ongewone verschijnselen die zich in de loop van de test hebben voorgedaan, alle afwijkingen van voornoemde procedures en alle andere relevante gegevens;

— een samenvattende tabel met relevante gemeten en berekende gegevens, zoals hierna:

Depuratiesnelheidsconstanten en biomagnificatiefactoren (BMF_K) van de stof	
k_g (groeisnelheidsconstante; dag^{-1}):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
k_2 (algemene depuratiesnelheidsconstante; dag^{-1}):	Voeg waarde in (95 % BI)
k_{2g} (voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante; dag^{-1}):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
$C_{0,m}$ (gemeten tijdstip-nul-concentratie, de concentratie in vissen aan het einde van de opname) (µg/g):	Voeg waarde in ± SD (2)
$C_{0,d}$ (afgeleide tijdstip-nul-concentratie van de depuratiefase; µg/g):	Voeg waarde in ± SD (2)
I (vastgestelde ingestiesnelheid van voedsel; g voedsel/g vis/dag):	Voeg waarde in
I_g (effectieve dosering, aangepast aan groei; g voedsel/g vis/dag)(2):	Voeg waarde in ± SD (2)
$C_{voedsel}$ (concentratie van chemische stof in het voedsel; µg/g):	Voeg waarde in ± SD (2)
α (rendement van de assimilatie van de stof):	Voeg waarde in ± SD (2)
BMF_K (kinetische BMF voor opnamen uit het voedsel):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)
BMF_{Kg} (voor groei gecorrigeerde kinetische BMF voor opnamen uit het voedsel):	Voeg waarde in (95 % BI) (1)

▼M7

Depuratiesnelheidsconstanten en biomagnificatiefactoren (BMF_K) van de stof	
$t_{1/2g}$ (voor groei gecorrigeerde halveringsperiode in dagen):	Voeg waarde in ± SD ([2])
Lc (vetcorrectiefactor):	Voeg waarde in
BMF_{KgL} (voor vetgehalte en voor groei gecorrigeerde kinetische BMF):	Voeg waarde in
$BMF_{SS\text{-}L}$ (indicatieve, voor vetgehalte gecorrigeerde BMF in stationaire toestand)[(2)]:	Voeg waarde in ± SD ([2])

([1]) BI: Betrouwbaarheidsinterval (indien schatting mogelijk is)
([2]) SD: Standaarddeviatie (indien schatting mogelijk is)

LITERATUUR

(1) *Hoofdstuk C.13 van deze bijlage*, *Bioconcentratie: doorstroomtest met vissen*.

(2) *Hoofdstuk A.6 van deze bijlage*, *Oplosbaarheid in water*.

(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) *Hoofdstuk A.8 van deze bijlage, Verdelingscoëfficiënt (n-octanol/water): schudfles-methode*.

(5) *Hoofdstuk A.24 van deze bijlage, Verdelingscoëfficiënt (n-octanol/water), hogedrukvloeistofchromatografie-methode (HPLC)*.

(6) *Hoofdstuk A.23 van deze bijlage, 1-Octanol/water-verdelingscoëfficiënt*: langzaam-roerenmethode.

(7) *Hoofdstuk C.7 van deze bijlage, Hydrolyse in afhankelijkheid van de pH*.

(8) (OESO (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr. 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO), Parijs, Frankrijk.

(9) *Hoofdstuk A.5 van deze bijlage, Oppervlaktespanning van waterige oplossingen*.

(10) *Hoofdstuk A.4 van deze bijlage, Dampspanning*.

(11) *Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid*.

(12) *Hoofdstuk C.29 van deze bijlage, Gemakkelijke biologische afbreekbaarheid — CO_2 in gesloten vaten*.

(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) OESO (2011), QSAR Toolbox 2.1. Februari 2011. Beschikbaar op: 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. Gepubliceerd op 3 april 2012.

(22) *Hoofdstuk C.47 van deze bijlage,* Test op toxiciteit bij vissen in vroege levensstadia (FELS — fish early-life stage).

(23) *Hoofdstuk C.15 van deze bijlage,* Vis, kortetermijn-toxiciteitstest op embryonale en larvestadia (sac-fry).

(24) *Hoofdstuk C.14 van deze bijlage, Groeitest onvolwassen viss*en.

(25) OESO (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO), Parijs, Frankrijk.

(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, VS.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, VS.

(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, VS.

(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) OESO (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO), Parijs, Frankrijk.

▼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, VS.

(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, Spanje.

(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, VS.

▼**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) OESO (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr. 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. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO), Parijs, Frankrijk.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES EN EENHEDEN

Bioaccumulatie wordt in het algemeen omschreven als een proces waarin de concentratie van een stof in een organisme een niveau bereikt dat hoger is dan het niveau in het ademhalingsmedium (bv. water voor een vis of lucht voor een zoogdier), het voedsel of beide (1).

Bioconcentratie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme (of bepaalde weefsels daarvan) ten opzichte van de concentratie van die stof in het omringende medium.

De bioconcentratiefactor (BCF of K_B) op enig moment van de opnamefase van deze accumulatietest is de verhouding van de concentratie van de teststof in of op de vis of bepaalde weefsels daarvan (C_f in mg/kg) en de concentratie van die stof in het omringende medium (C_w in mg/l). BCF wordt uitgedrukt in $l \cdot kg^{-1}$. Er wordt geen rekening gehouden met correcties voor groei en/of een standaard vetgehalte.

De bioconcentratiefactor in stationaire toestand (BCF_{SS}) ondergaat gedurende langere tijd geen significante wijzigingen als de concentratie van de teststof in het omringende medium constant blijft (vgl. definitie van stationaire toestand).

De bioconcentratiefactor in stationaire toestand genormaliseerd naar vetgehalte (BCF_{SSL}) is genormaliseerd naar een vis met een vetgehalte van 5 %.

Biomagnificatie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme (of bepaalde weefsels daarvan) ten opzichte van de concentratie van die stof in het voedsel.

De biomagnificatiefactor (BMF) is de concentratie van een stof in een roofdier ten opzichte van de concentratie in de prooi (of het voedsel) van dit roofdier in stationaire toestand. In de in deze testmethode beschreven methode wordt blootstelling via de waterfase zorgvuldig vermeden en dus kan een BMF-waarde uit deze testmethode niet zonder meer worden vergeleken met een BMF-waarde uit een veldonderzoek (waarin blootstelling via het water en via het voedsel kunnen zijn gecombineerd).

De biomagnificatiefactor voor opnamen uit het voedsel (BMF voor opnamen uit het voedsel) is de term die in deze testmethode wordt gebruikt om het resultaat van de test met blootstelling via het voer te beschrijven, waarin blootstelling via de waterfase zorgvuldig wordt vermeden en de BMF voor opnamen uit het voer uit deze testmethode dus niet zonder meer kan worden vergeleken met een BMF-waarde uit een veldonderzoek (waarin blootstelling via het water en via het voedsel kunnen zijn gecombineerd).

De blootstellings- of opnamefase is de periode gedurende welke de vissen aan de teststof worden blootgesteld.

Chemische stof betekent een substantie of mengsel.

De depuratiefase of op de blootstellingsfase volgende (eliminatie)fase is de periode die begint op het moment dat de proefdieren van een medium dat de teststof bevat, worden overgebracht naar een medium dat die stof niet bevat, en gedurende welke de depuratie (of netto eliminatie) van de teststof uit de vis (of bepaalde weefsels daarvan) wordt bestudeerd.

De depuratie- (of eliminatie-)snelheidsconstante (k_2) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in het proefdier (of bepaalde weefsels daarvan) afneemt nadat de vis is overgebracht van een medium dat de teststof bevat naar een medium dat die stof niet bevat (k_2 wordt uitgedrukt in dag^{-1}).

▼M7

De kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) is de verhouding tussen de opnamesnelheidsconstante, k_1, en de depuratiesnelheidsconstante, k_2 (*d.w.z.* k_1/k_2 — zie de overeenkomstige definities in dit aanhangsel). In beginsel moet de waarde vergelijkbaar zijn met de BCF_{SS} (zie de definitie hierboven), maar er kunnen verschillen optreden als onzeker is of de stationaire toestand werd bereikt, of als de kinetische BCF is gecorrigeerd voor groei.

De kinetische bioconcentratiefactor genormaliseerd naar vetgehalte (BCF_{KL}) is genormaliseerd naar een vis met een vetgehalte van 5 %.

De octanol-water-verdelingscoëfficiënt (K_{OW}) is de verhouding van de oplosbaarheid van een stof in n-octanol en in water bij evenwicht (methoden A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); ook genoteerd als P_{OW}. De logaritme van K_{OW} is een indicator van de neiging tot bioconcentratie van een stof in aquatische organismen.

Opgeloste organische koolstof (DOC) is een maat voor de concentratie van koolstof afkomstig van opgeloste organische bronnen in de testmedia.

De opnamesnelheidsconstante (k_1) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in of op de proefdieren (of bepaalde weefsels daarvan) toeneemt wanneer de vissen aan die stof worden blootgesteld (k_1 wordt uitgedrukt in 1 kg^{-1} dag^{-1}).

Organische koolstofdeeltjes (POC) is een maat voor de concentratie van koolstof afkomstig van gesuspendeerde organische bronnen in de testmedia.

Het rendement van de assimilatie (α) is een maat voor de relatieve hoeveelheid stof die uit de darm in het organisme wordt geabsorbeerd (α heeft geen eenheid, maar wordt vaak uitgedrukt als een percentage in plaats van als een fractie).

Een stationaire toestand wordt bereikt wanneer in een grafiek van de concentratie van de teststof in de vissen (C_f) als functie van de tijd de curve evenwijdig gaat lopen met de tijdas en drie opeenvolgende bepalingen van C_f op monsters die met tussenpozen van ten minste twee dagen worden genomen, niet meer dan ± 20 % van elkaar verschillen en er bovendien in de loop van de tijd geen significante toename van C_f tussen de eerste en laatste opeenvolgende bepaling is. Wanneer de analyse op samengevoegde monsters wordt uitgevoerd, zijn ten minste vier opeenvolgende bepalingen vereist. Voor teststoffen die langzaam worden opgenomen, verdient het de voorkeur om intervallen van zeven dagen te gebruiken.

Een stof die uit meerdere componenten bestaat is voor het doel van REACH gedefinieerd als een stof die meer dan één hoofdcomponent in een concentratie tussen 10 % en 80 % (g/g/) heeft.

Totaalgehalte aan organische koolstof (TOC) is een maat voor de concentratie van koolstof afkomstig van alle organische bronnen in de testmedia, met inbegrip van deeltjes en opgeloste bronnen.

Teststof betekent alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

Stoffen met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen staan ook bekend als UVCB's.

Vaste-fase-micro-extractie (SPME) is een oplosmiddelvrije analysetechniek die is ontwikkeld voor verdunde systemen. In deze methode wordt met polymeer beklede celstof blootgesteld aan de gas- of vloeistoffase die het analyt in kwestie bevat. In het algemeen wordt een minimale analysetijd gehanteerd, zodat de evenwichtssituatie tussen de vaste en vloeibare fase wordt bereikt wat betreft de gemeten soort. Daarna kan de concentratie van het analyt in kwestie worden bepaald, hetzij rechtstreeks uit de celstof hetzij na extractie van het analyt uit de celstof naar een oplosmiddel, afhankelijk van de gebruikte bepalingstechniek.

▼**M7**

De voedselingestiesnelheid (*I*) is de gemiddelde hoeveelheid voedsel die door elke vis per dag wordt gegeten, in verhouding tot het geraamde gemiddelde gewicht van het hele lichaam van de vis (uitgedrukt in g voedsel/g vis/dag).

De voor groei gecorrigeerde kinetische bioconcentratiefactor genormaliseerd naar vetgehalte (BCF_{KgI}) is genormaliseerd naar een vis met een vetgehalte van 5 % en gecorrigeerd voor groei tijdens de onderzoeksperiode zoals beschreven in aanhangsel 5.

LITERATUUR

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) . Hoofdstuk A.8 van deze bijlage, *Verdelingscoëfficiënt (n-octanol/water): Schudflesmethode*

(3) Hoofdstuk A.24 van deze bijlage, *Verdelingscoëfficiënt (n-octanol/water): HPLC-methode*.

(4) Hoofdstuk A.23 van deze bijlage, *Verdelingscoëfficiënt (1-octanol/water): Langzaam-roerenmethode*.

▼M7

Aanhangsel 2

CHEMISCHE KARAKTERISTIEKEN VAN AANVAARDBAAR VERDUNNINGSWATER

Stof	Drempelconcentratie
Deeltjes	5 mg/l
Totaal organische koolstof	2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammoniak	1 µg/l
Residueel chloor	10 µg/l
Totaal organofosforpesticiden	50 ng/l
Totaal organochloorpesticiden plus polychloorbifenylen	50 ng/l
Totaal organische chloorverbindingen	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Chroom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Koper	1 µg/l
IJzer	1 µg/l
Lood	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kwik	100 ng/l
Zilver	100 ng/l

▼M7

Aanhangsel 3

VOOR DE TESTS AANBEVOLEN VISSOORTEN

Aanbevolen soort	Aanbevolen temperatuurbereik (°C)	Aanbevolen grootteklasse (totale lichaamslengte in cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebravis	20 — 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) „Fathead minnow”	20 — 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karper	20 — 25	8,0 ± 4,0 (3)
(Oryzias latipes) (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Japans rijstvisje	20 — 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poecilliidae) (Peters) Guppy	20 — 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) „Bluegill” — Zonnebaars	20 — 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Regenboogforel	13 — 17	8,0 ± 4,0
Gasteroteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Driedoornige stekelbaars	18 — 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Er zij opgemerkt dat in de test zelf gewicht wordt verkozen als maat voor de grootte en voor afleidingen van de groeisnelheidsconstante. Er wordt echter erkend dat lengte een praktischer maat is als de vissen aan het begin van een experiment op het oog moeten worden geselecteerd (d.w.z. uit het visbestand).

(3) Dit bereik voor de lengte wordt aangegeven in de Testing Methods for New Chemical Substances enz. gebaseerd op de Chemical Substances Control Law (CSCL) van Japan.

Minder vaak zijn ook verschillende estuariene en mariene soorten gebruikt, bijvoorbeeld:

Puntombervis	(*Leiostomus xanthurus*)
Edelsteentandkarper	(*Cyprinodon variegatus*)
„Silverside”	(*Menidia beryllina*)
„Shiner perch”	(*Cymatogaster aggregata*)
„English sole”	(*Parophrys vetulus*)
„Staghorn sculpin”	(*Leptocottus armatus*)
Driedoornige stekelbaars	(*Gasterosteus aculeatus*)
Zeebaars	(*Dicentracus labrax*)
Alver	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

De in de tabel genoemde zoetwatervissen zijn gemakkelijk te kweken en/of het hele jaar door vlot verkrijgbaar, maar de beschikbaarheid van de mariene en estuariene soorten verschilt van land tot land. De genoemde soorten kunnen in viskwekerijen of in het laboratorium vrij van ziekten en parasieten worden opgekweekt en tot voortplanting gebracht, zodat voor de test gezonde dieren van bekende afstamming kunnen worden gebruikt. Dergelijke vissen zijn in vele delen van de wereld verkrijgbaar.

LITERATUUR

(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

Aanhangsel 4

BEMONSTERINGSSCHEMA'S VOOR TESTS MET BLOOTSTELLING VIA VOER OF WATER

1. **Theoretisch voorbeeld van een bemonsteringsschema voor een volledige bioconcentratietest met blootstelling via het water met een stof waarvoor log K_{OW} = 4**

Bemonstering van de vissen	Bemonsteringsschema		Aantal watermonsters (1)	Aantal vissen per monster (1)
	Minimale bemonstering: tijdstip (in dagen) (2)	Extra monsternemingen (in dagen) (2)		
Opnamefase				
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))
Depuratiefase				Vissen overbrengen naar water zonder de teststof
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 — 8 (5)
		17,5		(4+3 (6))
TOTAAL				40 — 72 (48 — 80) (5)

(1) De cijfers tussen haakjes zijn de aantallen extra monsters (van het water en de vissen) die worden genomen ingeval voor een aanvullende bemonstering werd geopteerd.

(2) De preliminaire, aan de test voorafgaande schatting van k_2 op basis van log K_{OW} = 4,0 bedraagt 0,652 dag^{-1}. De totale duur van het experiment wordt gelijkgesteld aan 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dagen, d.w.z. 14 dagen. Voor de schatting van t_{SS}, zie aanhangsel 5.

(3) Bemonster het water nadat ten minste reeds 3 bakvolumes zijn doorgestroomd.

(4) Deze vissen worden geselecteerd uit het visbestand.

(5) Indien een grotere nauwkeurigheid of metabolismestudies noodzakelijk zijn waarvoor meer vissen nodig zijn, moeten deze in het bijzonder aan het einde van de opnamefase en depuratiefase worden bemonsterd (vgl. punt 40).

(6) Voor de bepaling van het vetgehalte zijn mogelijk ten minste 3 extra vissen nodig als het niet mogelijk is om dezelfde vissen te gebruiken als waarvoor aan het begin van de test, het einde van de opnamefase en het einde van de depuratiefase de teststof-concentratie wordt bepaald. Er zij opgemerkt dat het in veel gevallen mogelijk moet zijn uitsluitend de 3 controlevissen te gebruiken (vgl. punt 56).

▼M7

2. **Theoretisch voorbeeld van een bemonsteringsschema voor een bioaccumulatietest via het voer na een opnamefase van 10 dagen en een depuratiefase van 42 dagen**

Bemonstering	Bemonsteringsschema		Aantal voedermonsters	Aantal vissen per monster	
	Dag van fase	Aanvullende vismonsters?		Testgroep	Controlegroep
Opnamefase					
1	0	Mogelijk (1) (2)	3 — testgroep	0	5 — 10
			3 — controlegroep (1)		(8 — 13) (2)
1A (3)	1-3			5 — 10	5 — 10
2	10	Ja (4)	3 — testgroep	10 — 15 (4)	5 — 10
			3 — controlegroep (1)	(13 — 18) (5)	(8 — 13) (5)
Depuratiefase					
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)
TOTAAL				59 — 120 (63 — 126) (4) (5)	50 — 110 (56 — 116) (4) (5)

(1) 3 monsters van het voer van zowel de controle als de testgroep geanalyseerd op de concentratie van de teststof en op het vetgehalte.

(2) Vissen worden zo dicht mogelijk bij het begin van de studie geselecteerd uit het visbestand; uit het visbestand moeten aan het begin van de test ten minste 3 vissen worden bemonsterd voor de bepaling van het vetgehalte.

(3) (Facultatieve) bemonstering vroeg in de opnamefase verschaft gegevens voor het berekenen van de assimilatie van de teststof uit het voer, die dan kan worden vergeleken met het rendement van de assimilatie zoals berekend uit de gegevens van de depuratiefase.

(4) Voor weefselspecifieke analyse kunnen 5 extra vissen worden bemonsterd.

(5) Voor de bepaling van het vetgehalte zijn mogelijk ten minste 3 extra vissen nodig als het niet mogelijk is om dezelfde vissen te gebruiken als waarvoor aan het begin van de test, het einde van de opnamefase en het einde van de depuratiefase de teststofconcentratie wordt bepaald. Er zij opgemerkt dat het in veel gevallen mogelijk moet zijn uitsluitend de 3 controlevissen te gebruiken (vgl. punten 56 en 153).

Opmerking over fase en bemonsteringstijdstippen: De opnamefase vangt aan bij de eerste verstrekking van verrijkt voer. Een experimentele dag loopt van een voedselverstrekking tot kort voor de volgende voedselverstrekking, 24 uur later. De eerste bemonstering (1 in de tabel) moet plaatsvinden kort (bv. één uur) voor de eerste voedselverstrekking. De bemonsteringen gedurende een studie vinden in het ideale geval kort voor de voedselverstrekking van de volgende dag plaats (d.w.z. ongeveer 23 uur na de voedselverstrekking van de monsternamedag). De opnamefase eindigt kort vóór de eerste verstrekking van niet-verrijkt voer, wanneer de depuratiefase begint (de vissen in de testgroep zullen in de 24 uur na de laatste verstrekking van verrijkt voer waarschijnlijk nog verrijkt voer verteren). Dit betekent dat het monster aan het einde van de opnamefase moet worden genomen kort voor de eerste verstrekking van niet-verrijkt voer en dat het eerste monster in de depuratiefase ongeveer 23 uur na de eerste verstrekking van niet-verrijkt voer moet worden genomen.

▼M7

Aanhangsel 5

ALGEMENE BEREKENINGEN

1. Inleiding

2. Voorspelling van de duur van de opnamefase

3. Voorspelling van de duur van de depuratiefase

4. Sequentiële methode: bepaling van de depuratie- of (eliminatie-)snelheidsconstante k_2

5. Sequentiële methode: bepaling van de opnamesnelheidsconstante k_1 (alleen voor methode met blootstelling via het water)

6. Simultane methode voor het berekenen van de opname- en depuratie- of (eliminatie-)snelheidsconstanten (alleen voor methode met blootstelling via het water)

7. Correctie voor groeiverdunning van kinetische BCF en BMF

8. Normalisatie naar een vetgehalte van 5 % (alleen voor methode met blootstelling via het water)

1. INLEIDING

Het algemene aquatische bioaccumulatiemodel voor vissen kan worden beschreven in termen van opname- en eliminatieprocessen, waarbij opname uit voedsel wordt genegeerd. De differentiaalvergelijking (dC_f/dt) die de snelheid beschrijft waarmee de concentratie in vissen verandert ($mg \cdot kg^{-1} \cdot dag^{-1}$), is (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Vergelijking A5.1]}$$

waarin

k_1 = eerste-orde snelheidsconstante voor opname in de vissen ($l \cdot kg^{-1} \cdot dag^{-1}$).

k_2 = eerste-orde snelheidsconstante voor depuratie uit de vissen (dag^{-1}).

k_g = eerste-orde snelheidsconstante voor groei van de vissen ('groeiverdunning') (dag^{-1}).

k_m = eerste-orde snelheidsconstante voor metabole omzetting (dag^{-1}).

k_e = eerste-orde snelheidsconstante voor egestie via fecaliën (dag^{-1})

C_w = concentratie in het water ($mg \cdot l^{-1}$).

C_f = concentratie in de vissen ($mg \cdot kg^{-1}$ versgewicht).

Voor bioaccumulerende stoffen kan worden verwacht dat een tijdgewogen gemiddelde (TWA) de meest relevante blootstellingsconcentratie in het water (C_w) binnen de toegestane bandbreedte is (vgl. punt 24). Het is aan te bevelen een TWA-waterconcentratie te berekenen volgens de procedure in aanhangsel 6 van TM C.20 (2). Er zij opgemerkt dat een ln-transformatie van de waterconcentratie geschikt is wanneer tussen de verversingsperioden een exponentiële daling wordt verwacht, bijvoorbeeld in geval van een semistatische opzet van de test. In een doorstroomsysteem is een ln-transformatie van de blootstellingsconcentraties mogelijk niet nodig. Indien TWA-waterconcentraties worden afgeleid, moeten deze worden gerapporteerd en in de volgende berekeningen worden gebruikt.

In een standaard BCF-test met vissen kunnen de opname en depuratie worden beschreven in termen van twee processen die eersteordekinetiek vertonen:

▼M7

opnamesnelheid= $k_1 \times C_w$ [Vergelijking A5.2]

totale eliminatiesnelheid=$(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Vergelijking A5.3]

In de stationaire toestand en ervan uitgaande dat de groei en het metabolisme verwaarloosbaar zijn (*d.w.z.* de waarden voor k_g en k_m zijn niet te onderscheiden van nul), is de opnamesnelheid gelijk aan de depuratiesnelheid. Wanneer de vergelijkingen A5.2 en A5.3 worden gecombineerd, geeft dit dus de volgende relatie:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Vergelijking A5.4]

waarin

$C_{f\text{-}SS}$ = concentratie in de vissen in de stationaire toestand (mg kg^{-1} versgewicht).

$C_{w\text{-}SS}$ = concentratie in het water in de stationaire toestand (mg l^{-1}).

De verhouding k_1/k_2 staat bekend als de kinetische BCF (BCF_K) en moet gelijk zijn aan de BCF in de stationaire toestand (BCF_{SS}) verkregen uit de verhouding van de concentratie in stationaire toestand in de vissen en die in het water, maar er kunnen afwijkingen optreden als het onzeker is of de stationaire toestand werd bereikt of als de kinetische BCF is gecorrigeerd voor groei. Aangezien k_1 en k_2 constanten zijn, hoeft de stationaire toestand echter niet te zijn bereikt om een BCF_K af te leiden.

Dit aanhangsel 5 bevat de algemene berekeningen op basis van deze eersteordevergelijkingen die nodig zijn voor zowel bioaccumulatiemethoden met blootstelling via het water als voor dergelijke tests via het voer. De paragrafen 5, 6 en 8 zijn echter uitsluitend relevant voor de methode met blootstelling via het water, maar worden hier toch opgenomen omdat ze „algemene" technieken beschrijven. De sequentiële (paragrafen 4 en 5) en simultane (paragraaf 6) methoden maken het mogelijk de opname- en depuratieconstanten te berekenen die worden gebruikt om kinetische BCF's af te leiden. De sequentiële methode voor het bepalen van k_2 (paragraaf 4) is van belang voor de methode via het voer, aangezien zij nodig is om zowel het rendement van de assimilatie als de BMF te berekenen. Aanhangsel 7 bevat bijzonderheden van de berekeningen die specifiek zijn voor de methode via het voer.

2. VOORSPELLING VAN DE DUUR VAN DE OPNAMEFASE

Alvorens de test wordt uitgevoerd, kan een schatting van k_2 en derhalve van de tijd die nodig is om de stationaire toestand te bereiken, worden verkregen uit het empirische verband dat is aangetoond tussen k_2 en de *n*-octanol-waterverdelingscoëfficiënt (K_{OW}) of tussen k_1 en de BCF. Men moet echter beseffen dat de vergelijkingen in deze paragraaf slechts van toepassing zijn wanneer de opname en depuratie eersteordekinetiek vertonen. Als dit duidelijk niet het geval is, verdient het aanbeveling een biostatisticus en/of farmacokineticus te raadplegen, indien ramingen van de opnamefase gewenst zijn.

Een schatting van k_2 (dag^{-1}) kan op meerdere manieren worden verkregen. In eerste instantie kan bijvoorbeeld het volgende empirische verband worden gebruikt ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 log K_{OW}$ (r^2=0,95) [(3); Vergelijking A5.5]

of

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Vergelijking A5.6]

Waarin $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (voor stoffen met log K_{OW} > 3) (r^2=0,85)[(4); Vergelijking A5.7]

([1]) Als bij elk empirisch verband moet worden nagegaan dat de teststof binnen het toepassingsgebied van het verband ligt.

▼M7

en $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2=0,90)[(5); Vergelijking A5.8]

W = gemiddelde gewicht van behandelde vissen (grammen versgewicht) aan het einde van de opname/begin van de depuratie ([1])

Voor andere gerelateerde relaties, zie (6). Het kan nuttig zijn complexere modellen voor de schatting van k_2 te gebruiken wanneer het bijvoorbeeld waarschijnlijk is dat substantieel metabolisme plaatsvindt (7) (8). Naarmate de complexiteit van het model toeneemt, moeten de voorspellingen echter behoedzamer worden geïnterpreteerd. De aanwezigheid van nitro-groepen kan bijvoorbeeld wijzen op snel metabolisme, maar dit is niet altijd het geval. De gebruiker moet daarom bij de planning van een studie de resultaten van de voorspellende methode beoordelen in het licht van de chemische structuur en eventuele andere relevante informatie (bijvoorbeeld voorafgaande studies).

De tijd die nodig is om een bepaald percentage van de stationaire concentratie te bereiken, kan worden verkregen door de schatting van k_2 uit de algemene kinetische vergelijking die de opname en depuratie beschrijft (eersteordekinetiek), toe te passen, ervan uitgaande dat groei en metabolisme verwaarloosbaar zijn. Indien er sprake is van substantiële groei tijdens de studie, zijn de hieronder beschreven schattingen niet betrouwbaar. In dergelijke gevallen is het beter de voor groei gecorrigeerde k_{2g} te gebruiken zoals verderop wordt beschreven (zie paragraaf 7 van dit aanhangsel):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Vergelijking A5.9]}$$

of, indien C_w constant is:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Vergelijking A5.10]}$$

Bij het naderen van de stationaire toestand ($t \rightarrow \infty$), kan vergelijking A5.10 worden vereenvoudigd (vgl. (9) (10)) tot:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Vergelijking A5.11]}$$

of

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Vergelijking A5.12]}$$

BCF × C_w is dan een benadering van de concentratie van de stof in de vissen in de stationaire toestand ($C_{f\text{-}SS}$). [Opmerking: dezelfde aanpak kan worden gebruikt bij het schatten van een BMF in de stationaire toestand met de test via het voer. In dit geval wordt in de vergelijkingen hierboven BCF vervangen door BMF en C_w door $C_{voedsel}$, de concentratie in het voedsel.]

Vergelijking A5.10 kan dan worden herschreven als:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Vergelijking A5.13]}$$

of

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Vergelijking A5.14]}$$

Wanneer met vergelijking A5.5 of vergelijking A5.6 een preliminaire schatting van k_2 wordt gemaakt, kan met behulp van vergelijking A5.14 de tijd worden geraamd die nodig is om een bepaald percentage van de stationaire concentratie te bereiken.

Als vuistregel geldt dat de statistisch optimale duur van de opnamefase voor het verkrijgen van statistisch aanvaardbare gegevens wat betreft BCF_K overeenstemt met de tijd die nodig is opdat de logaritme van de concentratie van

([1]) Het gewicht van de vissen aan het einde van de opnamefase kan worden geschat uit gegevens van eerder onderzoek of eerder opgedane kennis van de waarschijnlijke toename van de grootte van de soort vanaf een typisch gewicht bij aanvang van de test gedurende een opnamefase van typische duur (bijvoorbeeld 28 dagen).

▼M7

de teststof in de vissen, uitgezet tegen de niet-getransformeerde tijd, ten minste 50 % van de stationaire concentratie (*d.w.z.* 0,69/k_2) bereikt, maar niet meer dan 95 % van de stationaire concentratie (*d.w.z.* 3,0/k_2) (11). Wanneer de accumulatie een niveau van meer dan 95 % van de stationaire concentratie bereikt, wordt berekening van een BCF_{SS} haalbaar.

De tijd die nodig is om 80 % van de stationaire concentratie te bereiken is (met behulp van vergelijking A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t}$$ [Vergelijking A5.15]

of

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2}$$ [Vergelijking A5.16]

Evenzo is de tijd die nodig is om 95 % van de stationaire concentratie te bereiken:

$$t_{95} = \frac{-ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$ [Vergelijking A5.17]

De duur van de opnamefase (*d.w.z.* de tijd die nodig is om voor een teststof waarvoor log K_{OW} = 4, een bepaald percentage van de stationaire concentratie te bereiken, bv. t_{80} of t_{95}) is (met behulp van de vergelijkingen A5.5, A5.16 en A5.17):

$$\log k2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dag}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{dagen } (59 \text{ uur})$$

$$\text{of } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{dagen } (110 \text{uur})$$

Als alternatief kan de uitdrukking

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{ow} + 55,31 \text{ (uur)}$$ [Vergelijking A5.18]

worden gebruikt om de tijd te berekenen die nodig is voor het daadwerkelijk bereiken van de stationaire situatie (t_{eSS}) (12). Voor een teststof waarvoor log K_{OW} = 4, leidt dit tot:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ uur}$$

3. VOORSPELLING VAN DE DUUR VAN DE DEPURATIEFASE

Een raming van de tijd die nodig is om de lichaamsconcentratie te laten dalen tot een bepaald percentage van de beginconcentratie, kan ook worden verkregen uit de algemene vergelijking die de opname en depuratie beschrijft (uitgaande van eersteordekinetiek, vgl. vergelijking A5.9) (1) (13).

Voor de depuratiefase wordt aangenomen dat C_w (of $C_{voedsel}$ voor de test via het voer) gelijk is aan nul. De vergelijking wordt dan gereduceerd tot

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f$$ [Vergelijking A5.19]

of

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$ [Vergelijking A5.20]

waarin $C_{f,0}$ de concentratie is bij het begin van depuratiefase.

50 % depuratie wordt dan verkregen na t_{50}, die als volgt wordt berekend:

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

of

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Zo ook wordt 95 % depuratie bereikt na

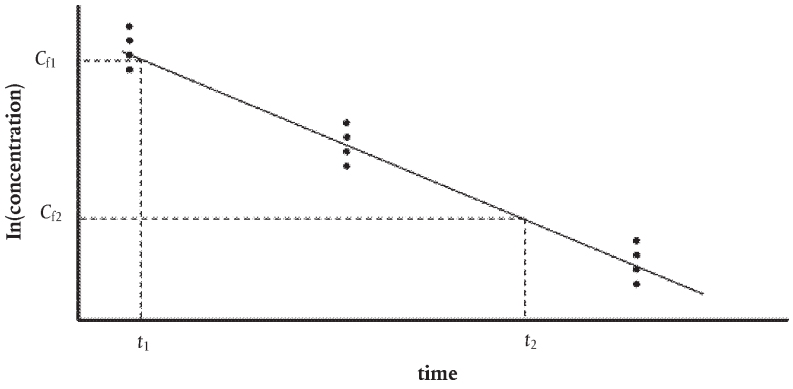
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Als de opnamefase wordt afgesloten wanneer 80 % van de stationaire concentratie is bereikt ($1{,}6/k_2$) en de depuratiefase wanneer de eliminatie 95 % beloopt ($3{,}0/k_2$), bedraagt de duur van de depuratiefase ongeveer het dubbele van de duur van de opnamefase.

Opgemerkt zij dat de schattingen zijn gebaseerd op de aanname dat de opname- en depuratiepatronen eersteordekinetiek vertonen. Indien het proces duidelijk geen eersteordekinetiek vertoont, zijn deze schattingen niet geldig.

4. SEQUENTIËLE METHODE: BEPALING VAN DE DEPURATIE- OF (ELIMINATIE-)SNELHEIDSCONSTANTE K_2

Er is van uitgegaan dat de meeste bioconcentratieprocessen op een „acceptabele” manier worden beschreven door een simpel twee-compartiment/tweeparametermodel, wat zich vertaalt in een lineair verband wanneer de concentratie van de stof in de vissen tijdens de depuratiefase (op logaritmische schaal) tegen de tijd wordt uitgezet.



Houd er rekening mee dat afwijkingen van een lineair verband een aanwijzing kunnen vormen voor een complex depuratiepatroon dat niet door een eersteordekinetiek kan worden beschreven. Om depuratiepatronen door te rekenen die niet door een eersteordekinetiek worden gekenmerkt, kan eveneens de grafische methode worden gebruikt.

Voer een lineaire regressie uit op de natuurlijke logaritme van de concentratie als functie van de tijd om k_2 te berekenen voor meerdere (bemonsterings)tijdstippen. De helling van de regressielijn is een schatting van de depuratiesnelheidsconstante k_2 ([1]) . Uit het intercept kan gemakkelijk de gemiddelde concentratie in de vissen aan het begin van de depuratiefase ($C_{0,d}$; welke gelijk is aan de gemiddelde concentratie in de vissen aan het einde van de opnamefase) worden berekend (met inbegrip van onzekerheidsmarges) ([1]):

([1]) In de meeste programma's waarmee lineaire regressies kunnen worden uitgevoerd, worden ook standaardfouten en betrouwbaarheidsintervallen (BI's) van de schattingen gegeven, bijvoorbeeld in Microsoft Excel met de Analysis ToolPak.

▼M7

$C_{0,d} = e^{intercept}$ [Vergelijking A5.21]

Vul de twee gemiddelde concentraties in de volgende vergelijking in om k_2 te berekenen wanneer slechts gegevens van twee (bemonsterings)tijdstippen beschikbaar zijn (zoals in de beperkte testopzet):

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1}$$ [Vergelijking A5.22]

waarin $\ln(C_{f1})$ en $\ln(C_{f2})$ de natuurlijke logaritmen van de concentraties op respectievelijk de tijdstippen t_1 en t_2 zijn, en t_2 en t_1 de tijdstippen ten opzichte van het begin van de depuratie zijn waarop de twee monsters werden verzameld ([1]).

5. SEQUENTIËLE METHODE: BEPALING VAN DE OPNAMESNELHEIDSCONSTANTE K_1 (ALLEEN VOOR METHODE MET BLOOTSTELLING VIA HET WATER)

Om een waarde voor k_1 te vinden kan met een computerprogramma een reeks aan de tijd gerelateerde concentratiegegevens voor de opnamefase aan het volgende model worden gefit:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$ [Vergelijking A5.23]

waarbij k_2 door de berekening hierboven wordt gegeven en $C_f(t)$ en $C_w(t)$ respectievelijk de concentraties in vissen en in het water op tijdstip t zijn.

Gebruik de volgende formule om k_1 te berekenen wanneer slechts twee (bemonsterings)tijdstippen beschikbaar zijn (zoals in de beperkte test):

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})}$$ [Vergelijking A5.24]

waarbij k_2 door de berekening hierboven wordt gegeven, C_f de concentratie in vissen aan het begin van de depuratiefase is en C_w de gemiddelde concentratie in het water tijdens de opnamefase is ([2]).

Visuele inspectie van de resulterende hellingen k_1 en k_2 wanneer de gemeten gegevens van de bemonsteringstijdstippen in een grafiek worden uitgezet, kan worden gebruikt om de kwaliteit van de aanpassing te beoordelen. Als blijkt dat de sequentiële methode een slechte schatting voor k_1 oplevert, moet de simultane aanpak voor het berekenen van k_1 en k_2 worden toegepast (zie paragraaf 6 hierna). De resulterende hellingen moeten weer worden vergeleken met de in de grafiek uitgezette gemeten gegevens om de kwaliteit van de aanpassing visueel te beoordelen. Als de kwaliteit van de aanpassing nog steeds slecht is, kan dit een aanwijzing zijn dat het proces geen eersteordekinetiek vertoont en moeten andere, complexere modellen worden gebruikt.

6. SIMULTANE METHODE VOOR HET BEREKENEN VAN DE OPNAME- EN DEPURATIE- OF (ELIMINATIE-)SNELHEIDSCONSTANTEN (ALLEEN VOOR METHODE MET BLOOTSTELLING VIA HET WATER)

Om waarden voor k_1 en k_2 te vinden kan met een computerprogramma een reeks aan de tijd gerelateerde concentratiegegevens aan het model worden gefit:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c$$ [Vergelijking A5.25]

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c$$ [Vergelijking A5.26]

waarbij

t_c = tijd aan het eind van de opnamefase.

Deze benadering verschaft rechtstreeks standaardfouten voor de schattingen van k_1 en k_2. Wanneer k_1/k_2 in vergelijking A5.25 en vergelijking A5.26

([1]) In tegenstelling tot de lineaire regressiemethode geeft deze formule geen standaardfout voor k2.

([2]) In tegenstelling tot een lineaire fittingprocedure zal deze methode gewoonlijk geen standaardfout of betrouwbaarheidsinterval voor de geschatte k1 opleveren.

▼M7

wordt vervangen door BCF (vgl. vergelijking A5.4), kunnen ook de standaardfout en het 95 %-BI van de BCF worden geschat. Dit is in het bijzonder nuttig wanneer verschillende schattingen ten gevolge van gegevenstransformaties worden vergeleken. De afhankelijke variabele (de concentratie in vissen) kan met of zonder natuurlijke logaritmische transformatie worden gefit, en de onzekerheid in de resulterende BCF kan worden geraamd.

Aangezien er een sterke correlatie tussen de twee parameters k_1 en k_2 bestaat indien ze gelijktijdig worden geschat, kan het aan te bevelen zijn eerst k_2 te berekenen uit uitsluitend de depuratiegegevens (zie hierboven); k_2 kan in de meeste gevallen vrij nauwkeurig worden geschat uit de depuratiecurve. k_1 kan vervolgens met niet-lineaire regressie worden berekend uit de opnamegegevens ([1]). Het is aan te bevelen dezelfde gegevenstransformatie toe te passen wanneer sequentieel wordt gefit.

Visuele inspectie van de resulterende hellingen wanneer de gemeten gegevens van de bemonsteringstijdstippen in een grafiek worden uitgezet, kan worden gebruikt om de kwaliteit van de aanpassing te beoordelen. Als blijkt dat de sequentiële methode een slechte schatting voor k_1 oplevert, kan de simultane aanpak voor het berekenen van k_1 en k_2 worden toegepast. Het gefitte model moet weer worden vergeleken met de in de grafiek uitgezette gemeten gegevens om de kwaliteit van de aanpassing visueel te beoordelen, en de resulterende parameterschattingen voor k_1, k_2 en de resulterende BCF met hun standaardfouten en/of betrouwbaarheidsintervallen moeten worden vergeleken voor verschillende typen fits.

Als de kwaliteit van de aanpassing nog steeds slecht is, kan dit een aanwijzing zijn dat het proces geen eersteordekinetiek vertoont en moeten andere, complexere modellen worden gebruikt. Een van de meest voorkomende complicaties is groei van de vissen gedurende de test.

7. CORRECTIE VOOR GROEIVERDUNNING VAN KINETISCHE BCF EN BMF

In deze paragraaf wordt een standaardmethode voor het corrigeren voor groei van de vissen tijdens de test (zogenoemde 'groeiverdunning') beschreven die alleen geldig is wanneer het proces eersteordekinetiek vertoont. Als er aanwijzingen zijn dat er geen sprake is van eersteordekinetiek, verdient het aanbeveling om een biostatisticus te raadplegen voor een juiste correctie voor groeiverdunning of om de hieronder beschreven aanpak op basis van massa te gebruiken.

In sommige gevallen is er bij deze methode voor het corrigeren voor groeiverdunning sprake van gebrekkige precisie of werkt de methode niet (zo kan bijvoorbeeld de afgeleide, voor groeiverdunning gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante, k_{2g}, voor zeer traag depurerende stoffen die worden getest met snel groeiende vissen heel klein zijn, waardoor de fout in de twee snelheidsconstanten die worden gebruikt om de voor groeiverdunning gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante te bepalen kritisch wordt, en in sommige gevallen kunnen de schattingen van k_g groter zijn dan k_2). In dergelijke gevallen kan een alternatieve aanpak (d.w.z. massa-aanpak), die ook werkt wanneer het proces geen eersteordegroeikinetiek vertoont, worden gebruikt waarbij correctie niet nodig is. Deze aanpak wordt aan het einde van deze paragraaf uiteengezet.

Methode voor correctie voor groei door aftrek van de groeisnelheidsconstante

Voor de standaardmethode worden alle afzonderlijke gewichts- en lengtegegevens geconverteerd naar hun natuurlijke logaritme en wordt ln(gewicht) of ln(1/gewicht) voor de behandelingsgroep en controlegroep apart in een grafiek uitgezet tegen de tijd (dag). Dezelfde procedure wordt gevolgd voor de gegevens van de opnamefase en apart voor die van de depuratiefase. In het algemeen is het voor correctie voor groeiverdunning passender om de gewichtsgegevens van de hele studie te gebruiken om de groeisnelheidsconstante (k_g) af

([1]) Men moet beseffen dat de onzekerheid in de schatting van k2 in het bioaccumulatiemodel strikt genomen niet goed wordt gebruikt wanneer deze in wezen als een constante wordt beschouwd wanneer k1 in de sequentiële fitmethode wordt gefit. De onzekerheid in de resulterende BCF zal voor de simultane en sequentiële fitmethode daarom verschillend zijn.

▼M7

te leiden, maar statistisch significante verschillen tussen de afgeleide groeisnelheidsconstanten voor de opnamefase en de depuratiefase kunnen een aanwijzing vormen dat de snelheidsconstante voor de depuratiefase moet worden gebruikt. Algemene groeisnelheden uit studies via het water voor test- en controlegroepen kunnen worden gebruikt om te controleren op het voorkomen van aan de behandeling gerelateerde effecten.

Voor de natuurlijke logaritme van het gewicht van de vissen uitgezet tegen de dag (en voor de natuurlijke logaritme van 1/gewicht uitgezet tegen de dag) wordt met behulp van statistische standaardprocedures voor elke groep (test- en controlegroepen, afzonderlijke gegevens, geen gemiddelde waarden per dag) voor de hele studie, de opnamefase en de depuratiefase een lineaire kleinste-kwadratencorrelatie berekend. De varianties in de hellingen van de lijnen worden berekend en gebruikt om de statistische significantie (p = 0,05) van het verschil in de hellingen (groeisnelheidsconstanten) te schatten met de t-toets van Student (of ANOVA indien meer dan één concentratie wordt getest). Voor het corrigeren voor groei genieten gewichtsgegevens doorgaans de voorkeur. Lengtegegevens, op dezelfde manier behandeld, kunnen nuttig zijn om controle- en testgroepen te vergelijken op het punt van aan de behandeling gerelateerde effecten. Indien er in de analyse van de gewichtsgegevens geen statistisch significant verschil werd gevonden, kunnen de gegevens van de test- en controlegroepen worden samengevoegd en kan voor de studie de algemene groeisnelheidsconstante voor de vissen (k_g) worden berekend als de algemene helling van het lineaire verband. Indien statistische verschillen werden waargenomen, moeten de groeisnelheidsconstanten voor elke groep vissen, en/of fase van het onderzoek, apart worden gerapporteerd. De snelheidsconstante van elke behandelde groep moet vervolgens worden gebruikt om voor die groep voor groeiverdunning te corrigeren. Indien statistische verschillen tussen de snelheidsconstanten voor de opnamefase en depuratiefase werden waargenomen, moeten de voor de depuratiefase afgeleide snelheidsconstanten worden gebruikt.

De depuratiesnelheidsconstante, k_{2g}, wordt verkregen door de berekende groeisnelheidsconstante (k_g uitgedrukt in dag^{-1}) in mindering te brengen op de algemene depuratiesnelheidsconstante (k_2).

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Vergelijking A5.27]}$$

De voor groei gecorrigeerde kinetische BCF, genoteerd als BCF_{Kg} (of BMF_{Kg}), wordt verkregen door de opnamesnelheidsconstante te delen door de voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante.

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Vergelijking A5.28]}$$

De afgeleide groeisnelheidsconstante voor een studie via het voer wordt in vergelijking A7.5 gebruikt om de voor groei gecorrigeerde BMF_{Kg} te berekenen (vgl. aanhangsel 7).

Methode voor correctie voor groei op basis van massa

Een alternatief voor de „methode voor correctie voor groei door aftrek van de groeisnelheidsconstante” hierboven waarbij niet voor groei hoeft te worden gecorrigeerd, is de volgende. Het principe van deze alternatieve methode is dat gegevens uit de depuratiefase op basis van massa per hele vis worden gebruikt in plaats van op basis van concentratie.

Converteer de weefselconcentraties uit de depuratiefase (massa van de teststof per massaeenheid vis) naar massa van de teststof per vis: plaats de concentraties en gewichten van afzonderlijke vissen naast elkaar in een tabel (bv. met een spreadsheetprogramma) en vermenigvuldig elke concentratie met het totale gewicht van de vis voor die meting, zodat voor alle bemonsteringen uit de depuratiefase een reeks massagegevens van de teststof per vis wordt verkregen.

Zet de resulterende natuurlijke logaritme van de massagegevens voor de stof uit tegen de tijd voor het experiment (depuratiefase) zoals dit in het normale geval wordt gedaan.

▼M7

Leid voor de methode met blootstelling via het water routinematig de opnamesnelheidsconstante af (zie de paragrafen 4 en 6). Houd rekening met het feit dat de „normale" waarde van k_2 moet worden gebruikt in de vergelijkingen voor het fitten van de curve voor k_1, en leid uit de gegevens hierboven de depuratiesnelheidsconstante af. Omdat de resulterende waarde voor de depuratiesnelheidsconstante onafhankelijk is van de groei, aangezien zij is afgeleid op basis van de massa per hele vis, wordt de waarde genoteerd als k_{2g} en niet als k_2.

8. NORMALISATIE NAAR EEN VETGEHALTE VAN 5 % (ALLEEN VOOR METHODE MET BLOOTSTELLING VIA HET WATER)

De resultaten voor de BCF's (kinetische en in stationaire toestand) uit tests met blootstelling via het water moeten ook worden gerapporteerd ten opzichte van een standaardvetgehalte van de vis van 5 % (versgewicht), tenzij kan worden aangevoerd dat de teststof zich niet primair in vetten ophoopt (sommige geperfluoreerde stoffen kunnen zich bijvoorbeeld binden aan eiwitten). De gegevens van de concentratie in de vissen, of de BCF, moeten worden geconverteerd naar een vetgehalte van 5 % op basis van het versgewicht. Indien op alle monsternamepunten voor het meten van de concentraties van de teststof en het meten van het vetgehalte dezelfde vissen werden gebruikt, moet elke afzonderlijke gemeten concentratie in de vissen worden gecorrigeerd voor het vetgehalte van de betreffende vis.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Vergelijking A5.29]}$$

waarbij

$C_{f,L}$ = concentratie in de vis genormaliseerd naar vetgehalte (mg kg^{-1} versgewicht)

L = vetfractie (op basis van het versgewicht)

C_f = concentratie van de teststof in de vis (mg kg^{-1} versgewicht)

Indien niet voor alle bemonsterde vissen een vetanalyse is uitgevoerd, wordt een gemiddelde vetwaarde gebruikt om de BCF te normaliseren. Voor de BCF in de stationaire toestand moet de gemiddelde waarde worden gebruikt die aan het einde van de opnamefase in de behandelingsgroep is geregistreerd. Voor de normalisatie van een kinetische BCF kunnen zich situaties voordoen waarin een andere aanpak gerechtvaardigd is, bijvoorbeeld als het vetgehalte tijdens de opnamefase of depuratiefase duidelijk is gewijzigd. Er moet in de regel echter een rantsoen worden gebruikt die het risico van sterke wijzigingen in het vetgehalte tot een minimum beperkt.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Vergelijking A5.30]}$$

waarbij

BCF_{KL} = naar vetgehalte genormaliseerde kinetische BCF (L kg^{-1})

L_n = gemiddelde vetfractie (op basis van het versgewicht)

BCF_K = kinetische BCF (L kg^{-1})

LITERATUUR

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(2) Hoofdstuk C.20 van deze bijlage, *Daphnia magna voortplantingstest*.

(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) OESO (2011), QSAR Toolbox 2.1. Februari 2011. Beschikbaar op: 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, VS: 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

Aanhangsel 6

VERGELIJKINGEN VOOR TESTS MET BLOOTSTELLING VIA HET WATER: BEPERKTE TESTOPZET

De grondgedachte van deze aanpak is dat de bioconcentratiefactor in een volledige test kan worden bepaald als een bioconcentratiefactor in stationaire toestand (BCF_{SS}) door de verhouding tussen de concentratie van de teststof in het weefsel van de vissen en de concentratie van de teststof in het water te berekenen, of door de kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) te berekenen als de verhouding tussen de opnamesnelheidsconstante k_1 en de depuratiesnelheidsconstante k_2. De BCF_K is ook geldig als tijdens de opname geen concentratie van de stof in stationaire toestand wordt bereikt, mits die opname- en depuratieprocessen ongeveer eersteordekinetiek vertonen.

Als een meting van de concentratie van de stof in weefsels (C_{f1}) wordt verricht op het tijdstip waarop de blootstelling eindigt (t_1) en de concentratie in het weefsel (C_{f2}) opnieuw wordt gemeten nadat een bepaalde tijdsperiode is verstreken (t_2), kan de depuratiesnelheidsconstante (k_2) worden geschat met vergelijking A5.22 in aanhangsel 5.

De opnamesnelheidsconstante, k_1, kan dan algebraïsch worden bepaald met vergelijking A5.23 in aanhangsel 5 (waarin C_f gelijk is aan C_{f1} en t gelijk is aan t_1) (1). De kinetische bioconcentratiefactor voor de beperkte opzet (aangeduid als BCF_{Km} om hem te onderscheiden van kinetische bioconcentratiefactoren die met andere methoden worden bepaald) is dus:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Vergelijking A6.1]}$$

De concentraties of resultaten moeten worden gecorrigeerd voor groeiverdunning en worden genormaliseerd naar een vetgehalte van de vissen van 5 %, zoals is beschreven in aanhangsel 5.

De beperkte BCF_{SS} is de BCF die wordt berekend aan het einde van de opnamefase, ervan uitgaande dat de stationaire toestand is bereikt. Dit kan slechts een aanname zijn, want het aantal monsternamepunten is onvoldoende om dit aan te tonen.

$$\text{beperkteBCF}_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[Vergelijking A6.2]}$$

waarin

$C_{f\text{-}minSS}$ = concentratie in de vissen bij veronderstelde stationaire toestand aan het einde van de opname (mg kg^{-1} versgewicht),

$C_{w\text{-}minSS}$ = concentratie in het water bij veronderstelde stationaire toestand aan het einde van de opname (mg l^{-1}).

LITERATUUR

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Aanhangsel 7

VERGELIJKINGEN VOOR TESTS MET BLOOTSTELLING VIA HET VOER

1. Voorbeeld van hoeveelheden van componenten van een geschikt commercieel visvoer

2. Voorbeelden van methoden voor het verrijken van voer

3. Berekening van het rendement van de assimilatie en de biomagnificatiefactor

4. Correctie voor vetgehalte

5. Evaluatie van verschillen tussen gemeten tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,m}$) en afgeleide tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,d}$)

6. Leidraad voor zeer snel depurerende teststoffen

1. VOORBEELD VAN HOEVEELHEDEN VAN COMPONENTEN VAN EEN GESCHIKT COMMERCIEEL VISVOER

Belangrijkste component	vismeel
Ruw eiwit	≤ 55,0 %
Ruw vet	≤ 15,0 % ([1])
Ruwe celstof	≥ 2,0 %
Vocht	≥ 12 %
As	≥ 8 %

([1]) In sommige gebieden is mogelijk alleen visvoer verkrijgbaar met een vetconcentratie die ver onder deze bovengrens ligt. In dergelijke gevallen moeten studies met de lagere vetconcentratie in het voer zoals geleverd worden uitgevoerd, en moet de dosering worden aangepast om de vissen gezond te houden. Het vetgehalte van voer mag niet kunstmatig worden verhoogd door toevoeging van een overmaat aan olie.

2. VOORBEELDEN VAN METHODEN VOOR HET VERRIJKEN VAN VOER

Algemene punten

De controlevoeders moeten op precies dezelfde manier worden bereid als het verrijkte voer, maar zonder aanwezigheid van de teststof.

Om de concentratie van het behandelde voer te controleren, moeten met een geschikte extractiemethode monsters van het toegediende voedsel in drievoud worden genomen en moet de concentratie of radioactiviteit van de teststof in de extracten worden gemeten. Er moeten hoge analytische recovery's (> 85 %) met geringe verschillen tussen monsters worden aangetoond (de concentraties van de stof in drie monsters die aan het begin van de test zijn genomen, mogen niet meer dan ± 15 % afwijken van het gemiddelde).

Tijdens de test via het voer moeten op dag 0 en aan het einde van de opnamefase drie voermonsters voor analyses worden genomen om het gehalte van de teststof in het voer te bepalen.

Bereiding van visvoer met een vloeibaar testmateriaal (zuiver)

Er wordt een nominale doelconcentratie van de teststof in het voer van de behandelde vissen vastgesteld, bijvoorbeeld 500 µg teststof/g voer. De juiste hoeveelheid (wat betreft molaire massa of specifieke radioactiviteit) aan zuivere teststof wordt toegevoegd aan een bekende hoeveelheid visvoer in een glazen pot of kolf van een roterende verdamper. De hoeveelheid visvoer moet toereikend zijn voor de duur van de opnamefase (rekening houdend met de noodzaak om de hoeveelheden bij elke voedselverstrekking te verhogen vanwege groei van de vissen). Het visvoer/de teststof moet een nacht lang worden

▼M7

gemengd door trage tuimelbewegingen (bv. met een roto-rack mixer of door rotatie indien een kolf van een roterende verdamper wordt gebruikt). Het verrijkte voer moet worden bewaard onder omstandigheden waarbij de stabiliteit van de teststof in het voermengsel tot gebruik behouden blijft (bv. gekoeld).

Bereiding van visvoer met mais- of visolie als medium

Vaste teststoffen moeten in een vijzel tot een fijn poeder worden vermalen. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan de mais- of visolie worden toegevoegd. De teststof wordt opgelost in een bekende hoeveelheid mais- of visolie (bv. 5-15 ml). De gedoseerde olie wordt kwantitatief overgebracht in een kolf van geschikte grootte van een roterende verdamper. De fles die is gebruikt om de gedoseerde olie in te bereiden, moet met twee kleine aliquots olie worden gespoeld en deze moeten worden toegevoegd aan de kolf om ervoor te zorgen dat alle opgeloste teststof wordt overgebracht. Om te waarborgen dat de teststof volledig wordt opgelost/gedispergeerd in de olie (of als in de studie meer dan één teststof wordt gebruikt), wordt een microroerder toegevoegd, wordt de fles met een stop afgesloten en wordt het mengsel een nacht lang snel geschud. Aan de kolf wordt een passende hoeveelheid visvoer (gewoonlijk in korrelvorm) voor de test toegevoegd, en de inhoud van de kolf wordt gemengd tot hij homogeen is door de glazen kolf gedurende ten minste 30 minuten, maar bij voorkeur een nacht lang, voortdurend te keren. Het verrijkte voer wordt daarna onder passende omstandigheden (bv. gekoeld) bewaard om de stabiliteit van de teststof in het voer tot gebruik te waarborgen.

Bereiding van visvoer met een organisch oplosmiddel

Een passende hoeveelheid teststof (wat betreft molaire massa of specifieke radioactiviteit) die toereikend is om de beoogde dosis te bereiken, wordt opgelost in een geschikt organisch oplosmiddel (bv. cyclohexaan of aceton; 10-40 ml, maar indien nodig een groter volume, afhankelijk van de hoeveelheid voedsel die moet worden verrijkt). Hetzij een aliquot van deze oplossing hetzij alle oplossing (beetje bij beetje toegevoegd) wordt gemengd met de juiste hoeveelheid visvoer om in de test het vereiste nominale dosisniveau te bereiken. Het voedsel/de teststof kan worden gemengd in een mengkom van roestvrij staal, en het vers gedoseerde visvoer kan in de mengkom twee dagen (onder af en toe roeren) in een zuurkast worden geplaatst zodat het overtollige oplosmiddel kan verdampen, of in een kolf van een roterende verdamper onder voortdurend roteren worden gemengd. Het overtollige oplosmiddel kan, indien nodig, onder een stroom van lucht of stikstof worden „weggeblazen”. Er moet op worden gelet dat de teststof niet kristalliseert terwijl het oplosmiddel wordt verwijderd. Het verrijkte voer moet worden bewaard onder omstandigheden (bv. gekoeld) waarbij de stabiliteit van de teststof in het voermengsel tot gebruik behouden blijft.

3. BEREKENING VAN HET RENDEMENT VAN DE ASSIMILATIE EN DE BIOMAGNIFICATIEFACTOR

Om het rendement van de assimilatie te berekenen, moet eerst de algemene depuratiesnelheidsconstante worden geschat volgens paragraaf 4 van aanhangsel 5 (met behulp van de „sequentiële methode”, d.w.z. standaard lineaire regressie) op basis van gemiddelde concentraties van de monsters uit de depuratiefase. De voedingssnelheidsconstante, I, en opnameduur, t, zijn bekende parameters in de studie. C_{voedsel}, de gemiddelde gemeten concentratie van de teststof in het voedsel, is een gemeten variabele in de studie. $C_{0,\text{d}}$, de concentratie van de teststof in de vissen aan het einde van de opnamefase, wordt gewoonlijk afgeleid uit het intercept van een grafiek waarin de natuurlijke logaritme van de concentratie is uitgezet tegen de depuratiedag.

Het rendement van de assimilatie van de teststof (a, absorptie van de teststof via de darm) wordt berekend als:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{voedsel}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Vergelijking A7.1]}$$

waarbij:

$C_{0,d}$ = afgeleide concentratie in de vissen op tijdstip nul van de depuratiefase (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = algemene (niet voor groei gecorrigeerde) depuratiesnelheidsconstante (dag^{-1}), berekend volgens de vergelijkingen in aanhangsel 5, paragraaf 3;

I = voedselingestiesnelheidsconstante (g voedsel g^{-1} vis dag^{-1});

$C_{voedsel}$ = concentratie in het voedsel (mg kg^{-1} voedsel);

t = duur van de voederperiode (dag).

Het kan echter noodzakelijk zijn de in de berekening gebruikte voedingssnelheid, I, aan de groei van de vissen aan te passen om een nauwkeurig rendement van de assimilatie, a, te verkrijgen. In een test waarin vissen tijdens de opnamefase substantieel groeien (waarbij de hoeveelheden voer niet worden gecorrigeerd om een vaste voedingssnelheid te behouden), zal de effectieve voedingssnelheid lager dan de vastgestelde voedingssnelheid worden naarmate de opnamefase verstrijkt, met als gevolg een hoger 'werkelijk' rendement van de assimilatie. (Er zij opgemerkt dat dit niet van belang is voor de algemene berekening van BMF, aangezien de I-termen in vergelijking A7.1 en vergelijking A7.4 effectief tegen elkaar wegvallen.) De gemiddelde voedingssnelheid gecorrigeerd voor groeiverdunning, I_g, kan op meerdere manieren worden afgeleid, maar een eenvoudige en nauwgezette manier is de bekende groeisnelheidsconstante (k_g) te gebruiken om de gewichten van de testvissen op tijdstippen tijdens de opnamefase te schatten, d.w.z.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Vergelijking A7.2]}$$

waarbij

$W_f(t)$ = gemiddelde gewicht van de vissen op opnamedag t

$W_{f,0}$ = gemiddelde gewicht van de vissen aan het begin van het experiment

Op deze manier kan (ten minste) het gemiddelde gewicht van de vissen op de laatste blootstellingsdag ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$) worden geschat. Aangezien de voedingssnelheid was vastgesteld op basis van $W_{f,0}$, kan de effectieve voedingssnelheid voor elke dag van de opname worden berekend met behulp van deze twee gewichten. De voor groei gecorrigeerde voedingssnelheid, I_g (g voedsel g^{-1} vis dag^{-1}), die moet worden gebruikt in plaats van I als er sprake is van snelle groei tijdens de opnamefase, kan dan worden berekend als:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,einde\ opname}} \qquad \text{[Vergelijking A7.3]}$$

Nadat het rendement van de assimilatie is verkregen, kan de BMF worden berekend door het rendement van de assimilatie te vermenigvuldigen met de voedingssnelheidsconstante I (of I_g, indien deze is gebruikt om α te berekenen) en het product te delen door de algemene depuratiesnelheidsconstante k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Vergelijking A7.4]}$$

De voor groei gecorrigeerde biomagnificatiefactor moet ook op deze manier worden berekend, met behulp van de voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (zoals afgeleid overeenkomstig paragraaf 7 van aanhangsel 5). Ook hier moet I_g in plaats van I worden gebruikt indien I_g is gebruikt om α te berekenen:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Vergelijking A7.5]}$$

waarbij:

α = rendement van de assimilatie (absorptie van de teststof via de darm);

k_2 = algemene (niet voor groei gecorrigeerde) depuratiesnelheidsconstante (dag^{-1}), berekend volgens de vergelijkingen in aanhangsel 5, paragraaf 3;

▼M7

k_{2g} = voor groei gecorrigeerde depuratiesnelheidsconstante (dag^{-1});

I = voedselingestiesnelheidsconstante (g voedsel g^{-1} vis dag^{-1});

De voor groei gecorrigeerde halveringsperiode ($t_{1/2}$) wordt als volgt berekend:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \qquad \text{[Vergelijking A7.6]}$$

Het rendement van de assimilatie van de stof uit het voer kan ook worden geschat als tijdens de lineaire fase van de opnamefase (tussen dag 1 en dag 3) de residuen in weefsel worden bepaald. In dit geval kan het rendement van de assimilatie van de stof (α) worden bepaald als:

$$\alpha = \frac{C_{vis}(t)}{I \times C_{voedsel} \times t} \qquad \text{[Vergelijking A7.7]}$$

waarin

$C_{vis}(t)$ = de concentratie van de teststof in de vissen op tijdstip t (mg kg^{-1} versgewicht).

4. CORRECTIE VOOR VETGEHALTE

Indien het vetgehalte voor alle bemonsteringsintervallen bij dezelfde vissen werd gemeten als de concentratie van de teststof, moeten de afzonderlijke concentraties worden gecorrigeerd op basis van het vetgehalte en moet de natuurlijke logaritme van de voor vetgehalte gecorrigeerde concentratie worden uitgezet tegen de depuratie (dag) om $C_{0,d}$ en k_2 te verkrijgen. Het rendement van de assimilatie (vergelijking A7.1) kan daarna worden berekend op basis van het vetgehalte, met behulp van $C_{voedsel}$ op basis van het vetgehalte (d.w.z. $C_{voedsel}$ wordt vermenigvuldigd met de gemiddelde vetfractie van het voedsel). Verdere berekeningen met behulp van vergelijking A7.4 en vergelijking A7.5 geven rechtstreeks de voor vetgehalte gecorrigeerde (en voor groeiverdunning gecorrigeerde) BMF.

In het andere geval worden de gemiddelde vetfractie (g/g) in de vissen en in het voedsel afgeleid voor zowel de behandelings- als de controlegroep (voor voedsel en vissen in de controlegeroep wordt dit gewoonlijk gedaan op basis van gegevens die aan het begin en aan het einde van de blootstelling zijn gemeten; voor vissen in de behandelingsgroep wordt dit gewoonlijk gedaan uitsluitend op basis van gegevens die aan het einde van de blootstelling zijn gemeten). In sommige studies kan het vetgehalte in vissen duidelijk toenemen; in dergelijke gevallen is het passender om een gemiddelde vetconcentratie in de testvissen te gebruiken die is berekend uit de gemeten waarden aan het einde van de blootstelling en het einde van de depuratie. In het algemeen moeten uitsluitend gegevens van de behandelingsgroep worden gebruikt om beide vetfracties af te leiden.

De vetcorrectiefactor (L_c) wordt berekend als:

$$L_C = \frac{L_{vis}}{L_{voedsel}} \qquad \text{[Vergelijking A7.8]}$$

waarin L_{vis} en $L_{voedsel}$ de gemiddelde vetfracties in respectievelijk vis en voedsel zijn.

De vetcorrectiefactor wordt gebruikt om de voor vetgehalte gecorrigeerde biomagnificatiefactor (BMF_L) te berekenen:

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Vergelijking A7.9]}$$

5. EVALUATIE VAN VERSCHILLEN TUSSEN GEMETEN TIJDSTIP-NUL-CONCENTRATIE ($C_{0,M}$) EN AFGELEIDE TIJDSTIP-NUL-CONCENTRATIE ($C_{0,D}$)

De gemeten tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,m}$) en de afgeleide tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,d}$) moeten worden vergeleken. Indien ze min of meer gelijk zijn, ondersteunt dit het eersteordemodel dat is gebruikt om de depuratieparameters af te leiden.

▼M7

In sommige studies kan er een duidelijk verschil zijn tussen de afgeleide tijdstip-nul-waarde, $C_{0,d}$, en de gemiddelde gemeten tijdstip-nul-concentratie, $C_{0,m}$ (zie laatste aandachtsstreepje van punt 159 van deze testmethode). Indien $C_{0,d}$ heel veel lager is dan $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), kan het verschil een aanwijzing vormen voor de aanwezigheid van onverteerd verrijkt voedsel in de darm. Dit kan experimenteel worden getoetst door een aparte analyse op de weggenomen darm uit te voeren indien aan het einde van de opnamefase aanvullende monsters (hele vissen) zijn genomen en bewaard. Anders kan, indien een statistisch geldige uitschietertoets die werd toegepast op de lineaire regressie voor de depuratiefase erop wijst dat het eerste monsternamepunt van de depuratie ten onrechte hoog is, het passend zijn om de lineaire regressie uit te voeren om k_2 af te leiden maar de concentratie van het eerste monsternamepunt in de depuratie weg te laten. In dergelijke gevallen kan het, als de onzekerheid in de lineaire regressie sterk verminderd is en het duidelijk is dat de depuratie ongeveer eersteordekinetiek vertoont, passend zijn om in de berekening van het rendement van de assimilatie de resulterende waarden voor $C_{0,d}$ en k_2 te gebruiken. Dit moet in het verslag uitvoerig worden verantwoord. Het is ook mogelijk dat het proces in de depuratiefase geen eersteordekinetiek vertoont. Als dit waarschijnlijk is (*d.w.z.* als de natuurlijke logaritmen van de gegevens een kromme lijken te volgen, vergeleken met de rechte lijn in de grafiek van de lineaire regressie), zijn de berekeningen van k_2 en $C_{0,d}$ waarschijnlijk niet geldig en moet het advies van een biostatisticus worden ingewonnen.

Indien $C_{0,d}$ heel veel hoger is dan de gemeten waarde ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), kan dit een aanwijzing vormen: dat de stof heel snel werd gedepureerd (d.w.z. monsternamepunten bereikten heel vroeg in de depuratiefase de bepaalbaarheidsgrens van de analysemethode, vgl. paragraaf 6 hieronder); dat er een afwijking van eersteordedepuratiekinetiek was; dat de lineaire regressie om k_2 en $C_{0,d}$ af te leiden, gebrekkig is; of dat er op een of meer bemonsteringstijdstippen een probleem met de gemeten concentraties in de studie was. In dergelijke gevallen moet de grafiek van de lineaire regressie nauwkeurig worden onderzocht op bewijs van monsters op of rond de bepaalbaarheidsgrens, op uitschieters en op een duidelijke kromming (wat een aanwijzing kan zijn dat het proces mogelijk geen eersteordekinetiek vertoont), en moet dit in het verslag naar voren worden gebracht. Elke daaropvolgende herbeoordeling van de lineaire regressie om de geschatte waarden te verbeteren, moet worden beschreven en gerechtvaardigd. Indien een duidelijke afwijking van eersteordekinetiek wordt waargenomen, zijn de berekeningen van k_2 en $C_{0,d}$ waarschijnlijk niet geldig en moet het advies van een biostatisticus worden ingewonnen.

6. LEIDRAAD VOOR ZEER SNEL DEPURERENDE TESTSTOFFEN

Zoals besproken in punt 129 van de testmethode, kunnen sommige stoffen zo snel depureren dat geen betrouwbare tijdstip-nul-concentratie, $C_{0,d}$, en k_2 kunnen worden afgeleid omdat de stof heel vroeg in de depuratiefase (d.w.z. vanaf het tweede monster in de depuratiefase) in feite al niet meer wordt gemeten in monsters (concentratie gerapporteerd op de bepaalbaarheidsgrens). Deze situatie werd waargenomen in de ringtest die werd uitgevoerd tot staving van deze testmethode met benzo[a]pyreen, en is gedocumenteerd in het validatierapport voor de methode. In dergelijke gevallen kan geen betrouwbare lineaire regressie worden uitgevoerd en zal lineaire regressie waarschijnlijk een onrealistisch hoge schatting van $C_{0,d}$ opleveren, die leidt tot een schijnbaar rendement van de assimilatie dat veel groter is dan 1. Het is mogelijk in deze gevallen een conservatieve schatting van k_2 en een „bovengrens” voor de BMF te berekenen.

Met behulp van de gegevenspunten van de depuratiefase waarvoor een concentratie werd gemeten, tot en met het eerste monsternamepunt waarvoor geen concentratie werd aangetoond (concentratie vastgesteld op de bepaalbaarheidsgrens), zal een lineaire regressie (voor de natuurlijke logaritme van de concentratiegegevens uitgezet tegen de tijd) een schatting van k_2 opleveren. Voor dit soort gevallen betreft dit waarschijnlijk slechts twee gegevenspunten (bv. bemonsteringsdagen 1 en 2 van de depuratie) en kan k_2 daarna worden geschat met behulp van vergelijking A5.22 in aanhangsel 5. Deze schatting van k_2 kan worden gebruikt om een rendement van de assimilatie te schatten overeenkomstig vergelijking A7.1, waarbij de waarde van $C_{0,d}$ in de

▼M7

vergelijking wordt vervangen door de gemeten tijdstip-nul-concentratie ($C_{0,m}$) in gevallen waarin $C_{0,d}$ duidelijk veel hoger wordt geschat dan in de test haalbaar zou zijn. Indien $C_{0,m}$ niet meetbaar was, moet de aantoonbaarheidsgrens in visweefsel worden gebruikt. Indien dit, in sommige gevallen, een waarde voor α groter dan 1 oplevert, wordt uitgegaan van een „worst case", d.w.z. van een rendement van de assimilatie dat gelijk is aan 1.

De maximale BMF_K kan dan worden geschat met behulp van vergelijking A7.4 en moet worden opgegeven als een waarde „veel kleiner dan" (<<). Voor een studie die is uitgevoerd met een voedingssnelheid van 3 %, een halveringsperiode in de depuratiefase van minder dan 3 dagen en een α die gelijk is aan 1 („worst case"), zal de BMF_K waarschijnlijk kleiner zijn dan ongeveer 0,13. Gezien het doel van deze schatting en het feit dat waarden conservatief van aard zullen zijn, is het niet nodig ze te corrigeren voor groeiverdunning of voor het vetgehalte van de vissen of het voer.

▼M7

Aanhangsel 8

BENADERINGEN OM TENTATIEVE BCF'S TE SCHATTEN OP BASIS VAN GEGEVENS VERZAMELD IN DE STUDIE MET BLOOTSTELLING VIA HET VOER

De methode via het voer is in deze testmethode opgenomen voor het testen van de bioaccumulatie van stoffen die in de praktijk niet met de methode met blootstelling via het water kunnen worden getest. De methode met blootstelling via het water levert een bioconcentratiefactor op, terwijl de methode via het voer rechtstreeks informatie geeft over het biomagnificatiepotentieel van voer. In veel veiligheidsvoorschriften voor chemische stoffen is informatie over de aquatische bioconcentratie vereist (bijvoorbeeld in risicobeoordelingen en het Globally Harmonization System of Classification). Het is dus nodig de in een studie via voer verkregen gegevens te gebruiken om een bioconcentratiefactor te schatten die vergelijkbaar is met de factor uit tests die volgens de methode met blootstelling via het water zijn uitgevoerd ([1]). In deze paragraaf worden benaderingen onderzocht die daartoe kunnen worden gevolgd en worden de tekortkomingen erkend die inherent zijn aan de schattingen.

De studie via het voer meet de depuratie om een depuratiesnelheidsconstante, k_2, te verkrijgen. Indien op basis van de beschikbare gegevens een opnamesnelheidsconstante kan worden geschat voor de situatie waarin de vissen via het water werden blootgesteld aan de teststof, kan een kinetische BCF worden geschat.

De schatting van een opnamesnelheidsconstante voor blootstelling aan een teststof via het water is gebaseerd op veel aannames, die allemaal bijdragen aan de onzekerheid van de schatting. Deze manier om een BCF te schatten gaat er bovendien vanuit dat de algemene depuratiesnelheid (met inbegrip van bijdragende factoren zoals verdeling in het lichaam en depuratieprocessen in afzonderlijke vissen) onafhankelijk is van de blootstellingsmethode die is gebruikt om een bepaalde lichaamsconcentratie van de teststof te genereren.

De belangrijkste aannames die inherent zijn aan de aanpak van de schattingen kunnen als volgt worden samengevat.

De depuratie na opname via voer is voor een gegeven stof dezelfde als de depuratie na blootstelling aan die stof via het water.

De opname uit water volgt eersteordekinetiek.

Afhankelijk van de gebruikte methode om de opname te schatten:

— kan de opname worden gecorreleerd aan alleen het gewicht van de vissen,

— kan de opname worden gecorreleerd aan alleen de octanol-water-verdelingscoëfficiënt van de stof,

— kan de opname worden gecorreleerd aan een combinatie van het gewicht van de vissen en de octanol-water-verdelingscoëfficiënt van de stof,

— hebben factoren die in de praktijk van invloed kunnen zijn op de opname in een studie met blootstelling via het water, zoals de biologische beschikbaarheid van de stof, zijn adsorptie aan apparatuur, zijn molecuulgrootte enz., weinig effect,

— en, heel belangrijk:

is de databank („oefenset”) die is gebruikt om de methode voor de schatting van de opname te ontwikkelen, representatief voor de onderzochte stof.

In diverse publicaties in de open literatuur zijn vergelijkingen afgeleid die de opname uit water in vissen via de kieuwen relateren aan een octanol-water-verdelingscoëfficiënt van de stof, het gewicht van vissen (1) (2) (3) (4), het volume en/of vetgehalte, permeatie/diffusie door membranen (5) (6), ventilatievolume van vissen (7) en door een fugaciteit/massabalansaanpak (8) (9) (10). Een gedetailleerde evaluatie van dergelijke methoden in deze context wordt gegeven in

([1]) In het wild is de route die in aquatische milieus tot de grootste blootstelling leidt, voor zeer hydrofobe stoffen waarschijnlijk de route via ingestie, en dus is een geschatte BCF strikt genomen niet representatief voor het bioaccumulatiepotentieel van een dergelijke stof.

▼M7

Crookes & Brooke (11). Een publicatie van Barber (12) die zich richt op de modellering van bioaccumulatie via opname uit het voer, is in deze context ook nuttig, aangezien zij ook ingaat op bijdragen van modellen voor de opnamesnelheid via de kieuwen. Ook een paragraaf van het achtergronddocument bij het protocol betreffende blootstelling via het voer uit 2004 (13) is gewijd aan dit aspect.

De meeste van deze modellen lijken te zijn afgeleid met behulp van beperkte databanken. Voor modellen waarvoor bijzonderheden beschikbaar zijn over de databank die bij het opstellen van het model werd gebruikt, blijkt dat de gebruikte typen stoffen vaak een vergelijkbare structuur hebben of tot een vergelijkbare klasse behoren (op het punt van functionaliteit, bijvoorbeeld gechloreerde organische verbindingen). Dit vergroot de onzekerheid wanneer een model wordt gebruikt om voor een ander type stoffen een opnamesnelheidsconstante te ramen, naast de voor de test specifieke overwegingen zoals soort, temperatuur enz.

In een beoordeling van de beschikbare technieken (11) werd naar voren gehaald dat niet één methode „correcter" is dan de andere. Daarom moet een duidelijke rechtvaardiging voor het gebruik van een bepaald model worden gegeven. Wanneer er meerdere methoden beschikbaar zijn waarvan het gebruik te rechtvaardigen is, kan het verstandig zijn om meerdere schattingen van k_1 (en dus van BCF) of een bereik van k_1-waarden (en BCF-waarden) volgens meerdere schattingsmethoden voor de opname te presenteren. Gezien de verschillen in de typen modellen en de gegevensverzamelingen die voor de ontwikkeling ervan werden gebruikt, is het echter niet juist een gemiddelde waarde te nemen van schattingen die op verschillende manieren zijn verkregen.

Sommige onderzoekers hebben geponeerd dat dit soort BCF-schattingen moeten worden gecorrigeerd voor de biologische beschikbaarheid om rekening te houden met de adsorptie van een stof aan opgeloste organische koolstof (DOC) in omstandigheden met blootstelling via het water, teneinde de schattingen in overeenstemming te brengen met de resultaten van studies met blootstelling via het water (bv. (13) (14)). Deze correctie is mogelijk echter niet gepast, gezien de lage DOC-niveaus in een studie met blootstelling via het water voor een „worst case"-schatting (d.w.z. verhouding van biologisch beschikbare stof en stof als gemeten in de oplossing). Voor zeer hydrofobe stoffen kan de opname via de kieuwen beperkt worden door de snelheid van de passieve diffusie dicht bij het kieuwoppervlak; in dit geval pakt de correctie mogelijk dit effect aan, in plaats van hetgeen waarvoor zij was bedoeld.

Het is aan te bevelen zich te richten op methoden die inputs vereisen waarvoor gemakkelijk gegevens te vinden zijn voor de stoffen die volgens de hier beschreven studie via het voer worden getest (d.w.z. log K_{OW}, gewicht van de vis). Andere methoden waarvoor complexere inputs nodig zijn, kunnen worden toegepast, maar daarvoor kunnen aanvullende metingen in de test nodig zijn of kan gedetailleerde kennis van de teststof of de vissoort vereist zijn die mogelijk niet breed beschikbaar is. Daarnaast kan de keuze van het model ook worden beïnvloed door het niveau van de validering en het toepassingsgebied (zie (11) voor een beoordeling en vergelijking van verschillende methoden).

Er moet rekening worden gehouden met het feit dat de resulterende schatting van k_1 en de geschatte BCF onzeker zijn en mogelijk samen met de afgeleide BMF en stofparameters (bv. molecuulgrootte) moeten worden onderworpen aan een op bewijskracht gebaseerde aanpak om een totaalbeeld van het bioaccumulatiepotentieel van een stof te krijgen. De interpretatie en het gebruik van deze parameters kan afhangen van het regelgevingskader.

LITERATUUR

(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, VS: 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, VS: 189-231.

▼B

C.14. GROEITEST ONVOLWASSEN VISSEN

1. METHODE

Deze groei-toxiciteitstest is overgenomen van OESO TG 215 (2000).

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het beoordelen van de effecten van een langdurige blootstelling aan chemische stoffen op de groei van onvolwassen vissen. De test is gebaseerd op een methode, die binnen de Europese Unie is ontwikkeld en getest met de rondzendproef (1) (3), voor het beoordelen van de effecten van chemische stoffen op de groei van onvolwassen regenboogforel *(Oncorynchus mykiss)* in een doorstroomprocedure. Voor deze test mogen ook andere goed gedocumenteerde vissoorten worden gebruikt. In het verleden zijn bijvoorbeeld al eens groeitests uitgevoerd met zebravissen *(Danio rerio)* ([1]) (2) (4) (5) en rijstvissen (medaka, *Oryzias latipes)* (6) (7) (8).

Zie ook Algemene inleiding, deel C.

1.2. DEFINITIES

Lowest observed effect concentration (LOEC): de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een significant effect ($p < 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter is dan de LOEC.

No observed effect concentration (NOEC): de testconcentratie direct onder de LOEC.

EC_X: bij deze testmethode wordt de concentratie van de teststof die x % variatie in de groeisnelheid van de vissen veroorzaakt vergeleken met de controlegroepen.

Densiteit: het natte gewicht van de vissen per volume water.

Bezettingsgraad: het aantal vissen per volume water.

Specifieke groeisnelheid van de afzonderlijke vissen: de groeisnelheid van één afzonderlijke vis met als uitgangspunt het begingewicht.

Gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak: de gemiddelde groeisnelheid van een bakpopulatie bij een bepaalde concentratie.

Pseudo-specifieke groeisnelheid: de afzonderlijke groeisnelheid van de vissen vergeleken met het gemiddelde begingewicht van de bakpopulatie.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (Danio Rerio), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Onvolwassen vissen in exponentiële groeifasen worden, nadat ze zijn gewogen, in testkamers geplaatst en blootgesteld aan een reeks subletale concentraties van de teststof die is opgelost in water. Hierbij moet bij voorkeur de doorstroomprocedure worden gebruikt. Als dit niet mogelijk is, moet een geschikte semistatische procedure (statisch-verversing) worden gebruikt. De test duurt 28 dagen. De vissen worden dagelijks gevoerd. Het voedselrantsoen is afhankelijk van het begingewicht van de vissen en kan indien gewenst na 14 dagen opnieuw worden berekend. Na afloop van de test worden de vissen opnieuw gewogen. De effecten op de groeisnelheid worden geanalyseerd met een regressiemodel, zodat kan worden geraamd welke concentratie x % variatie in de groeisnelheid kan veroorzaken, d.w.z. EC_X (bijvoorbeeld EC_{10}, EC_2 of EC_{30}). De gegevens kunnen ook worden vergeleken met de controlewaarden, zodat de LOEC en NOEC kunnen worden bepaald.

1.4. GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

Resultaten van een acute toxiciteitstest (zie methode C.1), bij voorkeur met dezelfde vissoort als in deze test is gebruikt, moeten beschikbaar zijn. Dit betekent dat de oplosbaarheid in water en de dampspanning van de teststof bekend moeten zijn en dat er een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar is voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen.

Nuttige gegevens over de teststof zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit van de stof in water en licht, pK_a, P_{ow} en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C.4).

1.5. GELDIGHEID VAN DE TEST

De test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

— het sterftecijfer in de controlegroep(en) mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 10 %;

— het gemiddelde gewicht van vissen in de controlegroep(en) moet zodanig zijn toegenomen dat de minimumvariatie in groeisnelheid die als significant wordt beschouwd, kan worden gedetecteerd. Een rondzendproef (3) heeft aangetoond dat bij regenboogforel het gemiddelde gewicht van vissen in de controlegroepen binnen 28 dagen met minimaal de helft (d.w.z. 50 %) van hun gemiddelde begingewicht moet zijn toegenomen. Bijvoorbeeld: begingewicht 1 g/vis (= 100 %), eindgewicht na 28 dagen: ≥ 1,5 g/vis (≥ 150 %);

— het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test minimaal 60 % van de verzadigingswaarde van lucht zijn geweest;

— het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers mag op geen enkel moment van de test groter zijn dan ± 1 °C. Tevens mag de watertemperatuur niet meer dan 2 °C hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 1).

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Apparatuur**

Standaardlaboratoriumapparatuur, met name:

a) zuurstof- en pH-meters;

▼B

b) apparatuur voor het bepalen van de hardheid en alkaliteit van water;

c) geschikte apparatuur voor de temperatuurregeling en bij voorkeur ook voor continue bewaking;

d) bakken van chemisch inert materiaal met een inhoud die geschikt is voor de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad (zie punt 1.8.5 en aanhangsel 1);

e) weegschaal met een toereikende nauwkeurigheid (d.w.z. nauwkeurig tot op ± 0,5 %).

1.6.2. **Water**

Water waarin de gekozen testsoort langdurig kan overleven en groeien is geschikt als testwater. Gedurende de test moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde moet binnen een bereik van 6,5 en 8,5 blijven, maar tijdens een test mag deze niet meer dan ± 0,5 pH-eenheden schommelen. De aanbevolen hardheid is 140 mg/l ($CaCO_3$) of hoger. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof), moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl en SO_4), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pes-ticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar. In aanhangsel 2 worden enkele chemische kenmerken van geschikt verdunningswater genoemd.

1.6.3. **Testoplossingen**

De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing.

De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt.

Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (ontsluitingsmiddelen) kan in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van passende oplosmiddelen zijn aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxide, dimethylformamide en triethyleenglycol. Voorbeelden van passende dispergeermiddelen zijn Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40. Als gemakkelijk biologisch afbreekbare agentia (bijvoorbeeld aceton) en/of zeer vluchtige stoffen worden gebruikt, moet worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in de doorstroomtests kunnen voordoen. Indien wordt gebruikgemaakt van een ontsluitingsmiddel, mag dit geen grote invloed hebben op de groei en geen zichtbaar negatief effect hebben op de onvolwassen vissen, hetgeen blijkt uit de controlegroep met uitsluitend oplosmiddel.

▼B

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Met een rondzendproef (3) is aangetoond dat, bij regenboogforel, een verversingsfrequentie tijdens de test van 6 liter/g vis per dag acceptabel is (zie punt 1.8.2.2).

Bij semistatische (verversings)tests hangt de verversingsfrequentie af van de stabiliteit van de teststof, maar dagelijks verversen van water wordt aanbevolen. Als uit eerdere stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de concentratie van de teststof gedurende de verversingsperiode niet stabiel blijft (d.w.z. buiten 80-120 % van de nominale concentratie valt of onder 80 % van de gemeten oorspronkelijke concentratie), moet worden overwogen om over te gaan op een doorstroomtest.

1.6.4. **Keuze van de vissoort**

Voor deze test wordt de regenboogforel *(Oncorhynchus mykiss)* aanbevolen omdat hiermee met de rondzendproef de meeste ervaring is opgedaan (1) (2). Andere goed gedocumenteerde vissoorten mogen ook worden gebruikt, maar de testprocedure moet wellicht worden aangepast teneinde passende testomstandigheden te creëren. In het verleden is bijvoorbeeld ook ervaring opgedaan met zebravissen *(Danio rerio)* (3) (4) en rijstvissen (medaka, *Oryzias latipes)* (5) (6) (7). Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast.

1.6.5. **Leefomstandigheden van de vis**

De testvissen worden geselecteerd uit een populatie van één stam, bij voorkeur van hetzelfde broedsel, dat bij het begin van de test minimaal twee weken oud is en in leven gehouden is onder omstandigheden die qua waterkwaliteit en verlichting overeenkomen met die tijdens de test. Voor de gehele duur van hun verblijf en van de test moeten ze per dag een rantsoen van minimaal 2 % en bij voorkeur 4 % van hun lichaamsgewicht toegediend krijgen.

Na een gewenningsperiode van 48 uur wordt het sterftecijfer geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast:

— sterftecijfer van meer dan 10 % van de populatie binnen zeven dagen: de gehele partij afkeuren;

— sterftecijfer tussen 5 % en 10 % van de populatie: zeven dagen extra voor de aanpassing; als het sterftecijfer gedurende deze zeven dagen hoger dan 5 % is, de gehele partij afkeuren;

— sterftecijfer van minder dan 5 % van de populatie binnen zeven dagen: de gehele partij accepteren.

De vissen mogen in de twee weken voorafgaande aan de test of tijdens de test niet worden behandeld voor ziekten.

▼B

1.7. TESTOPZET

De „testopzet” heeft betrekking op het aantal testconcentraties en de factor waarmee ze van elkaar verschillen, het aantal bakken per concentratieniveau en het aantal vissen per bak. Idealiter moet bij de keuze van de testopzet rekening worden gehouden met:

a) het doel van het onderzoek;

b) de methode van statistische analyse die wordt toegepast;

c) de beschikbaarheid en kosten van experimentele middelen.

De omschrijving van het doel van het onderzoek moet, indien mogelijk, de statistische power specificeren waarbij een bepaald verschil (bijvoorbeeld in groeisnelheid) moet worden gedetecteerd, of de nauwkeurigheid specificeren waarmee de EC_x (bijvoorbeeld met x = 10, 20 of 30, en bij voorkeur niet minder dan 10) moet worden geraamd. Zonder deze gegevens kan geen goede omschrijving worden gegeven van de omvang van het onderzoek.

Het is belangrijk om te onderkennen dat een opzet die optimaal is (optimaal gebruik van de middelen) voor toepassing bij één methode voor statistische analyse, niet per definitie ook optimaal is voor een andere. De aanbevolen opzet voor de raming van een LOEC/NOEC is daardoor niet dezelfde als de opzet die wordt aanbevolen voor regressieanalyse.

In de meeste gevallen verdient regressieanalyse de voorkeur boven de variantieanalyse. De redenen daarvoor worden uiteengezet door Stephan en Rogers (9). Als er echter geen geschikt regressiemodel wordt gevonden ($r^2 < 0,9$), moet NOEC/LOEC worden gebruikt.

1.7.1. **Opzet voor regressieanalyse**

De belangrijke overwegingen bij het opzetten van een test die door middel van regressie wordt geanalyseerd, zijn:

a) de effectconcentratie (bijvoorbeeld $EC_{10,20,30}$) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is, moeten altijd begrepen zijn onder de concentraties die in de test worden gebruikt. De nauwkeurigheid waarmee de effectconcentraties kunnen worden geraamd, is optimaal wanneer de effectconcentratie zich in het midden bevindt van het bereik van geteste concentraties. Een voorbereidende test voor het vaststellen van het bereik kan nuttig zijn bij het selecteren van de juiste testconcentraties;

b) teneinde een goed statistisch model te verkrijgen, moet de test minimaal één bak met een controlegroep omvatten en vijf extra bakken met verschillende concentraties. Wanneer gebruik wordt gemaakt van een ontsluitingsmiddel, moet er naast de testreeks een controlegroep worden behandeld met de hoogste testconcentratie ontsluitingsmiddel (zie punt 1.8.3 en 1.8.4);

c) er mag worden gebruikgemaakt van een geschikte geometrische reeks of logaritmische reeks (10) (zie aanhangsel 3). De verdeling van de testconcentraties moet bij voorkeur logaritmisch zijn;

▼B

d) als er meer dan zes bakken beschikbaar zijn, moeten de extra bakken worden gebruikt als replicaatbakken of worden verdeeld over de reeks concentraties om zodoende een kleiner verschil tussen de niveaus te creëren. Beide mogelijkheden zijn even goed.

1.7.2. **Opzet voor de raming van een NOEC/LOEC met behulp van ANOVA (variantieanalyse)**

Het is wenselijk om voor elke concentratie een replicaatbak te hebben. De statistische analyse moet op bakniveau worden uitgevoerd (11). Zonder replicaatbakken kan, behalve met de variabiliteit die verband houdt met de afzonderlijke vissen, geen rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen de bakken. Bij eerdere onderzoeken is echter gebleken (12) dat de variabiliteit tussen de bakken in een dergelijke test erg klein is vergeleken met de variabiliteit in de bakken (d.w.z. tussen de vissen). Als relatief aanvaardbaar alternatief kan de statistische analyse daarom op het niveau van de afzonderlijke vissen worden uitgevoerd.

Normaliter worden er minimaal vijf testconcentraties in een geometrische reeks met een factor van bij voorkeur ten hoogste 3,2 gebruikt.

Wanneer tests worden uitgevoerd met replicaatbakken, moet het aantal replicaatbakken voor controlegroepen en dus het aantal vissen over het algemeen het dubbele zijn van het aantal in elk van de testconcentraties, die van gelijke omvang moeten zijn (13)(14)(15). Als er geen replicaatbakken zijn, moet het aantal vissen in de controlegroep gelijk zijn aan dat in elke testconcentratie.

Als de ANOVA wordt gebaseerd op bakken in plaats van afzonderlijke vissen (wat zou betekenen dat elke vis afzonderlijk moet worden gemerkt of dat moet worden gebruikgemaakt van pseudospecifieke groeisnelheden (zie punt 2.1.2)), moeten er voldoende replicaatbakken aanwezig zijn om de standaardafwijking van „bakken met concentraties” te kunnen bepalen. Dit betekent dat de niveaus van fouttolerantie in de variantieanalyse minimaal 5 moeten zijn (11). Als er alleen replicaten worden gemaakt van de controlegroepen, bestaat het risico dat de foutvariabiliteit onzuiver is. Deze kan dan namelijk toenemen met de gemiddelde waarde van de groeisnelheid in kwestie. Omdat de groeisnelheid waarschijnlijk zal afnemen naarmate de concentratie hoger wordt, is het mogelijk dat de variabiliteit wordt overschat.

1.8. PROCEDURE

1.8.1. **Selectie en weging van de testvissen**

Het is belangrijk om de variatie in het gewicht van de vissen aan het begin van de test zoveel mogelijk te beperken. In aanhangsel 1 worden geschikte gewichtbereiken aangegeven voor de verschillende vissoorten die worden aanbevolen voor deze test. Voor de gehele partij vissen die in deze test wordt gebruikt, geldt dat het bereik van het afzonderlijke gewicht van de vissen aan het begin van de test idealiter binnen ± 10 %, maar maximaal binnen 25 %, van het rekenkundig gemiddelde blijft. Het verdient aanbeveling om voorafgaande aan de test een steekproef te nemen om het gemiddelde gewicht te bepalen.

▼B

De stampopulatie mag vanaf 24 uur voor het begin van de test niet worden gevoerd. De vissen moeten vervolgens willekeurig worden geselecteerd. De vissen krijgen een verdovingsmiddel toegediend (bijvoorbeeld een oplossing in water van 100 mg/l tricaïne-methaansulfonaat (MS 222) geneutraliseerd met twee delen natrium-bicarbonaat per deel MS 222) en worden afzonderlijk in natte toestand gewogen (drooggedept) zoals beschreven in aanhangsel 1. De vissen met een gewicht binnen het juiste bereik, moeten worden behouden en vervolgens willekeurig over de testbakken worden verdeeld. Het totale natte gewicht van alle vissen in een bak moet worden geregistreerd. Het gebruik van verdovingsmiddelen en het behandelen van de vissen (inclusief droogdeppen en wegen) kan stress en verwondingen veroorzaken bij de onvolwassen dieren, met name bij kleine soorten. Onvolwassen vissen moeten daarom uiterst voorzichtig worden behandeld om stress en verwondingen bij deze dieren te voorkomen.

Op dag 28 van de test worden de vissen opnieuw gewogen (zie punt 1.8.6). Als het echter noodzakelijk wordt geacht het rantsoen opnieuw te berekenen, mogen de vissen ook op dag 14 van de test opnieuw worden gewogen (zie punt 1.8.2.3). Er zijn ook andere methoden, zoals de fotografische methode, voor het vaststellen van veranderingen in de visgrootte aan de hand waarvan de rantsoenen kunnen worden aangepast.

1.8.2. **Blootstellingsomstandigheden**

1.8.2.1. *Duur*

De test duurt ≥ 28 dagen.

1.8.2.2. *Densiteit en bezettingsgraad*

Het is belangrijk dat de densiteit en bezettingsgraad worden afgestemd op de gebruikte vissoort (zie aanhangsel 1). Als de bezettingsgraad te hoog is, zullen de vissen gestrest raken en daardoor minder hard groeien of zelfs ziek worden. Als de bezettingsgraad te laag is, kan territoriumgedrag ontstaan, dat de groei eveneens kan beïnvloeden. In elk geval moet de densiteit zo laag zijn dat het gehalte aan opgeloste zuurstof van minimaal 60 % van de luchtverzadigingswaarde zonder beluchting in stand kan worden gehouden. Een rondzendproef (3) heeft aangetoond dat bij regenboogforel een densiteit van 16 vissen van 3-5 g in een volume van 40 liter acceptabel is. De aanbevolen waterverversingsfrequentie tijdens de test is 6 liter/g vis per dag.

1.8.2.3. *Voeding*

De vissen moeten geschikt voedsel toegediend krijgen (aanhangsel 1) in zodanige hoeveelheden dat een acceptabele groeisnelheid wordt bereikt. Bacteriegroei en troebelheid van het water moeten zoveel mogelijk worden voorkomen. Bij regenboogforel wordt waarschijnlijk aan deze voorwaarden voldaan als zij een rantsoen van 4 % van hun lichaamsgewicht per dag krijgen (3) (16) (17) (18). Het dagelijkse rantsoen kan worden verdeeld over twee gelijke porties met een tussenpoos van minimaal 5 uur. Het rantsoen is gebaseerd op het totale gewicht van de vissen in een testbak aan het begin van de test. Als de vissen op dag 14 opnieuw worden gewogen, moet het rantsoen opnieuw worden berekend. De vissen mogen vanaf 24 uur voordat ze worden gewogen, geen voedsel krijgen.

▼B

Niet gegeten voedsel en fecaal materiaal moeten dagelijks uit de testbakken worden verwijderd door de bodem van de bakken zorgvuldig schoon te maken met een zuiger.

1.8.2.4. *Licht en temperatuur*

De fotoperiode en watertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (aanhangsel 1).

1.8.3. **Testconcentraties**

Normaliter zijn er vijf concentraties van de teststof nodig, ongeacht de testopzet (zie punt 1.7.2). Eerder opgedane kennis over de toxiciteit van de teststof (bijvoorbeeld n.a.v. een acute test en/of onderzoeken voor het vaststellen van het bereik) helpt bij het kiezen van de juiste testconcentraties. Als minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet hiervoor een geldige reden worden gegeven. De hoogste geteste concentratie mag de oplosbaarheidsgrens van de teststof in water niet overschrijden.

Als een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt bij het maken van stamoplossingen, mag de uiteindelijke concentratie hiervan niet groter zijn dan 0,1 ml/l en moet de concentratie bij voorkeur in alle bakken gelijk zijn (zie punt 1.6.3). Het gebruik van deze middelen moet echter te allen tijde zoveel mogelijk worden vermeden.

1.8.4. **Controlegroepen**

Het aantal controlegroepen dat wordt behandeld met verdunningswater hangt af van de testopzet (zie punten 1.7-1.7.2). Als er een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt, moet er een aantal controlegroepen met water waaraan een ontsluitingsmiddel is toegevoegd, worden opgenomen in de test. Dit aantal moet gelijk zijn aan het aantal controlegroepen dat wordt behandeld met verdunningswater.

1.8.5. **Frequentie van de analytische bepalingen en metingen**

Tijdens de test worden de concentraties van de teststoffen regelmatig gemeten (zie hieronder).

Bij doorstroomtests moet de stroomsnelheid van het verdunningswater en de toxische stamoplossing regelmatig worden gecontroleerd, bij voorkeur dagelijks, en mag deze gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Als wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale waarden blijft (d.w.z. binnen het interval van 80-120 %; zie punt 1.6.2 en 1.6.3), is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit aan het begin van de test en daarna eens per week. Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale concentratie blijft (op basis van stabiliteitsgegevens van de teststof), moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd. Hierbij moet dezelfde procedure worden gevolgd als hierboven.

Bij semistatische (verversings)tests waarbij wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale waarden blijft, is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen, bij het begin van de test en vervolgens eens per week. Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale concentratie blijft, moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd volgens dezelfde procedure als voor de stabielere stoffen.

▼B

Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Als echter kan worden aangetoond dat de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test binnen ± 20 % van de nominale of de gemeten oorspronkelijke concentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op de nominale of gemeten waarden.

Monsters moeten mogelijk worden gefilterd (bijvoorbeeld met een 0,45 μm poriëngrootte) of gecentrifugeerd. Centrifugatie verdient de voorkeur. Als het testmateriaal echter niet aan filters adsorbeert, is filtratie mogelijk een geschikt alternatief.

In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de pH en de temperatuur in alle testbakken worden gemeten. De totale hardheid, alkaliteit en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. Het zuurstofgehalte en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten tijdens de test ten minste drie keer worden gemeten (aan het begin, omstreeks het midden en aan het eind). Bij semistatische tests is het raadzaam het opgeloste zuurstofgehalte vaker te meten, bij voorkeur voor en na elke waterverversing of minimaal één keer per week. De pH moet bij semistatische (verversings)tests voor en na elke waterverversing worden gemeten en bij doorstroomtests minimaal één keer per week. De hardheid en alkaliteit moeten per test eenmaal worden gemeten. De temperatuur moet bij voorkeur in ten minste één testbak continu worden gecontroleerd.

1.8.6. **Waarnemingen**

Gewicht: aan het eind van de test moet van alle overlevende vissen het natte gewicht (drooggedept) worden gewogen, hetzij per testbak of afzonderlijk. Het gezamenlijk wegen van alle vissen in een testbak verdient de voorkeur boven het afzonderlijk wegen van de vissen waarbij elke vis eerst moet worden gemerkt. Wanneer elke vis apart wordt gewogen om de specifieke groeisnelheid van de afzonderlijke vissen te kunnen bepalen, mag de toegepaste merkmethode geen stress veroorzaken bij de vissen (alternatieven voor koudmerken kunnen wenselijk zijn, bijvoorbeeld het gebruik van een fijne, gekleurde vislijn).

De vissen moeten gedurende de test dagelijks worden onderzocht. Als er een externe afwijking (zoals bloedingen of ontkleuring) of afwijkend gedrag wordt geconstateerd, moet dit worden genoteerd. Ook de sterfte moet worden geregistreerd en de dode vissen moeten zo snel mogelijk worden verwijderd. Dode vissen worden niet vervangen. Als de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad worden aangehouden, wordt namelijk voorkomen dat veranderingen in het aantal vissen per bak de groei beïnvloeden. Het rantsoen moet echter wel worden aangepast.

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. BEWERKING VAN DE RESULTATEN

Het is wenselijk om bij de opzet en analyse van de test een statisticus te betrekken omdat de methode een aanzienlijke variatie in de opzet van het experiment toelaat, bijvoorbeeld in het aantal testkamers, het aantal testconcentraties, het aantal vissen, enz. Gezien de beschikbare opties in de opzet van de test, worden hier geen richtlijnen voor de statistische procedures gegeven.

▼B

Als het sterftecijfer in een testbak hoger is dan 10 %, mag voor deze bak geen groeisnelheid worden berekend. Wel moet worden gerapporteerd wat het sterftecijfer per testconcentratie is.

Het belangrijkste concept van deze test is het bepalen van de specifieke groeisnelheid r tussen tijdstip t_1 en tijdstip t_2, ongeacht de methode die wordt toegepast om de gegevens te analyseren. Deze snelheid kan op verschillende manieren worden gedefinieerd, afhankelijk van het feit of de vissen afzonderlijk gemarkeerd zijn dan wel of er een bakgemiddelde vereist is.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

waarbij

r_1 = specifieke groeisnelheid van een afzonderlijke vis

r_2 = gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak

r_3 = pseudo-specifieke groeisnelheid

W_1, W_2 = gewicht van een bepaalde vis op het tijdstip t_1 respectievelijk t_2

$\log_e W_1$ = logaritme van het gewicht van een afzonderlijke vis aan het begin van de onderzoeksperiode

$\log_e w_2$ = logaritme van het gewicht van een afzonderlijke vis aan het eind van de onderzoeksperiode

$\log_e W_1$ = gemiddelde van de logaritmen van de waarden W_1 voor de vissen in de bak aan het begin van de onderzoeksperiode

$\log_e W_2$ = gemiddelde van de logaritmen van de waarden w_2 voor de vissen in de bak aan het eind van de onderzoeksperiode

t_1, t_2 = tijd (dag) bij het begin en eind van de onderzoeksperiode

r_1, r_2, r_3 kunnen voor de periode van dag 0-28 worden berekend en, indien van toepassing (d.w.z. als op dag 14 metingen zijn uitgevoerd), voor de periode van dag 0-14 en dag 14-28.

2.1.1. **Analyse van de resultaten met de regressiemethode (concentratie-reactie-model)**

Met deze analysemethode wordt een nuttig rekenkundig verband gelegd tussen de specifieke groeisnelheid en de concentratie, waardoor het mogelijk is de „EC_X” te ramen, d.w.z. elke willekeurige EC-waarde. Deze analysemethode maakt de berekening van r voor afzonderlijke vissen (r_1) overbodig. In plaats daarvan kan de analyse worden gebaseerd op de gemiddelde waarde van r per bak (r_2). De voorkeur gaat uit naar de laatste methode, mede omdat deze geschikter is voor kleine vissoorten.

De gemiddelde specifieke groeisnelheden per bak (r_2) moeten grafisch worden uitgezet tegen de concentratie, zodat de concentratie-reactie-relatie tot uitdrukking komt.

▼B

Voor het uitdrukken van de relatie tussen r_2 en de concentratie moet een geschikt model worden gekozen. De keuze moet worden beargumenteerd.

Als elke bak een oneven aantal vissen bevat, moet de passingsprocedure, hetzij eenvoudig of niet-lineair, worden gewogen zodat rekening wordt gehouden met de oneven aantallen.

Met behulp van de passingsmethode voor het model moet een raming gemaakt kunnen worden van bijvoorbeeld de EC_{20} en van de bijbehorende dispersie (hetzij standaardafwijking of betrouwbaarheidsinterval). De grafiek van het gepaste model moet worden weergegeven in relatie tot de gegevens zodat de mate waarin het model past, zichtbaar wordt (8) (18) (19) (20).

2.1.2. **Analyse van de resultaten voor de raming van de LOEC**

Als bij de test gebruik is gemaakt van replicaatbakken voor alle concentratieniveaus, kan de LOEC worden geraamd aan de hand van een variantieanalyse (ANOVA) van de gemiddelde specifieke groeisnelheid per bak (zie punt 2.1), gevolgd door een geschikte methode (bijvoorbeeld de test van Dunnet of Williams (12) (13) (14) (21)) voor het vergelijken van de gemiddelde r voor elke concentratie met de gemiddelde r van de controlegroepen om de laagste concentratie vast te stellen waarbij dit verschil bij een waarschijnlijkheidsgrens van 0,05 significant is. Als niet wordt voldaan aan de vereiste voorwaarden voor parametermethoden — niet-normale verdeling (bijvoorbeeld de test van Shapiro-Wilk) of heterogene variantie (test van Barlett) — moet worden overwogen om de gegevens te transformeren om varianties te homogeniseren alvorens de ANOVA of een gewogen ANOVA uit te voeren.

Als bij de test niet voor elke concentratie een replicaatbak is gebruikt, zal een ANOVA gebaseerd op bakken ongevoelig of zelfs onmogelijk zijn. In dat geval kan er als tussenoplossing voor worden gekozen de ANOVA te baseren op de pseudo-specifieke groeisnelheid r_3 van afzonderlijke vissen.

De gemiddelde r_3 voor elke testconcentratie kan vervolgens worden vergeleken met de gemiddelde r_3 van de controlegroepen. Vervolgens kan de LOEC op dezelfde manier worden vastgesteld als hierboven is beschreven. Het is belangrijk dat wordt onderkend dat deze methode geen rekening houdt met, of bescherming biedt tegen, variabiliteit tussen de bakken, behalve die welke wordt veroorzaakt door de variabiliteit tussen de afzonderlijke vissen. Bij eerdere onderzoeken is echter gebleken (9) dat de variabiliteit tussen de bakken erg klein is vergeleken met de variabiliteit in de bakken (d.w.z. tussen de vissen onderling). Als de vissen niet afzonderlijk worden geanalyseerd, moet de methode voor het vaststellen van de uitbijter worden vermeld samen met de reden waarom deze methode wordt gebruikt.

2.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten toxische concentraties in de testoplossingen in de buurt liggen van de detectiegrens van de analysemethode, of, bij semistatische tests, als de concentratie van de teststof afneemt in de periode na het bereiden van de oplossing en vóór het verversen.

2.3. TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

▼B

2.3.1. **Teststof:**

— fysiek voorkomen en relevante fysisch-chemische kenmerken,

— chemische identificatiegegevens, voorzover relevant met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor het bepalen van de teststof.

2.3.2. **Diersoort:**

— wetenschappelijke naam, eventueel

— stam, grootte, leverancier, eventuele voorbehandelingen, enz.

2.3.3. **Testomstandigheden:**

— toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semistatisch/verversing, doorstroom, densiteit, bezettingsgraad, enz.),

— testopzet (bijvoorbeeld het aantal testbakken, testconcentraties en replicaten, en het aantal vissen per bak,

— wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moet de concentratie daarvan worden vermeld),

— de nominale testconcentraties, de gemiddelden van de in de testbakken gemeten waarden en de standaardafwijkingen, de methode waarmee zij zijn bepaald, en gegevens waaruit blijkt dat de resultaten van de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in de oplossing,

— kenmerken van het verdunningswater: pH, hardheid, alkaliteit, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof, zwevende deeltjes, zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen,

— waterkwaliteit in de testbakken: pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof,

— gedetailleerde gegevens over de voeding (bijvoorbeeld het type voedsel, de leverancier, het rantsoen en de frequentie).

2.3.4. **Resultaten:**

— gegevens waaruit blijkt dat de controlegroepen voldeden aan het validiteitscriterium voor overleving, en gegevens over de sterfte bij de verschillende testconcentraties,

— toegepaste technieken voor statistische analyse, statistieken gebaseerd op replicaten of vissen, verwerking van de gegevens en beweegredenen voor het gebruik van deze technieken,

— tabelgegevens over het afzonderlijke gewicht en het gemiddelde gewicht van de vissen op dag 0, 14 (indien gemeten) en 28, waarden met betrekking tot de gemiddelde of pseudo-specifieke groeisnelheid (afhankelijk van wat van toepassing is) per bak voor de periode van dag 0-28 of eventueel dag 0-14 en 14-28,

— resultaten van de statistische analyse (d.w.z. regressieanalyse of ANOVA), bij voorkeur in grafische en tabelvorm weergegeven en de LOEC ($p = 0,05$) en NOEC of EC_x met, indien mogelijk, de bijbehorende standaardafwijkingen,

▼B

— gevallen van abnormale reacties bij de vissen en zichtbare effecten die werden veroorzaakt door de test stof.

3. REFERENTIES

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J., (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855-1870.

(4) Nagel R. Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ, Safety, 21, pp, 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish, Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G. W,, Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R, D, (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias *latipes)*. Arch, Environ. Conta. Toxicol. 28, pp. 287-297.

(7) Benoit, D. A., Holcombe, G, W, and Spehar, R, L, (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka *[Oryzias latipes)*. Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. 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, pp. 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 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, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

▼B

(14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 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, *Oncorhynfhus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, pp. 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, pp. 1485-1494.

(19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.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, pp. 510-531.

▼B

Aanhangsel 1

AANBEVOLEN VISSOORTEN VOOR DE TEST EN GESCHIKTE TESTOMSTANDIGHEDEN

Vissoort	Aanbevolen bereik van de testtemperatuur (°C)	Fotoperiode (uren)	Aanbevolen bereik voor begingewicht van de vissen (g)	Aanbevolen meet-nauwkeurigheid	Densiteit (g/l)	Bezettingsgraad (per liter)	Voedsel	Testduur (dagen)
Aanbevolen vissoorten:								
Oncorhynchus mykiss Regenboogforel	12,5-16,0	12-16	1-5	tot op 100 mg	1,2-2,0	4	Droog merkvoer van zalmachtig broedsel	≥ 28
Andere goed gedocumenteerde vissoorten:								
Danio rerio Zebravis	21-25	12-16	0,050-0,100	tot op 1 mg	0,2-1,0	5-10	Levend voedsel *(Brachionus Artemia)*	≥ 28
Oryzias latipes Rijstvis (Medaka)	21-25	12-16	0,050-0,100	tot op 1 mg	0,2-1,0	5-20	Levend voedsel *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

Aanhangsel 2

ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER

Stof	Concentraties
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchloorgehalte	< 10 µg/1
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

▼B

Aanhangsel 3

Logaritmische reeks concentraties die geschikt zijn voor de toxiciteitstest (9)

Kolom (aantal concentraties tussen 100 en 10 of tussen 10 en 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

(*) Uit de kolom kan een reeks van vijf (of meer) opeenvolgende concentraties worden gekozen. De klassemiddenwaarden tussen de concentraties in kolom (x) worden verkregen uit kolom (2x + 1). De waarden in de tabel staan voor concentraties uitgedrukt in percentage per volume of in gewicht (mg/l of µg/1). De waarden kunnen waar nodig worden vermenigvuldigd met of gedeeld door elke tiende macht. Kolom 1 kan worden gebruikt als er veel onduidelijkheid bestaat over het toxiciteitsniveau.

▼B

C.15. VIS, KORTETERMIJN-TOXICITEITSTEST OP EMBRYONALE EN LARVESTADIA (SAC-FRY)

1. METHODE

Deze kortetermijn-toxiciteitstest is overgenomen van OESO TG 212 (1998).

1.1. INLEIDING

Deze kortetermijn-toxiciteitstest op de embryonale en larvestadia van de vis is een kortetermijntest waaraan de levensstadia vanaf het pasbevruchte ei tot en met de larvetijd worden blootgesteld. Tijdens de test wordt er geen voedsel toegediend. De test moet daarom worden beëindigd terwijl de larve zich nog voedt aan de dooierzak.

Het doel van de test is het bepalen van letale en, tot op zekere hoogte, subletale effecten van chemicaliën op de specifieke stadia van de geteste diersoort. De test kan nuttige informatie bieden omdat deze a) een brug kan vormen tussen letale en subletale tests, b) kan dienen als screeningtest voor een volledige test over de eerste levensfase of voor een chronische-toxiciteitstest en c) kan worden gebruikt voor het testen van vissoorten waarbij de normale technieken die worden gebruikt niet voldoende geavanceerd zijn voor het testen van de overgangsperiode van endogene tot exogene voeding.

Het is belangrijk om te weten dat alleen tests die alle stadia van de levenscyclus van een vis omvatten een betrouwbare schatting kunnen geven van de chronische toxiciteit van chemicaliën bij vissen. Tevens moet men zich realiseren dat een test die niet alle stadia omvat minder gevoelig is en dat daarmee ook de chronische toxiciteit kan worden onderschat. Daarom wordt verwacht dat de embryo- en larvetest minder gevoelig is dan een volledige test over de eerste levensfase, met name ten opzichte van zeer lipofiele chemicaliën (log P_{ow} > 4) en chemicaliën met een bepaalde toxische werking. Kleinere verschillen in de gevoeligheid tussen de twee tests zijn echter te verwachten bij chemicaliën met een niet-specifieke, narcotische werking (1).

Vóór de publicatie van deze test is de meeste ervaring met deze embryo- en larvetest opgedaan met de zoetwatervis *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — algemene naam: zebravis). Meer gedetailleerde informatie over het uitvoeren van tests met deze vissoort is te vinden in aanhangsel 1. Het gebruik van andere vissoorten waarmee ook ervaring is opgedaan, is echter ook toegestaan (tabel 1A en 1B).

1.2. DEFINITIES

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een significant effect ($p < 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter is dan de LOEC.

No Observed Effect Concentration (NOEC): de testconcentratie direct onder de LOEC.

▼B

1.3. PRINCIPE VAN DE TEST

De embryonale en larvestadia van de vis worden blootgesteld aan een reeks concentraties van de in water opgeloste teststof. Binnen het protocol kan men kiezen tussen een semi-statische procedure en een doorstroomprocedure. De keuze hangt af van het type teststof. De test begint met het plaatsen van de bevruchte eitjes in de testkamers en eindigt vlak voordat de dooierzak van welke larve dan ook in een van de testkamers volledig is verbruikt of voordat er sterfte optreedt door verhongering in de controlegroep. Vervolgens worden de letale of subletale effecten vastgesteld en vergeleken met de controlewaarden zodat de LOEC en NOEC kunnen worden vastgesteld. De effecten kunnen ook worden geanalyseerd met een regressiemodel, zodat kan worden ingeschat wat de concentratie is die een gegeven procentueel effect kan opleveren (d.w.z. LC/EC_X, waarbij x een bepaald % effect is).

1.4. GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

Resultaten van een acute toxiciteitstest (zie methode C.1), bij voorkeur met dezelfde vissoort als in deze test is gebruikt, moeten beschikbaar zijn. De resultaten kunnen van pas komen bij het selecteren van de juiste reeks testconcentraties in de test die betrekking heeft op de eerste levensfase. De oplosbaarheid in water (inclusief de oplosbaarheid in testwater) en de dampspanning van de teststof moeten bekend zijn. Er moet een betrouwbare, analytische methode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen.

De gegevens over de teststof die nuttig zijn bij het bepalen van de testomstandigheden zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit van de stof in licht, de stabiliteit onder de testcondities, pKa, P_{ow} en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie methode C.4).

1.5. GELDIGHEID VAN DE TEST

Een test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

— het totale percentage bevruchte eitjes in de controlegroep en eventueel in de bakken met alleen het oplosmiddel dat de test overleeft, moet groter of gelijk zijn aan de minimale percentages in aanhangsel 2 en 3,

— het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test tussen 60 % en 100 % van de verzadigingswaarde van lucht liggen,

— het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers en tussen de opeenvolgende dagen mag op geen enkel moment van de test groter zijn dan ± 1,5 °C. Tevens mag de watertemperatuur niet hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 2 en 3).

▼B

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Testkamers**

Voor de test mogen glazen bakken en bakken van ander chemisch inert materiaal worden gebruikt. De grootte van de bakken moet geschikt zijn voor de beoogde densiteit (zie punt 1.7.1.2). Het is aan te bevelen de testkamers willekeurig in het testgebied te plaatsen. Als er systematische effecten in het laboratorium optreden die kunnen worden beheerst door het gebruik van blokken, verdient een willekeurig blokontwerp waarbij in elk blok alle behandelingen plaatsvinden de voorkeur boven een compleet willekeurig ontwerp. Als er wordt gebruikgemaakt van blokken, moet hier bij de gegevensanalyse rekening mee worden gehouden. De testkamers moeten worden beschermd tegen ongewenste invloeden van buitenaf.

1.6.2. **Keuze van de vissoort**

In tabel 1A staan de aanbevolen vissoorten. Dit sluit het gebruik van andere vissoorten niet uit (voorbeelden in tabel 1B), maar de testprocedure moet wellicht worden aangepast teneinde passende testomstandigheden te creëren. Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast.

1.6.3. **Leefomstandigheden van de broedvis**

Meer informatie over de relatief beste leefomstandigheden voor de broedvissen vindt u in OESO TG 210 ([1]) en in de referenties (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4. **Omgaan met embryo's en larven**

Embryo's en larven kunnen binnen de hoofdbak worden onderverdeeld in kleinere bakken die zijn voorzien van gaaswanden waardoor de testoplossing vrij door de hoofdbak kan stromen. Een niet-turbulente stroming in deze kleine bakken kan worden verkregen door deze aan een arm te hangen die ze op en neer beweegt en tegelijkertijd de organismen onder water houdt. Ook kan worden gebruikgemaakt van een sifonspoelsysteem. Bevruchte eitjes van zalmachtigen kunnen op een rek of gaas worden gelegd met gaten die zo groot zijn dat de larven, nadat ze zijn uitgekomen, er doorheen kunnen vallen. In semi-statische tests waarbij de organismen dagelijks moeten worden overgeplaatst, kan bij het verwijderen van embryo's en larven het best gebruik worden gemaakt van pasteurpipetten (zie paragraaf 1.6.6).

Indien er eihouders, roosters of gaaswerken zijn gebruikt om de eitjes in de hoofdbak op hun plaats te houden, moeten deze worden verwijderd zodra de larven uitkomen ([1]). Stukken gaas die voorkomen dat vissen ontsnappen, mogen niet worden verwijderd. Als larven moeten worden overgeplaatst, mogen ze niet worden blootgesteld aan lucht en mogen er geen netten worden gebruikt om de vissen uit de eihouders te halen (deze waarschuwing is mogelijk niet van toepassing op sommige minder fragiele vissoorten, zoals de karper). Het moment van overplaatsing is afhankelijk van de vissoort. Soms is overplaatsing niet nodig. Voor de semistatische techniek mogen bekers of lage bakjes worden gebruikt. Indien nodig worden de bekers vlak boven de bodem voorzien van een stukje gaas. Als het volume van deze bakjes voldoet aan de densiteitvereisten (zie 1.7.1.2), is het overplaatsen van de embryo's of larven mogelijk niet nodig.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test.

▼B

1.6.5. **Water**

Water dat voldoet aan de chemische kenmerken van geschikt verdunningswater zoals vermeld in aanhangsel 4 en waarin de gekozen vissoort minstens zo goed kan overleven als in het water dat wordt beschreven in de aanhangsels 2 en 3, is geschikt als testwater. Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde mag niet meer dan ± 0,5 pH-eenheden schommelen. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de broedvissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl en SO_4), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organo-fosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar.

1.6.6. **Testoplossingen**

De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing.

De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (ontsluitingsmiddelen) verdient geen aanbeveling; niettemin kan dit in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van passende oplosmiddelen zijn ethanol, methanol, dimethyl-formamide en triethyleenglycol. Voorbeelden van passende dispergeermiddelen zijn Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40. Als gemakkelijk biologisch afbreekbare agentia (bijvoorbeeld aceton) en/of zeer vluchtige stoffen worden gebruikt, moet worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in de doorstroomtests kunnen voordoen. Indien wordt gebruikgemaakt van een ontsluitingsmiddel, mag dit geen grote invloed hebben op de overlevingskansen en geen zichtbaar negatief effect hebben op de vroege levensstadia, hetgeen blijkt uit de controle met uitsluitend oplosmiddel. Het gebruik van deze stoffen moet echter te allen tijde zoveel mogelijk worden vermeden.

Voor de semistatische techniek kunnen twee verschillende verversingsprocedures worden toegepast; i) er worden nieuwe testoplossingen bereid in schone bakken en levende eitjes en larven worden in een kleine hoeveelheid oude oplossing voorzichtig naar de nieuwe schone bakken overgeplaatst waarbij blootstelling aan lucht moet worden vermeden, of ii) de organismen blijven in de bakken terwijl een deel van het testwater (minimaal driekwart) wordt ververst. De verversingsfrequentie hangt af van de stabiliteit van de teststof, maar dagelijks verversen van water wordt aanbevolen. Als uit eerdere stabiliteitstests (zie punt 1.4) blijkt dat de concentratie van de teststof gedurende de verversingsperiode niet stabiel blijft (d.w.z. buiten 80-120 % van de nominale concentratie valt of onder 80 % van de gemeten oorspronkelijke concentratie), moet worden overwogen om over te gaan op een doorstroomtest. In elk geval moet erop worden toegezien dat de larven tijdens de verversingsprocedure geen stress ondervinden.

▼B

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Een stroomsnelheid die overeenkomt met ten minste vijf testkamervolumes per 24 uur is wenselijk (2).

1.7. PROCEDURE

Voor informatie over de resultaten van de toxiciteitstest met visembryo's en -larven kunt u de bestaande literatuur raadplegen. De literatuurlijst van deze tekst bevat enkele voorbeelden (7) (8) (9).

1.7.1. **Blootstellingsomstandigheden**

1.7.1.1. *Duur*

De test moet bij voorkeur worden gestart binnen 30 minuten na de bevruchting van de eitjes. De embryo's worden in de testoplossing geplaatst vóór, of zo snel mogelijk na, het begin van het blastodiscus-stadium en altijd vóór het begin van het gastrulastadium. Als de eitjes afkomstig zijn van een commerciële leverancier, is het niet altijd mogelijk de test direct na de bevruchting te starten. Omdat de gevoeligheid van de test sterk kan worden beïnvloed door het uitstellen van de start, moet de test binnen 8 uur na de bevruchting worden gestart. Omdat de larven gedurende de periode van blootstelling niet worden gevoederd, moet de test worden beëindigd voordat een van de larven, ongeacht in welke testkamer, de dooierzak volledig heeft verbruikt of voordat er sterfte door verhongering optreedt binnen de controlegroep. De duur hangt af van de vissoort die wordt gebruikt. In aanhangsel 2 en 3 wordt voor een aantal vissoorten de aanbevolen testduur biologisch vermeld.

1.7.1.2. *Densiteit*

Het aantal bevruchte eitjes aan het begin van de test moet toereikend zijn om te kunnen voldoen aan de statistische vereisten. De eitjes moeten willekeurig worden verdeeld over de verschillende behandelingen. Daarbij moeten minimaal 30 bevruchte eitjes, gelijk of zo gelijk mogelijk (bij bepaalde vissoorten is het namelijk moeilijk om een gelijk aantal per groep te verkrijgen) over ten minste drie replicaattestkamers verdeeld, per concentratie worden gebruikt. De densiteit (biomassa per volume testoplossing) moet zo laag zijn dat het gehalte aan opgeloste zuurstof van minimaal 60 % van de luchtverzadigingswaarde zonder beluchting in stand kan worden gehouden. Bij doorstroomtests wordt een densiteit van maximaal 0,5 g/l per 24 uur en maximaal 5 g/l oplossing op een willekeurig moment (2) aanbevolen.

1.7.1.3. *Licht en temperatuur*

De fotoperiode en testwatertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (aanhangsel 2 en 3). Gebruik voor het controleren van de temperatuur desgewenst een extra testbak.

▼B

1.7.2. **Testconcentraties**

Normaliter zijn er vijf concentraties van de teststof nodig die een constante factor van maximaal 3,2 van elkaar verschillen. Bij het selecteren van de reeks concentraties moet rekening worden gehouden met de curve van LC_{50} tegen blootstellingsperiode tijdens het acute toxiciteitsonderzoek. In bepaalde situaties mogen minder dan vijf concentraties worden gebruikt, bijvoorbeeld bij een limiettest, en kan het interval tussen de concentraties worden verkort. Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet hiervoor een geldige reden worden gegeven. Er mogen geen concentraties van de stof worden gebruikt die hoger zijn dan de LC_{50} over 96 uur of, indien dit lager is, 100 mg/l. Tevens mogen stoffen niet boven hun oplosbaarheidsgrens in het testwater worden getest.

Als een ontsluitingsmiddel wordt gebruikt bij het maken van testoplossingen (zie punt 1.6.6), mag de uiteindelijke concentratie hiervan in de testbakken niet groter zijn dan 0,1 ml/l en moet de concentratie in alle bakken gelijk zijn.

1.7.3. **Controles**

Naast de testreeks moet er een controlegroep worden behandeld met alleen het verdunningswater (eventueel met replicaat) en, indien van toepassing, een controlegreep met water waaraan het ontsluitingsmiddel is toegevoegd (eventueel met replicaat).

1.7.4. **Frequentie van de analytische bepalingen en metingen**

Tijdens de test worden de concentraties van de teststoffen regelmatig gemeten.

In semistatische tests waarbij wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale concentratie blijft (d.w.z. binnen het interval van 80-120 %; zie punt 1.4 en 1.6.6), is het raadzaam om in elk geval de hoogste en laagste testconcentraties te analyseren. Doe dit vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen, en ten minste drie keer, verspreid over de test (d.w.z. dat monsters van dezelfde oplossing moeten worden geanalyseerd — vlak na het bereiden van de oplossing en vlak vóór het verversen).

Bij tests waarbij niet wordt verwacht dat de concentratie van de teststof binnen ± 20 % van de nominale concentratie blijft (op basis van stabiliteitsgegevens van de stof), moeten alle testconcentraties worden geanalyseerd. Doe dit vlak na het bereiden en vlak vóór het verversen en volgens dezelfde procedure als hierboven (d.w.z. ten minste drie keer, verspreid over de test). Deze bepaling van de concentratie van de teststof vóór het verversen van de oplossing hoeft voor elke testconcentratie slechts bij de oplossing van één replicaatbak te gebeuren. Het interval tussen deze metingen mag niet meer dan zeven dagen bedragen. Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Als echter kan worden aangetoond dat de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test binnen ± 20 % van de nominale of de gemeten oorspronkelijke concentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op de nominale of gemeten oorspronkelijke waarden.

Bij doorstroomtests is een soortgelijke procedure als hierboven van toepassing (maar de meting van „oude” oplossingen is niet van toepassing). Als de testduur echter langer is dan zeven dagen, is het mogelijk verstandig het aantal monsternemingen tijdens de eerste week te verhogen (bijvoorbeeld drie meetreeksen), zodat men zeker weet dat de testconcentraties stabiel blijven.

▼B

Monsters moeten mogelijk worden gecentrifugeerd of gefilterd (bijvoorbeeld met een 0,45 μm poriëngrootte). Omdat echter kennelijk noch centrifugatie noch filtratie een volledige scheiding van de biologisch beschikbare en de biologisch niet-beschikbare fractie van de teststof garandeert, kunnen deze behandelingen wellicht niet altijd op de monsters worden toegepast.

In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de pH en de temperatuur in alle testbakken worden gemeten. De totale hardheid en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. Het zuurstofgehalte en (voorzover relevant) het zoutgehalte moeten tijdens de test ten minste drie keer worden gemeten (aan het begin, omstreeks het midden en aan het eind). Bij semi-statische tests is het raadzaam het opgeloste zuurstofgehalte vaker te meten, bij voorkeur voor en na elke waterverversing of minimaal één keer per week. De pH moet bij semistatische tests voor en na elke waterverversing worden gemeten en bij doorstroomtests minimaal één keer per week. De hardheid moet gedurende de test eenmaal worden gemeten. De temperatuur moet dagelijks worden gemeten en bij voorkeur in één testbak continu worden gecontroleerd.

1.7.5. **Waarnemingen**

1.7.5.1. *Stadium van embryonale ontwikkeling*

Het embryonale stadium (d.w.z. het gastrulastadium) bij het begin van de blootstelling aan de teststof moet zo nauwkeurig mogelijk worden vastgesteld. Hiervoor kan een representatief monster van eitjes worden gebruikt die afdoende zijn gefixeerd en geklaard. Voor een beschrijving en afbeeldingen van de embryonale stadia kan ook de literatuur worden geraadpleegd (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Uitkomen en overleven*

Minimaal één keer per dag moet uitkomen en overleven worden geobserveerd en de aantallen geregistreerd. Het is mogelijk wenselijk om aan het begin van de test vaker te kijken (bijvoorbeeld elke 30 minuten gedurende de eerste drie uur), omdat in sommige gevallen de overlevingstijden relevanter zijn dan het aantal dode diertjes (bijvoorbeeld als er sprake is van acute toxische effecten). Dode embryo's en larven moeten direct nadat ze worden opgemerkt, worden verwijderd, omdat ze snel kunnen ontbinden. Het verwijderen van dode organismen moet zeer voorzichtig gebeuren om aanstoten en beschadigen van naastgelegen eitjes/larven te voorkomen. Deze zijn namelijk uitermate fragiel en gevoelig. De criteria voor „dood” variëren per stadium:

— **eitjes:** met name in de eerste stadia duidelijk minder doorzichtig en een verandering van kleur als gevolg van coagulatie en/of precipitatie van proteïne, hetgeen resulteert in een wit ondoorschijnend uiterlijk;

— **embryo's:** geen embryonale beweging en/of geen hartslag en/of ontkleuring en afname van doorzichtigheid bij soorten die als embryo gewoonlijk doorzichtig zijn;

— **larven:** onbeweeglijkheid en/of geen ademhaling en/of geen hartslag en/of witte ondoorschijnende kleur van het centrale zenuwstelsel en/of geen reactie op een mechanische prikkel.

▼B

1.7.5.3. *Afwijkend uiterlijk*

Het aantal larven met een afwijkende lichaamsvorm en/of pigmentatie en de fase van het verbruik van de dooierzak moeten regelmatig, afhankelijk van de duur van de test en de aard van de afwijking, worden gerapporteerd. Embryo's en larven met een afwijking kunnen van nature voorkomen en bij sommige vissoorten kan het aantal oplopen tot enkele procenten van de controlegroep(en). Dieren met een afwijking mogen alleen uit de testbakken worden verwijderd als ze dood zijn.

1.7.5.4. *Afwijkend gedrag*

Afwijkingen, zoals hyperventilatie, ongecoördineerd zwemmen en atypische onbeweeglijkheid, moeten regelmatig, afhankelijk van de duur van de test, worden gerapporteerd. Hoewel het moeilijk is deze effecten te kwantificeren, kunnen ze (indien waargenomen) helpen bij de interpretatie van de sterftecijfers doordat ze informatie geven over de toxische werking van de teststof.

1.7.5.5. *Lengte*

Het is wenselijk om aan het eind van de test de lengte van elk organisme te meten. Hierbij kunnen de standaardlengte, de vorklengte en de totale lengte worden gemeten. Als er echter vinrot in de staart of vinerosie is opgetreden, moet de standaardlengte worden gemeten. Over het algemeen moet de variatiecoëfficiënt voor de lengte van replicaatorganismen in de controlegroepen van een goed uitgevoerde test $\leq$ 20 % zijn.

1.7.5.6. *Gewicht*

Aan het eind van de test kan van elk organisme het gewicht worden gemeten; het droge gewicht (24 uur bij 60 ^{o}C) heeft de voorkeur boven het natte gewicht (drooggedept). Over het algemeen moet de variatiecoëfficiënt voor het gewicht van replicaatorganismen in de controlegroepen van een goed uitgevoerde test $\leq$ 20 % zijn.

Deze waarnemingen resulteren in de volgende gegevens die alle voor een deel kunnen worden gebruikt voor een statistische analyse:

— cumulatieve sterfte,

— aantal gezonde larven aan het eind van de test,

— tijd van begin uitkomen eitjes tot eind uitkomen eitjes (d.w.z. 90 % van de eitjes in elke replicaatbak),

— aantal larven dat per dag uitkomt,

— lengte (en gewicht) van overlevende organismen aan eind van de test,

— aantal larven dat misvormd is of een afwijking vertoont.

— aantal larven dat afwijkend gedrag vertoont.

▼B

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. BEWERKING VAN DE RESULTATEN

Het is wenselijk om bij de opzet en analyse van de test een statisticus te betrekken omdat de methode een aanzienlijke variatie in de opzet van het experiment toelaat, bijvoorbeeld in het aantal testkamers, het aantal testconcentraties, het oorspronkelijk aantal bevruchte eitjes en de gemeten parameters. Gezien de beschikbare opties in de opzet van de test, worden hier geen richtlijnen voor de statistische procedures gegeven.

Als de LOEC/NOEC wordt bepaald, moet de variatie binnen elke set replicaatbakken worden geanalyseerd met behulp van ANOVA (variantie-analyse) of kruistabellen. Bij het maken van een meervoudige vergelijking tussen de resultaten van de afzonderlijke concentraties en de resultaten van de controlegroepen, komt de methode van Dunnett mogelijk goed van pas (12) (13). Er zijn ook andere bruikbare methoden beschikbaar (14) (15). De omvang van het effect dat met ANOVA of een andere methode kan worden wordt vastgesteld, (d.w.z. het onderscheidingsvermogen van de test) moet worden berekend en gerapporteerd. Overigens zijn niet alle waarnemingen die worden vermeld in punt 1.7.5.6 geschikt voor statistische analyse met ANOVA. De cumulatieve sterfte en het aantal gezonde larven aan het eind van de test kunnen bijvoorbeeld worden geanalyseerd met probitmethoden.

Als de LC/EC_x wordt bepaald, moet er een geschikte curve (of meerdere curven), zoals de logistische curve, worden bepaald voor de gegevens met behulp van een statistische methode, zoals de kleinste kwadratenmethode of de niet-lineaire kleinste kwadratenmethode. De curven moeten worden geparametriseerd zodat LC/EC_x en de standaardafwijking direct kunnen worden bepaald. Hierdoor wordt het berekenen van de betrouwbaarheidsgrenzen van de LC/EC_x een stuk eenvoudiger. Tenzij er goede redenen zijn om andere betrouwbaarheidsniveaus te hanteren, moet een betrouwbaarheid van 95 % aan beide zijden worden aangehouden. De passingsprocedure moet bij voorkeur een middel bieden waarmee de significantie van de mate waarin de curve niet past, kan worden berekend. Voor het maken van de curven kunnen grafische methoden worden gebruikt. Regressieanalyse is geschikt voor alle waarnemingen in punt 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten toxische concentraties in de testoplossingen in de buurt liggen van de detectie van de analysemethode. De resultaten voor concentraties die de oplosbaarheidsgrens van de teststof in water overschrijden, moeten ook voorzichtig worden geïnterpreteerd.

2.3. TESTRAPPORT

In het testrapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.3.1. **Teststof:**

— fysiek voorkomen en relevante fysisch-chemische kenmerken,

— chemische identificatiegegevens, voorzover relevant met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor het bepalen van de hoeveelheid van de teststof.

▼B

2.3.2. **Diersoort:**

— wetenschappelijke naam, stam, aantal moedervissen (d.w.z. het aantal vrouwtjes dat werd gebruikt voor het produceren van het benodigde aantal eitjes in de test), herkomst en de methode waarop de bevruchte eitjes werden verzameld en vervolgens werden behandeld.

2.3.3. **Testomstandigheden**

— toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semi-statische test of doorstroomtest, tijdsduur vanaf bevruchting tot start van de test, densiteit, enz.),

— fotoperiode(n),

— testopzet (bijvoorbeeld het aantal testkamers en replicaten, het aantal embryo's per replicaat),

— wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moeten de aard en de concentratie daarvan worden vermeld),

— de nominale testconcentraties, de in de testbakken gemeten waarden met gemiddelden en standaardafwijkingen en de methode waarmee zij zijn bepaald, en, indien de teststof bij een lagere concentratie dan in de testsituatie oplosbaar is in water, moet worden aangetoond dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de stof in de testoplossing,

— kenmerken van het verdunningswater; pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof (TOC), zwevende deeltjes, zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen,

— waterkwaliteit in de testbakken: pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof.

2.3.4. **Resultaten:**

— resultaten van eventuele voorbereidende onderzoeken naar de stabiliteit van de teststof,

— gegevens waaruit blijkt dat de totale overleving in de controlegroepen voldeed aan de aanvaardbaarheidsnorm voor het gebruikte proefdier (aanhangsel 2 en 3),

— gegevens over de sterfte/overleving tijdens de embryonale en larvestadia en de totale sterfte/overleving,

— aantal dagen waarbinnen de eitjes zijn uitgekomen en aantal uitgekomen eitjes,

— gegevens over lengte (en gewicht),

— gevallen en beschrijving van morfologische afwijkingen (indien aanwezig),

— gevallen en beschrijving van effecten op het gedrag (indien aanwezig),

— statistische analyse en verwerking van de gegevens,

— bij tests die zijn geanalyseerd met ANOVA, de LOEC bij $p = 0,05$ en de NOEC voor elke reactie die is vastgesteld, met inbegrip van een beschrijving van de statistische procedures die zijn gebruikt en een indicatie van de omvang van het waar te nemen effect,

▼B

— bij tests die zijn geanalyseerd met regressietechnieken, de LC/EC_X en betrouwbaarheidsintervallen, en een grafiek van het aangepaste model dat werd gebruikt voor de berekening,

— beweegredenen voor eventuele afwijkingen van deze testmethode.

3. **REFERENTIES**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C.J., 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, pp. 129-145.

(10) Kirchen R.V. and W.R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R.V. and W.R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes)*. EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G.M., Cooney J.D., 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, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, in: W.S. Hoar and D.J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academie press, pp. 1-58.

Tabel 1A

Aanbevolen vissoorten voor de test

Zoetwatervissen
Oncorhynchus mykiss Regenboogforel (9) (16)
Danio rerio Zebravis (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Karper (8) (19)
Oryzias latipes Japanse rijstvis/Medaka (20) (21)
Pimephales promelas „Fathead minnow” (8) (22)

▼B

Tabel 1B

Voorbeelden van andere goed gedocumenteerde vissoorten die al eens zijn gebruikt

Zoetwatervissen	Zoutwatervissen
Carassius auratus Goudvis (8)	*Menidia peninsulae* „Tidewater silverside” (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Zonnebaars (8)	*Clupea harengus* Haring (24) (25)
	Gadus morhua Kabeljauw (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Edelsteen tandkarper (23) (24) (25)

▼B

Aanhangsel 1

RICHTLIJNEN BIJ HET UITVOEREN VAN EEN TOXICITEITSTEST MET EMBRYO'S EN LARVEN (SAC-FRY) VAN DE ZEBRAVIS *(BRACHYDANIO RERIO)*

INLEIDING

De zebravis komt oorspronkelijk voor in de snelstromende rivieren in het gebied van de kust van Coromandel in India. De vis wordt vaak gebruikt in aquaria en behoort tot de karperachtigen. Voor informatie over het kweken en verzorgen van zebravissen kunnen de standaardnaslagwerken over tropische vissen worden geraadpleegd. De biologie van de vis en zijn gebruik in visserijonderzoek is bestudeerd door Laale (1).

De vis wordt zelden langer dan 45 mm. De romp is cilindrisch en heeft 7-9 donkerblauwe, horizontale, zilverachtige strepen. Deze strepen lopen tot aan de anale en staartvinnen. De rug is olijfgroen. De mannetjes zijn dunner dan de vrouwtjes. De vrouwtjes zijn zilveriger en hebben een opgezwollen buik, met name vlak voor het kuitschieten.

De volwassen vissen zijn bestand tegen grote schommelingen in de temperatuur, pH en hardheid. Om de vissen echter gezond te houden, zodat de eitjes die worden geproduceerd van goede kwaliteit zijn, moeten optimale omstandigheden worden gecreëerd.

Bij het kuitschieten wordt het vrouwtje door het mannetje achtervolgd en aangestoten. Zodra de eitjes worden uitgestoten, worden ze bevrucht. De eitjes, die doorzichtig en niet-klevend zijn, vallen op de bodem, waar ze soms door de ouders worden opgegeten. Het kuitschieten wordt beïnvloed door licht. Als er 's ochtends voldoende licht is, vindt het kuitschieten gewoonlijk in de eerste uren na zonsopgang plaats.

Een vrouwtje kan met tussenpozen van een week wel honderden eitjes per keer produceren.

LEEFOMSTANDIGHEDEN VAN DE OUDERVISSEN, REPRODUCTIE EN VROEGE LEVENSSTADIA

Selecteer een geschikt aantal gezonde vissen en plaats deze ten minste twee weken voor het geplande kuitschieten in het juiste water (zie aanhangsel 4). De vissen moeten zich minimaal eenmaal hebben voortgeplant voordat ze de eitjes produceren die voor de test worden gebruikt. De dichtheid van de vissen mag in deze periode niet groter zijn dan 1 gram vis per liter. Als het water regelmatig wordt ververst of er wordt gebruikgemaakt van zuiveringssystemen, is het mogelijk de dichtheid te verhogen. In de bakken moet een temperatuur van 25 ± 2 °C worden gehandhaafd. De vissen moeten gevarieerd voedsel krijgen, bijvoorbeeld geschikt commercieel verkrijgbaar droogvoer, pas uitgekomen artemia, chironomiden, daphnia en enchytreeën.

Hieronder worden twee procedures beschreven. In het verleden hebben deze geleid tot een groep gezonde bevruchte eitjes, die groot genoeg was om er een test mee uit te voeren.

i) Acht vrouwtjes en zestien mannetjes worden in een aquarium met 50 liter verdunningswater geplaatst. Ze worden afgeschermd van direct licht en minimaal 48 uur zo min mogelijk gestoord. Op de middag vóór de dag dat de test van start gaat, wordt onderin het aquarium een kuitbak geplaatst. Deze bestaat uit een frame (plexiglas of ander geschikt materiaal) van 5-7 cm hoog met een grof net van 2-5 mm bovenin en een fijn net van 10-30 µg onderin. Aan het grove net van het frame wordt een aantal „kuitbomen" bevestigd. Deze zijn gemaakt van uit nylon touw dat is losgedraaid. Nadat de vissen 12 uur in het donker hebben doorgebracht, wordt er een zwak licht aangedaan waarna het kuitschieten op gang komt. Twee tot vier uur na het kuitschieten, wordt de kuitbak verwijderd en worden de eitjes verzameld. De kuitbak zorgt ervoor dat de vissen de eitjes niet kunnen opeten en dat de eitjes gemakkelijk kunnen worden verzameld. De groep vissen moet zich al minimaal eenmaal hebben voortgeplant voordat de eitjes worden geproduceerd die voor de test worden gebruikt.

▼B

ii) Vijf tot tien vrouwtjes- en mannetjesvissen worden minimaal twee weken voor het geplande kuitschieten in aparte bakken ondergebracht. Na 5-10 dagen zijn de buikjes van de vrouwtjes opgezwollen en zijn hun genitale papillen zichtbaar. Bij mannetjesvissen ontbreken deze. Het kuitschieten vindt plaats in een speciaal aquarium dat onderin is voorzien van een gaaswerk (zie boven). Het aquarium wordt tot 5-10 cm boven dit gaaswerk gevuld met verdunningswater. Op de dag voordat het kuitschieten moet plaatsvinden, worden er één vrouwtje en twee mannetjes in geplaatst. De watertemperatuur wordt geleidelijk verhoogd totdat het water één graad warmer is dan de acclimatiseringstemperatuur. Het licht wordt gedoofd en het aquarium moet vervolgens zoveel mogelijk met rust worden gelaten. 's Ochtends wordt er een zwak licht aangedaan waarna het kuitschieten op gang komt. Na 2-4 uur worden de vissen verwijderd en de eitjes verzameld. Als er meer eitjes nodig zijn dan het aantal dat één vrouwtje kan produceren, kunnen er meerdere aquaria tegelijk worden gebruikt. Als vóór de test wordt vastgelegd wat de voortplantingsresultaten van de afzonderlijk vrouwtjes zijn (aantal eitjes en kwaliteit), kunnen de vrouwtjes die het hoogst scoren, worden gebruikt voor het kuitschieten.

De eitjes moeten in glazen zuigbuisjes (inwendige diameter minimaal 4 mm) met een flexibele ballon worden overgeplaatst naar de testbakken. De hoeveelheid water waarin de eitjes worden vervoerd moet zo klein mogelijk zijn. De eitjes zijn zwaarder dan water en zakken uit het buisje. Zorg ervoor dat de eitjes (en larven) niet in contact komen met lucht. Om er zeker van te zijn dat er zich in de eerste ontwikkelingsstadia geen onregelmatigheden voordoen, moet er een microscopisch onderzoek worden verricht op een monster (of meerdere monsters) van de eitjes. De eitjes mogen niet worden gedesinfecteerd.

Het sterftecijfer onder de eitjes is het hoogst binnen 24 uur na de bevruchting. In deze periode is een sterfte van 5-40 % niet uitzonderlijk. Eitjes sterven af door een mislukte bevruchting of door stoornissen in de ontwikkeling. De kwaliteit van de eitjes lijkt afhankelijk te zijn van de vrouwtjesvis die ze heeft geproduceerd. Sommige vrouwtjes produceren namelijk altijd eitjes van een goede kwaliteit en andere nooit. Ook het ontwikkelingstempo en de snelheid waarmee de eitjes uitkomen, verschillen per groep eitjes. De eitjes die met succes zijn bevrucht en de larven hebben hoge overlevingskansen, gewoonlijk 90 % of hoger. Bij 25 ^{o}C komen de eitjes 3-5 dagen na de bevruchting uit. De dooierzak is ongeveer 13 dagen na de bevruchting volledig verbruikt.

De ontwikkeling van het embryo is goed beschreven door Hisaoka en Battle (2). Doordat de eitjes en de uitgekomen larven doorzichtig zijn, kan de ontwikkeling van de vis worden gevolgd en kunnen misvormingen worden waargenomen. Ongeveer 4 uur na kuitschieten, kunnen de niet-bevruchte eitjes worden onderscheiden van de bevruchte eitjes (3). Om dit te kunnen zien, worden de eitjes en larven in een kleine testbak geplaatst en bestudeerd onder een microscoop.

De testomstandigheden voor de vroege levensstadia worden genoemd in aanhangsel 2. De optimale waarden voor de pH en de hardheid van het verdunningswater zijn respectievelijk 7,8 en 250 mg $CaCO_3$/l.

BEREKENINGEN EN STATISTIEKEN

Hiervoor wordt een tweefasige aanpak aanbevolen. Eerst worden de gegevens over sterfte, abnormale ontwikkeling en de duur van het uitkomen van de eitjes statistisch geanalyseerd. Vervolgens wordt in concentraties waarbij geen negatieve effecten op een van deze parameters werd geconstateerd, de lengte van de visjes statistisch bepaald. Deze aanpak wordt aanbevolen omdat de stof selectief kleinere visjes kan doden, de duur van het uitkomen kan vertragen en zware misvormingen kan veroorzaken, waardoor de lengtemetingen een vertekend beeld kunnen geven. Bovendien wordt er per behandeling ongeveer hetzelfde aantal vissen gemeten en kan zodoende de betrouwbaarheid van de teststatistieken worden gegarandeerd.

▼B

BEPALEN VAN LC_{50} EN EC_{50}

Het percentage overlevende eitjes en larven wordt berekend en gecorrigeerd voor de sterfte in de controlegroepen volgens de formule van Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

waarbij

P = gecorrigeerd % overleving

P' = % overleving waargenomen bij testconcentratie

C = % overleving in controlegroep

Indien mogelijk wordt aan het eind van de test met een passende methode de LC_{50} bepaald.

Als het wenselijk is ook de morfologische afwijkingen in de statistische EC_{50} op te nemen, kan hiervoor Stephan (5) worden geraadpleegd.

VASTSTELLEN VAN DE LOEC EN NOEC

Eén doel van een embryo- en larvetest is de testgroepen te vergelijken met de controlegroep, d.w.z. het bepalen van de LOEC. Hiertoe moeten verschillende vergelijkingsprocedures worden toegepast (6) (7) (8) (9) (10).

REFERENTIES

(1) Laale H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C.E. (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, pp. 69-81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

Aanhangsel 2

TESTOMSTANDIGHEDEN, DUUR EN OVERLEVINGSCRITERIA VOOR AANBEVOLEN VISSOORTEN

Vissoort	Temperatuur (°C)	Zoutgehalte (0/00)	Fotoperiode (in uren)	Duur van de stadia (in dagen)		Normale duur van test	Overleving binnen controlegroep (minimum %)	
				Embryo	Larve		Uitkomen eitjes	Na uitkomen eitjes
ZOETWATER								
Brachydanio rerio Zebravis	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-10 dagen)	80	90
Oncorhynchus mykiss Regenboogforel	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30-35	25-30	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 20 dagen na het uitkomen van de eitjes (50-55 dagen)	66	70
Cyprinus carpio Karper	21-25	—	12-16	5	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-9 dagen)	80	75
Oryzias latipes Japanse rijstvis/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (13-16 dagen)	80	80
Pimephales promelas Fathead minnow	25 + 2	—	16	4-5	5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (8-9 dagen)	60	70

(1) Voor embryo's.
(2) Voor larven.
(3) Duisternis voor embryo's en larven tot een week nadat de eitjes zijn uitgekomen, behalve wanneer ze worden geïnspecteerd. Daarna zwak licht tot het eind van de test.

▼B

Aanhangsel 3

Testomstandigheden, duur en overlevingscriteria voor andere goed gedocumenteerde vissoorten

Vissoort	Temperatuur (°C)	Zoutgehalte (0/00)	Fotoperiode (in uren)	Duur van de stadia (in dagen)		Normale duur van embryo en larvetest	Overleving binnen controlegroep (minimum %)	
				Embryo	Larve		Uitkomen eitjes	Na uitkomen eitjes
ZOETWATER								
Carassius auratus Goudvis	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (7 dagen)	—	80
Leopomis macrochirus Zonnebaars	21 ± 1	—	16	3	> 4	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4 dagen na het uitkomen van de eitjes (7 dagen)	—	75
ZOUTWATER								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22-25	15-22	12	1,5	10	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 5 dagen na het uitkomen van de eitjes (6-7 dagen)	80	60
Clupea harengus Haring	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 3 dagen na het uitkomen van de eitjes (23-27 dagen)	60	80
Gadus morhua Kabeljauw	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 3 dagen na het uitkomen van de eitjes (18 dagen)	60	80
Cyprinodon variegatus Edelsteentandkarper	25 ± 1	15-30	12	—	—	Zo snel mogelijk na de bevruchting (vroeg gastrula-stadium) tot 4/7 dagen na het uitkomen van de eitjes (28 dagen)	> 75	80

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 1354

▼B

Aanhangsel 4

ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER

Stof	Concentratie
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchloorgehalte	< 10 µg/l
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloor-bifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

▼B

C.16. **HONINGBIJEN — ACUTE-TOXICITEITSTEST (ORAAL)**

1. **METHODE**

De methode die voor deze acute-toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 213 (1998).

1.1. INLEIDING

Deze toxiciteitstest is een laboratoriummethode die bedoeld is voor de bepaling van de acute orale toxiciteit van gewasbeschermingsproducten en andere chemische stoffen voor volgroeide werkbijen.

Bij de vaststelling en evaluatie van de toxische eigenschappen van stoffen kan het nodig zijn de acute orale toxiciteit in honingbijen te bepalen, bv. wanneer het waarschijnlijk is dat bijen aan een bepaalde chemische stof worden blootgesteld. Het onderzoek naar de acute orale toxiciteit wordt uitgevoerd om de inherente toxiciteit van pesticiden en andere chemische stoffen voor bijen te bepalen. De resultaten van deze test moeten gebruikt worden om te bepalen of verdere evaluatie nodig is. Deze methode kan met name worden gebruikt bij stapsgewijze programma's om de gevaren van pesticiden voor bijen te evalueren, waarbij in de loop van het onderzoek wordt overgegaan van toxiciteitstests in laboratoria naar semiveld- en veldexperimenten (1). Pesticiden kunnen worden getest als actieve stof (a.s.) of als kant-en-klare producten.

Er moet een toxische standaard worden gebruikt om de gevoeligheid van bijen en de nauwkeurigheid van de testprocedure te verifiëren.

1.2. DEFINITIES

Acute orale toxiciteit: omvat de schadelijke effecten die binnen een maximale periode van 96 uur na de orale toediening van een enkelvoudige dosis van de teststof optreden.

Dosis: is de hoeveelheid toegediende teststof. De dosis wordt uitgedrukt in het gewicht (µg) van de teststof per proefdier (µg/bij). De werkelijke dosis voor elke bij kan niet worden berekend, omdat de bijen gezamenlijk worden gevoerd, maar een schatting van de gemiddelde dosis is wel mogelijk (totaal verbruikte teststof/aantal proefbijen in één korf).

LD_{50} (mediaan letale dosis) oraal: is een statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis oraal hebben ontvangen, de dood intreedt. De LD_{50}-waarde wordt uitgedrukt in µg teststof per bij. Bij pesticiden kan de teststof een actieve stof (a.s.) of een kant-en-klaar product zijn dat een of meer actieve stoffen bevat.

Sterfte: een dier wordt als dood geregistreerd als het volledig immobiel is.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Volgroeide werkbijen *(Apis mellifera)* worden blootgesteld aan een aantal doses van de teststof gedispergeerd in een sacharoseoplossing. Vervolgens wordt aan de bijen hetzelfde voer toegediend, zonder de teststof. Gedurende ten minste 48 uur wordt de sterfte dagelijks geregistreerd en vergeleken met de controlewaarden. Indien het sterftepercentage tussen 24 uur en 48 uur stijgt, terwijl de sterfte in de controlegroep op een aanvaardbaar niveau blijft, d.w.z. < 10 %, is het gepast de duur van de test tot maximaal 96 uur te verlengen. De resultaten worden geanalyseerd om de LD_{50} bij 24 uur en 48 uur te berekenen en, wanneer het onderzoek wordt verlengd, bij 72 uur en 96 uur.

▼B

1.4. VALIDITEIT VAN DE TEST

Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig:

— aan het einde van de test mag de gemiddelde sterfte voor het totale aantal bijen in de controlegroepen niet meer dan 10 % bedragen;

— de LD_{50} van de toxische standaard ligt binnen het gespecificeerde bereik.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Verzameling van de bijen**

Voor de test worden jonge, volgroeide werkbijen van hetzelfde ras gebruikt, d.w.z. bijen met dezelfde leeftijd, voedingsstatus enz. De bijen moeten afkomstig zijn van voldoende gevoede, gezonde, zoveel mogelijk ziektevrije en van een goede koningin voorziene volken met een bekende geschiedenis en fysiologische status. Ze kunnen op de ochtend van het gebruik of de avond vóór de test worden gevangen en tot de volgende dag onder dezelfde omstandigheden als tijdens de proef worden gehouden. Bijen uit korven zonder broedsel zijn geschikt. Het is af te raden bijen vroeg in de lente of laat in de herfst te vangen, omdat ze in die periode een andere fysiologie hebben. Wanneer proeven vroeg in de lente of laat in de herfst uitgevoerd moeten worden, kunnen de bijen in een incubator worden gehouden en gedurende één week met „bijenbrood” (stuifmeel dat uit de honingraat is verzameld) en een sacharoseoplossing worden grootgebracht. Bijen die met chemische stoffen zijn behandeld, bv. met antibiotica of antivarroaproducten, mogen gedurende vier weken na beëindiging van de laatste behandeling niet voor toxiciteitstests worden gebruikt.

1.5.2. **Huisvestings- en voedingsomstandigheden**

De gebruikte korven moeten gemakkelijk te reinigen en goed geventileerd zijn. Elk geschikt materiaal kan worden gebruikt, bv. roestvrij staal, gaas, kunststof of wegwerphout. Groepen van tien bijen per korf verdienen de voorkeur. De grootte van de korven moet geschikt zijn voor het aantal bijen, d.w.z. ze moeten voldoende ruimte bieden.

De bijen moeten in een laboratoriumruimte onder donkere omstandigheden en bij een temperatuur van 25 ± 2 °C worden gehouden. De relatieve vochtigheid, normaliter ca. 50-70 %, moet gedurende de test geregistreerd worden. Alle handelingen, waaronder behandeling en waarnemingen, kunnen bij (dag)licht worden verricht. Als voedsel wordt een sacharoseoplossing in water met een eindconcentratie van 500 g/l (50 % g/v) gebruikt. Na de toediening van de testdoses moet *ad libitum* voedsel worden verstrekt. Het voedselsysteem moet registratie van het voedselverbruik voor elke korf mogelijk maken (zie 1.6.3.1). Er kan een glazen buis (ca. 50 mm lang en 10 mm breed met aan het open uiteinde een versmalling van de diameter tot 2 mm) worden gebruikt.

1.5.3. **Voorbereiding van de bijen**

De verzamelde bijen worden willekeurig in de testkorven ingedeeld, die op hun beurt willekeurig in de laboratoriumruimte worden geplaatst.

▼B

De bijen mag maximaal 2 uur vóór aanvang van de proef voedsel worden onthouden. Het wordt aanbevolen de bijen vóór de behandeling voedsel te onthouden, zodat alle bijen qua darminhoud aan het begin van de proef aan elkaar gelijk zijn. Stervende bijen moeten voor aanvang van de proef worden vervangen door gezonde exemplaren.

1.5.4. **Voorbereiding van de doses**

Wanneer de teststof met water kan worden gemengd, kan deze direct in een 50 % sacharoseoplossing worden gedispergeerd. Bij technische producten en stoffen met een geringe oplosbaarheid in water kunnen media zoals organische oplosmiddelen, emulgators of dispergeermiddelen die een laag toxisch effect op bijen hebben (bv. aceton, dimethylformamide, dimethylsulfoxide), worden gebruikt. De concentratie van het medium is afhankelijk van de oplosbaarheid van de teststof en moet gelijk zijn voor alle onderzochte concentraties. Een mediumconcentratie van 1 % is algemeen geschikt en mag niet worden overschreden.

Er moeten geschikte controleoplossingen worden voorbereid, d.w.z. oplossingen waarbij een oplos- of dispergeermiddel wordt gebruikt om de teststof oplosbaar te maken. Er moeten twee aparte controlegroepen worden gebruikt: een oplossing in water en een sacharoseoplossing waarbij het oplosmiddel/de drager de bij de dosering van de oplossing gebruikte concentratie heeft.

1.6. PROCEDURE

1.6.1. **Test- en controlegroepen**

Het aantal geteste doses en replicaties moet voldoen aan de statistische vereisten voor de bepaling van de LD_{50} met de 95 % betrouwbaarheidsgrenzen. Normaliter zijn voor de test vijf doses nodig in een geometrische reeks, met een factor van ten hoogste 2,2, die alle waarden voor de LD_{50} omvatten. Toch moeten de verdunningsfactor en het aantal concentraties voor dosering worden bepaald ten opzichte van de helling van de toxiciteitscurve (dosis/sterfte-curve), waarbij rekening moet worden gehouden met de statistische methode die voor de analyse van de resultaten is gekozen. Aan de hand van een verkennende proef kunnen de juiste concentraties voor de dosering worden gekozen.

Een dosis van elke testconcentratie wordt toegediend aan minimaal drie gelijke testgroepen, elk bestaande uit tien bijen. Naast de testgroep moeten ten minste drie controlegroepen, elk bestaande uit tien bijen, worden gebruikt. Ook bij de gebruikte oplosmiddelen/dragers moet gebruik worden gemaakt van controlegroepen (zie 1.5.4).

1.6.2. **Toxische standaard**

Bij de testreeks moet een toxische standaard worden toegepast. Er moeten ten minste drie doses worden gekozen om de verwachte LD_{50}-waarde te dekken. Voor elke testdosis worden ten minste drie gelijke korven met elk tien bijen gebruikt. Als toxische standaard kan het best dimethoaat worden gebruikt, waarvan de geregistreerde orale LD_{50}-24 uur tussen 0,10 en 0,35 µg a.s./bij ligt (2). Andere toxische standaarden zijn echter ook aanvaardbaar, voorzover voldoende gegevens verstrekt kunnen worden om de verwachte dosisrespons te kunnen verifiëren (bv. parathion).

▼B

1.6.3. **Blootstelling**

1.6.3.1. *Toediening van de doses*

Aan elke testgroep bijen moet een dosis van 100-200 µl van een 50 % sacharoseoplossing in water worden toegediend met de juiste concentratie van de teststof. Bij producten met een geringe oplosbaarheid, lage toxiciteit of lage concentratie in de samenstelling moeten grotere hoeveelheden worden gebruikt, omdat in de sacharoseoplossing hogere verhoudingen gebruikt moeten worden. Er moet worden bijgehouden hoeveel behandeld voedsel elke groep verbruikt. Zodra het voedsel is verbruikt (meestal binnen 3-4 uur), moet de voedselhouder uit de korf worden verwijderd en vervangen worden door een houder met uitsluitend de sacharoseoplossing. De sacharoseoplossingen worden dan *ad libitum* verstrekt. Voor sommige mengsels, bij hogere concentraties, kan een weigering van de testdosis ertoe leiden dat weinig of geen voedsel wordt verbruikt. Na uiterlijk 6 uur moet het niet-verbruikte behandelde voedsel worden vervangen door uitsluitend de sacharoseoplossing. De verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel wordt bepaald (bv. meting van volume/gewicht van het resterende behandelde voedsel).

1.6.3.2. *Duur*

De proef duurt bij voorkeur 48 uur, te beginnen nadat de testoplossing is vervangen door uitsluitend de sacharoseoplossing. Indien de sterfte na de eerste 24 uur met meer dan 10 % blijft stijgen, moet de proef tot maximaal 96 uur worden verlengd, mits de sterfte in de controlegroep niet meer dan 10 % bedraagt.

1.6.4. **Waarnemingen**

De sterfte wordt 4 uur na aanvang van de test en vervolgens na 24 uur en 48 uur (d.w.z. na de toediening van de dosis) geregistreerd. Wanneer de observatieperiode moet worden verlengd, moeten om de 24 uur, tot een maximum van 96 uur, verdere bepalingen worden uitgevoerd, mits de sterfte in de controlegroep niet hoger is dan 10 %.

De verbruikte hoeveelheid voedsel per groep moet worden geschat. Een vergelijking van de verbruikte hoeveelheden behandeld en onbehandeld voedsel binnen de genoemde 6 uur kan informatie opleveren over de smakelijkheid van het behandelde voedsel.

Alle abnormale gedragseffecten die in de proefperiode worden waargenomen, moeten geregistreerd worden.

1.6.5. **limiettest**

In sommige gevallen (bv. wanneer verwacht wordt dat een bepaalde teststof een lage toxiciteit heeft) kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 µg a.s./bij, om aan te tonen dat de LD_{50} hoger is dan deze waarde. Dezelfde procedure moet worden toegepast, inclusief drie gelijke testgroepen, voor de testdosis, de relevante controlegroepen, de bepaling van de verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel en het gebruik van de toxische standaard. Indien sterfte optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen (zie 1.6.4), dienen deze te worden vermeld.

▼B

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. GEGEVENS

De gegevens moeten worden samengevat in tabellen die voor iedere behandelingsgroep alsmede voor de controlegroep en de groep met de toxische standaard laten zien: het aantal gebruikte bijen, de sterfte op elk observatietijdstip en het aantal bijen dat abnormaal gedrag vertoont. De sterftecijfers worden met geschikte statistische methoden geanalyseerd (bv. probitmethode, voortschrijdend gemiddelde, binomiale waarschijnlijkheid) (3) (4). Maak dosis/respons-curven op elk aanbevolen observatietijdstip en bereken de hellingen van de curven en de mediaan letale dosis (LD_{50}) met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen. Correcties voor de sterfte in de controlegroep zijn mogelijk met de correctie van Abbott (4) (5). Wanneer het behandelde voedsel niet volledig wordt verbruikt, moet per groep worden bepaald welke dosis van de teststof is verbruikt. De LD_{50} wordt uitgedrukt in µg teststof per bij.

2.2. VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.2.1. **Teststof:**

— fysieke aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen (bv. stabiliteit in water, dampspanning),

— chemische identificatiegegevens, waaronder structuurformule, zuiverheid (d.w.z. voor pesticiden de identiteit en concentratie van de actieve stof(fen)).

2.2.2. **Diersoort:**

— wetenschappelijke naam, stam, bij benadering de leeftijd (in weken), verzamelingsmethode, gegevens over de verzameling,

— informatie over de volken die gebruikt zijn voor de verzameling van de testbijen, inclusief gezondheid, ziekten bij volgroeide bijen, voorbehandeling enz.

2.2.3. **Proefomstandigheden:**

— temperatuur en relatieve vochtigheid van de laboratoriumruimte,

— huisvestingsomstandigheden, inclusief soort, grootte en materiaal van de korven,

— methoden voor de bereiding van de stam- en testoplossingen (wanneer gebruikt moet zowel het oplosmiddel als de concentratie daarvan worden vermeld),

— proefopzet, bv. aantal en gebruikte testconcentraties, aantal controlegroepen; voor elke testconcentratie en controlegroep het aantal gelijke korven en het aantal bijen per korf,

— datum van de proef.

▼B

2.2.4. **Resultaten:**

— wanneer uitgevoerd de resultaten van een verkennend onderzoek,

— ruwe gegevens: sterfte bij elke geteste dosis op elk observatietijdstip,

— grafiek van de dosis/respons-curven aan het einde van de test,

— LD_{50}-waarden met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen, op elk van de aanbevolen observatietijdstippen, voor de teststof en de toxische standaard,

— statistische methoden die gebruikt zijn voor de bepaling van de LD_{50},

— sterfte in de controlegroepen,

— andere waargenomen of gemeten biologische effecten, bv. abnormaal gedrag van de bijen (inclusief weigering van de testdosis), hoeveelheid verbruikt voedsel in behandelde en onbehandelde groepen,

— elke afwijking van de hier beschreven testmethoden alsook elke andere relevante informatie.

3. **REFERENTIES**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. **HONINGBIJEN — ACUTE-TOXICITEITSTEST (CONTACT)**

1. **METHODE**

De methode die voor deze acute-toxiciteitstest wordt gebruikt, is een kopie van de OECD TG 214 (1998).

1.1. INLEIDING

Deze toxiciteitstest is een laboratoriummethode die bedoeld is voor de bepaling van de acute contacttoxiciteit van gewasbeschermingsproducten en andere chemische stoffen voor volgroeide werkbijen.

Bij de vaststelling en evaluatie van de toxische eigenschappen van stoffen kan het nodig zijn de acute contacttoxiciteit in honingbijen te bepalen, bv. wanneer het waarschijnlijk is dat bijen aan een bepaalde chemische stof worden blootgesteld. Het onderzoek naar de acute contacttoxiciteit wordt uitgevoerd om de inherente toxiciteit van pesticiden en andere chemische stoffen voor bijen te bepalen. De resultaten van deze test moeten gebruikt worden om te bepalen of verdere evaluatie nodig is. Deze methode kan met name worden gebruikt bij stapsgewijze programma's om de gevaren van pesticiden voor bijen te evalueren, waarbij in de loop van het onderzoek wordt overgegaan van toxiciteitstests in laboratoria naar semiveld- en veldexperimenten (1). Pesticiden kunnen worden getest als actieve stof (a.s.) of als kant-en-klare producten.

Er moet een toxische standaard worden gebruikt om de gevoeligheid van bijen en de nauwkeurigheid van de testprocedure te verifiëren.

1.2. DEFINITIES

Acute contacttoxiciteit: omvat de schadelijke effecten die binnen een maximale periode van 96 uur na de lokale toediening van een enkelvoudige dosis van de teststof optreden.

Dosis: is de hoeveelheid toegediende teststof. De dosis wordt uitgedrukt in het gewicht (μg) van de teststof per proefdier (μg/bij).

LD_{50} (mediaan letale dosis) contact: is een statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis door contact hebben ontvangen, de dood intreedt. De LD_{50}-waarde wordt uitgedrukt in μg teststof per bij. Bij pesticiden kan de teststof een actieve stof (a.s.) of een kant-en-klaar product zijn dat een of meer actieve stoffen bevat.

Sterfte: een dier wordt als dood geregistreerd als het volledig immobiel is.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Volgroeide werkbijen *(Apis mellifera)* worden blootgesteld aan een aantal doses van de teststof opgelost in een geschikte drager, door rechtstreekse toediening aan de thorax (druppeltjes). De test duurt 48 uur. Indien het sterftepercentage tussen 24 uur en 48 uur stijgt, terwijl de sterfte in de controlegroep op een aanvaardbaar niveau blijft, d.w.z. < 10 %, is het gepast de duur van de test tot maximaal 96 uur te verlengen. De sterfte wordt dagelijks geregistreerd en met de controlewaarden vergeleken. De resultaten worden geanalyseerd om de LD_{50} bij 24 uur en 48 uur te berekenen en, wanneer de studie wordt verlengd, bij 72 uur en 96 uur.

▼B

1.4. VALIDITEIT VAN DE TEST

Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig:

— aan het einde van de test mag de gemiddelde sterfte voor het totale aantal bijen in de controlegroepen niet meer dan 10 % bedragen:

— de LD_{50} van de toxische standaard ligt binnen het gespecificeerde bereik.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. **Verzameling van de bijen**

Voor de test worden jonge, volgroeide werkbijen gebruikt, d.w.z. bijen met dezelfde leeftijd, voedingsstatus, stam enz. De bijen moeten afkomstig zijn van voldoende gevoede, gezonde, zoveel mogelijk ziektevrije en van een goede koningin voorziene volken met een bekende geschiedenis en fysiologische status. Ze kunnen op de ochtend van het gebruik of de avond voor de test worden gevangen en tot de volgende dag onder dezelfde omstandigheden als tijdens de proef worden gehouden. Bijen uit korven zonder broedsel zijn geschikt. Het is af te raden bijen vroeg in de lente of laat in de herfst te vangen, omdat ze in die periode een andere fysiologie hebben. Wanneer proeven vroeg in de lente of laat in de herfst uitgevoerd moeten worden, kunnen de bijen in een incubator worden gehouden en gedurende één week met „bijenbrood” (stuifmeel dat uit de honingraat is verzameld) en een sacharoseoplossing worden grootgebracht. Bijen die met chemische stoffen zijn behandeld, bv. met antibiotica of antivarroaproducten, mogen gedurende vier weken na beëindiging van de laatste behandeling niet voor toxiciteitstests worden gebruikt.

1.5.2. **Huisvestings- en voedingsomstandigheden**

De gebruikte korven moeten gemakkelijk te reinigen en goed geventileerd zijn. Elk geschikt materiaal kan worden gebruikt, bv. roestvrij staal, gaas, kunststof of wegwerphout. De grootte van de korven moet geschikt zijn voor het aantal bijen, d.w.z. ze moeten voldoende ruimte bieden. Groepen van tien bijen per korf verdienen de voorkeur.

De bijen moeten in een laboratoriumruimte onder donkere omstandigheden en bij een temperatuur van 25 ± 2 °C. worden gehouden. De relatieve vochtigheid, normaliter ca. 50-70 %, moet gedurende de test geregistreerd worden. Alle handelingen, waaronder behandeling en waarnemingen, kunnen bij (dag)licht worden verricht. Als voedsel wordt een sacharoseoplossing in water met een eindconcentratie van 500 g/l 50 % g/v) gebruikt, dat gedurende de testperiode met behulp van een voedselhouder *ad libitum* wordt verstrekt. Er kan een glazen buis (ca. 50 mm lang en 10 mm breed met aan het open uiteinde een versmalling van de diameter tot 2 mm) worden gebruikt.

1.5.3. **Voorbereiding van de bijen**

Voor de toediening van de teststof kunnen de verzamelde bijen met kooldioxide of stikstof worden verdoofd. De hoeveelheid gebruikt anesteticum en de blootstellingsduur moeten zo gering mogelijk zijn. Stervende bijen moeten voor aanvang van de proef worden vervangen door gezonde exemplaren.

1.5.4. **Voorbereiding van de doses**

De teststof moet als oplossing in een drager worden toegediend, d.w.z. een organisch oplosmiddel of een oplossing in water met een bevochtigingsmiddel. Als organisch oplosmiddel verdient aceton de voorkeur, maar er kunnen ook andere organische oplosmiddelen met een lage toxiciteit voor bijen worden gebruikt (bv. dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Voor kant-en-klare producten die in water gedispergeerd zijn en voor hoogpolaire organische stoffen die niet oplosbaar zijn in dragers van organische oplosmiddelen, kunnen oplossingen wellicht gemakkelijker worden toegediend wanneer ze worden voorbereid in een zwakke oplossing van een in de handel verkrijgbaar bevochtigingsmiddel (bv. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Er moeten geschikte controleoplossingen worden voorbereid, d.w.z. waarbij een oplos- of dispergeermiddel wordt gebruikt om de teststof oplosbaar te maken. Er worden twee aparte controlegroepen gebruikt, één behandeld met water en één behandeld met het oplos-/dispergeermiddel.

1.6. PROCEDURE

1.6.1. **Test- en controlegroepen**

Het aantal geteste doses en replicaties moet voldoen aan de statistische vereisten voor de bepaling van de LD_{50} met de 95- % betrouwbaarheidsgrenzen. Normaliter zijn voor de test vijf doses nodig in een geometrische reeks, met een factor van ten hoogste 2,2, die alle waarden voor de LD_{50} omvatten. Toch moet het aantal doses worden bepaald ten opzichte van de helling van de toxiciteitscurve (dosis/sterfte-curve), waarbij rekening moet worden gehouden met de statistische methode die voor de analyse van de resultaten is gekozen. Aan de hand van een verkennende proef kunnen de juiste doses worden gekozen.

Een dosis van elke testconcentratie wordt toegediend aan minimaal drie gelijke restgroepen, elk bestaande uit tien bijen.

Naast de testgroep moeten ten minste drie controlegroepen, elk bestaande uit tien bijen, worden gebruikt. Indien een organisch oplosmiddel of een bevochtigingsmiddel wordt gebruikt, moeten drie extra controlegroepen van elk tien bijen voor het oplos- of bevochtigingsmiddel worden opgenomen.

1.6.2. **Toxische standaard**

Bij de testreeks moet een toxische standaard worden toegepast. Er moeten ten minste drie doses worden gekozen om de verwachte LD_{50}-waarde te dekken. Voor elke testdosis worden ten minste drie gelijke korven met elk tien bijen gebruikt. Ais toxische standaard kan het best dimethoaat worden gebruikt, waarvan de geregistreerde orale LD_{50}-24 uur tussen 0,10 en 0,30 µg a.s./bij ligt (2). Andere toxische standaarden zijn echter ook aanvaardbaar, voorzover voldoende gegevens verstrekt kunnen worden om de verwachte dosisrespons te kunnen verifiëren (bv. parathior).

1.6.3. **Blootstelling**

1.6.3.1. *Toediening van de doses*

De verdoofde bijen worden individueel met de teststof behandeld (lokale toediening). De bijen worden willekeurig in de verschillende testdosis- en controlegroepen ingedeeld. Met een microapplicator wordt 1 µl van een oplossing met de teststof en de juiste concentratie in de dorsale zijde van de thorax van elke bij ingebracht. Ook andere volumes mogen gebruikt worden, maar moeten gerechtvaardigd worden. Na de toediening van de oplossing worden de bijen in de testkorven ingedeeld en voorzien van sacharoseoplossingen.

1.6.3.2. *Duur*

De proef duurt bij voorkeur 48 uur. Indien de sterfte in de periode van 24 uur tot 48 uur meer dan 10 % stijgt, moet de proef tot maximaal 96 uur worden verlengd, mits de sterfte in de controlegroep niet meer dan 10 % bedraagt.

▼B

1.6.4. **Waarnemingen**

De sterfte wordt 4 uur na de toediening van de dosis en vervolgens na 24 uur en 48 uur geregistreerd. Wanneer de observatieperiode moet worden verlengd, moeten om de 24 uur, tot een maximum van 96 uur, verdere bepalingen worden uitgevoerd, mits de sterfte in de controlegroep niet hoger is dan 10 %.

Alle abnormale gedragseffecten die in de proefperiode worden waargenomen, moeten geregistreerd worden.

1.6.5. **Limiettest**

In sommige gevallen (bv. wanneer verwacht wordt dat een bepaalde teststof een lage toxiciteit heeft) kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 µg a.s./bij, om aan te tonen dat de LD_{50} hoger is dan deze waarde. Dezelfde procedure moet worden toegepast, inclusief drie gelijke testgroepen, voor de testdosis, de relevante controlegroepen, de bepaling van de verbruikte hoeveelheid behandeld voedsel en het gebruik van de toxische standaard. Indien sterfte optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen (zie 1.6.4), dienen deze te worden vermeld.

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. GEGEVENS

De gegevens moeten worden samengevat in tabellen die voor iedere behandelingsgroep alsmede voor de controlegroep en de groep met de toxische standaard laten zien: het aantal gebruikte bijen, de sterfte op elk observatietijdstip en het aantal bijen dat abnormaal gedrag vertoont. De sterftecijfers worden met geschikte statistische methoden geanalyseerd (bv. probitmethode, voortschrijdend gemiddelde, binomiale waarschijnlijkheid) (3) (4). Maak dosis/respons-curven op elk aanbevolen observatietijdstip (d.w.z. 24 uur, 48 uur en, wanneer van toepassing, 72 uur en 96 uur) en bereken de hellingen van de curven en de mediaan letale dosis (LD_{50}) met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen. Correcties voor de sterfte in de controlegroep zijn mogelijk met de correctie van Abbott (4) (5). De LD_{50} wordt uitgedrukt in µg teststof per bij.

2.2. VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

2.2.1. **Teststof:**

— fysieke aard en fysisch-chemische eigenschappen (bv. stabiliteit in water, dampspanning),

— chemische identificatiegegevens, waaronder structuurformule, zuiverheid (d.w.z. voor pesticiden de identiteit en concentratie van de actieve stoffen)).

2.2.2. **Diersoort:**

— wetenschappelijke naam. stam, bij benadering de leeftijd dn weken), verzamelingsmethode, gegevens over de verzameling.

— informatie over tic volken die gebruikt zijn voor de verzameling van de testbijen, inclusief gezondheid, ziekten bij volgroeide bijen, voorbehandeling enz.

▼B

2.2.3. **Proefomstandigheden:**

— temperatuur en relatieve vochtigheid van de laboratoriumruimte,

— huisvestingsomstandigheden, inclusief soort, grootte en materiaal van de korven,

— methoden voor de toediening van de teststof, bv. gebruikte drager, gebruikt volume van de testoplossing en het gebruikte anesteticum,

— proefopzet, bv. aantal en gebruikte testdoses, aantal controlegroepen; voor elke testdosis en controlegroep het aantal gelijke korven en het aantal bijen per korf,

— datum van de proef.

2.2.4. **Resultaten:**

— wanneer uitgevoerd de resultaten van een verkennend onderzoek,

— ruwe gegevens: sterfte bij elke geteste concentratie op elk observatietijdstip,

— grafiek van de dosis/respons-curven aan het einde van de test,

— LD_{50}-waarden, met de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen, op elk van de aanbevolen observatietijdstippen, voor de teststof en de toxische standaard,

— statistische methoden die gebruikt zijn voor de bepaling van de LD_{50},

— sterfte in de controlegroepen.

— andere waargenomen of gemeten biologische effecten en elke abnormale respons van de bijen,

— elke afwijking van de hier beschreven testmethoden alsook elke andere relevante informatie.

3. **REFERENTIES**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., Mclndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. BEPALING VAN DE ADSORPTIE/DESORPTIE MET BEHULP VAN EEN BATCH-EVENWICHTSMETHODE

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 106 van de OESO: bepaling van de adsorptie/desorptie met behulp van een batch-evenwichtsmethode (2000).

1.1. INLEIDING

In de methode is rekening gehouden met een rondzendproef en een workshop voor bodemselectie voor de ontwikkeling van een adsorptietest (1) (2) (3) (4) en met bestaande richtsnoeren op nationaal niveau (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptie/desorptieonderzoek is nuttig om essentiële informatie te verkrijgen over de mobiliteit van chemische stoffen en hun verdeling in de compartimenten bodem, water en lucht van de biosfeer (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). De informatie kan worden gebruikt bij de prognose of raming van bijvoorbeeld de beschikbaarheid van een stof voor afbraak (22) (23), omzetting en opname door organismen (24); uitloging door het bodemprofiel (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); vluchtigheid vanuit de bodem (21) (29) (30); afspoeling van het landoppervlak naar natuurlijke wateren (18) (31) (32). Adsorptiegegevens kunnen worden gebruikt voor vergelijkende en modelberekeningen (19) (33) (34) (35).

De verdeling van een chemische stof tussen bodem- en waterfase is een complex proces dat wordt bepaald door verschillende factoren: de chemische aard van de stof (12) (36) (37) (38) (39) (40), de kenmerken van de bodem (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) en klimaatfactoren zoals regenval, temperatuur, zonlicht en wind. De talloze verschijnselen en mechanismen die een rol spelen bij de adsorptie van een stof door de bodem kunnen dan ook niet volledig worden opgenomen in een eenvoudig laboratoriummodel zoals de hier beschreven methode. Ook al is deze methode een benadering waarin niet alle mogelijkheden in het milieu worden bestreken, toch levert zij voldoende informatie op over de relevantie van de adsorptie van een stof vanuit milieuoogpunt.

Zie ook de algemene inleiding.

1.2. TOEPASSINGSGEBIED

Met deze methode wordt getracht een raming van het adsorptie/desorptiegedrag van een stof ten opzichte van de bodem te bepalen. Het is de bedoeling een sorptiewaarde te verkrijgen die kan worden gebruikt om een prognose te doen omtrent de verdeling onder een scala van milieuomstandigheden; daartoe wordt de adsorp-tiecoëfficiënt bij evenwicht voor een chemische stof bij verschillende bodemtypes bepaald als functie van de bodemkenmerken (gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur, pH enz.). Er moeten verschillende bodemtypes worden gebruikt om de interactie van een bepaalde stof met in de natuur voorkomende bodemtypes zo breed mogelijk te kunnen bestrijken.

Bij deze methode wordt onder adsorptie het bindingsproces van chemische stoffen aan het bodemoppervlak verstaan; er wordt geen onderscheid gemaakt tussen verschillende adsorptieprocessen (fysische en chemische adsorptie) en bijvoorbeeld oppervlak-gekatalyseerde afbraak, bulkadsorptie of chemische reacties. Er wordt geen rekening gehouden met de adsorptie aan colloïddeeltjes (diameter < 0,2 μm) die uit het bodemmonster ontstaan.

▼B

Als belangrijkste bodemparameters voor de adsorptie worden beschouwd: het gehalte aan organische koolstof (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); het gehalte aan klei en de bodemtextuur (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) en de pH voor ioniseerbare verbindingen (3) (4) (42). Ook de effectieve capaciteit voor kationuitwisseling, het gehalte aan amorf ijzer en aluminiumoxides, met name voor vulkanische en tropische bodemtypes (4) en het specifieke oppervlak (49) kunnen een rol spelen.

De test is bedoeld om de adsorptie van een chemische stof aan verschillende bodemtypes met een uiteenlopend gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur en pH te bepalen en bestaat uit drie fasen:

Fase 1: Voorbereidend onderzoek voor de bepaling van:

— de verhouding bodemmonster/oplossing:

— de voor de instelling van het adsorptie-evenwicht benodigde tijd en de hoeveelheid geadsorbeerde stof bij evenwicht:

— de adsorptie van de teststof aan het oppervlak van de gebruikte buizen of potten en de stabiliteit van de teststof gedurende de uitvoering van de test.

Fase 2: Screening: de adsorptie wordt bij vijf verschillende bodemtypes onderzocht aan de hand van de adsorptiekinetiek bij één concentratie en de bepaling van de verdelingscoëfficiënt K_d en K_{oc}.

Fase 3: Bepaling van de adsorptie-isothermen volgens Freundlich om na te gaan wat de invloed van de concentratie op de mate van adsorptie aan de bodem is.

Onderzoek van de desorptie aan de hand van de desorptiekinetiek/desorptie-isothermen volgens Freundlich (zie aanhangsel).

1.3. DEFINITIES EN EENHEDEN

Symbool	Definitie	Eenheid
A_{t_i}	adsorptiepercentage op het tijdstip t_i	%
A_{eq}	adsorptiepercentage bij het adsorptie-evenwicht	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof op het tijdstip t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof gedurende het tijdsinterval Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	aan het bodemmonster geadsorbeerde massa teststof bij het adsorptie-evenwicht	µg
m_0	massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de adsorptietest	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa van de teststof, gemeten in een monster (v_a^A) op het tijdstip t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa van de teststof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht	µg
m_{soil}	hoeveelheid van het bodemmonster, uitgedrukt in droge massa	g

▼B

Symbool	Definitie	Eenheid
C_{st}	massaconcentratie van de stockoplossing van de stof	µg cm^{-3}
C_o	massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip t = 0	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	massaconcentratie van de stof in de waterfase op het tijdstip t_i waarop de analyse wordt uitgevoerd	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	gehalte aan de aan het bodemmonster geadsorbeerde stof bij het adsorptie-evenwicht	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	massaconcentratie van de stof in de waterfase bij het adsorptie-even-wicht	µg cm^{-3}
V_o	volume van de waterfase die tijdens de adsorptietest in contact met het bodemmonster is, op het tijdstip t = 0	cm^3
v_a^A	volume van het monster waarin de teststof wordt bepaald	cm^3
K_d	verdelingscoefficiënt voor adsorptie	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	genormaliseerde adsorptiecoëfiiciënt voor organische koolstof	cm^3g^{-1}
K_{om}	genormaliseerde verdelingscoëfficiënt voor organisch materiaal	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlich-exponent	
D_{t_i}	desorptiepercentage op het tijdstip t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptiepercentage gedurende het tijdsinterval Δt_i	%
K_{des}	schijnbare desorptiecoëfficiënt	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa van de uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof op het tijdstip t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massa van de uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof gedurende het tijdsinterval Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	! analytisch bepaalde massa van de stof in de waterfase bij het desorptie-evenwicht	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	totale massa van de gedesorbeerde teststof bij het desorptie-evenwicht	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa van de stof die na het tijdsinterval Δt_i aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft	µg
m_{aq}^A	massa van de stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht	µg
$C_s^{des}(eq)$	gehalte aan de stof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft	µg g^{-1}

▼B

Symbool	Definitie	Eenheid
$C_{aq}^{des}(eq)$	massaconcentratie van de teststof in de waterfase bij het desorptie-evenwicht	µg cm^{-3}
v_T	totaalvolume van de waterfase die tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment in contact met het bodemmonster is	cm^3
V_r	volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume $CaCl_2$-oplossing (0,01 M)	cm^3
v_a^D	volume van het monster dat op het tijdstip t_i tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment voor analysedoeleinden wordt genomen	cm^3
V_r^i	volume van de oplossing die bij het desorptiekinetiek-experiment (parallelle methode) voor de bepaling van de teststof uit buis (i) is genomen	cm^3
V_r^F	volume van de oplossing die voor de bepaling van de teststof bij het desorptie-evenwicht uit de buis is genomen	cm^3
MB	massabalans	%
m_E	totale massa van de teststof die in twee stappen uit het bodemmonster en de wanden van de proefbuis is geëxtraheerd	µg
V_{rec}	volume van het supernatans dat na het adsorptie-evenwicht wordt verwijderd	cm^3
P_{ow}	verdelingscoëfficiënt octanol/water	
pKa	dissociatieconstante	
S_w	oplosbaarheid in water	g l^{-1}

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Bekende volumes van oplossingen van de teststof, al dan niet radioactief gelabeld, met een bekende concentratie in 0,01 M $CaCl_2$ worden toegevoegd aan bodemmonsters met een bekend drooggewicht die vooraf zijn geëquilibreerd in 0,01 M $CaCl_2$. Het mengsel wordt gedurende een geschikte tijd geschud. De bodemsuspensie wordt vervolgens door centrifugeren en desgewenst filtreren gescheiden en de waterfase wordt geanalyseerd. De hoeveelheid aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof wordt berekend als het verschil tussen de hoeveelheid aanvankelijk in de oplossing aanwezige teststof en de hoeveelheid die aan het eind van het experiment is overgebleven (indirecte methode).

Het is ook mogelijk de hoeveelheid geadsorbeerde teststof rechtstreeks door bodemanalyse te bepalen (directe methode). Deze procedure, waarbij de bodemfractie stapsgewijs wordt geëxtraheerd met een geschikt oplosmiddel, wordt aanbevolen voor gevallen waarin het verschil in de concentratie van de stof in de oplossing niet nauwkeurig kan worden bepaald. Voorbeelden van dergelijke gevallen zijn: adsorptie van de teststof aan de wanden van het proefvat, instabiliteit van de teststof binnen de tijdschaal van het experiment, een geringe adsorptie die slechts kleine concentratieveranderingen in de oplossing veroorzaakt en een sterke adsorptie die leidt tot een zo lage concentratie dat deze niet nauwkeurig kan worden bepaald. Als een radioactief gelabelde stof wordt gebruikt, kan in plaats van bodemextractie worden gekozen voor bodemanalyse door verbranding en vloeistofscintillatietelling. Vloeistofscintillatietelling is echter een aspecifieke techniek waarbij geen onderscheid kan worden gemaakt tussen de oorspronkelijke stof en omzettingsproducten; deze techniek mag dan ook alleen worden gebruikt als de teststof gedurende het hele onderzoek stabiel is.

▼B

1.5. INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

De gebruikte reagentia moeten chemisch zuiver (p.a.) zijn. Aanbevolen wordt ongelabelde teststoffen met een bekende samenstelling en bij voorkeur een zuiverheid van minimaal 95 % of radioactief gelabelde teststoffen met een bekende samenstelling en radioactieve zuiverheid te gebruiken. Wanneer tracers met een korte halveringstijd worden gebruikt, moet een vervalcorrectie worden uitgevoerd.

Voordat een adsorptie/desorptietest wordt uitgevoerd, moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn:

a) de oplosbaarheid in water (A.6.):

b) de dampspanning (A.4.) en/of de constante van de wet van Henry;

c) de niet-biologische afbraak: hydrolyse in afhankelijkheid van de pH (C.7.);

d) de verdelingscoëfficiënt (A.8.);

e) de „gemakkelijke” biologische afbreekbaarheid (C.4) of de aerobe en anaerobe omzetting in de bodem;

f) de pKa van ioniseerbare stoffen;

g) de directe fotolyse in water (d.w.z. het UV/Vis-absorptiespectrum in water, kwantumopbrengst) en de fotodegradatie op de bodem.

1.6. TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De test kan worden gebruikt voor chemische stoffen waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid beschikbaar is. Een belangrijke parameter die de betrouwbaarheid van de resultaten kan beïnvloeden, met name wanneer de indirecte methode wordt gebruikt, is de stabiliteit van de teststof binnen de tijdschaal van de test. Een eerste vereiste is dan ook dat de stabiliteit tijdens een voorbereidend onderzoek wordt gecontroleerd; als er binnen de tijdschaal van de test een omzetting wordt waargenomen, wordt aanbevolen bij het hoofdonderzoek zowel de bodem- als de waterfase te analyseren.

Bij de uitvoering van deze test kunnen er problemen ontstaan met stoffen die slecht oplosbaar zijn in water ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) en met stoffen met een hoge lading, aangezien de concentratie in de waterfase in dat geval niet met een voldoende nauwkeurigheid analytisch kan worden bepaald. In deze gevallen moeten er aanvullende maatregelen worden genomen. In de desbetreffende hoofdstukken van deze beschrijving wordt aangegeven hoe deze problemen kunnen worden aangepakt.

Bij het testen van vluchtige stoffen moet ervoor worden gezorgd dat verliezen tijdens de behandeling worden voorkomen.

1.7. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.7.1. **Apparatuur en reagentia**

Standaardlaboratoriumapparatuur, met name:

a) buizen of potten voor de uitvoering var. de experimenten. Het is belangrijk dat deze buizen of potten

— direct in de centrifuge passen om fouten bij de behandeling en de overbrenging tot een minimum te beperken;

— van een inert materiaal zijn vervaardigd, zodat de adsorptie van de teststof aan het oppervlak tot een minimum wordt beperkt;

▼B

b) schudapparaat: overhead-schudder of gelijkwaardige apparatuur: het schudapparaat moet het bodemmonster tijdens het schudden in suspensie houden;

c) centrifuge: bij voorkeur met hoge snelheid, bijvoorbeeld > 3 000 g, instelbare temperatuur, in staat om deeltjes met een diameter van meer dan 0,2 μm uit een waterige oplossing neer te slaan. De houders moeten tijdens het schudden en centrifugeren worden afgesloten om damp- en waterverlies te voorkomen; om adsorptie aan de dop tot een minimum te beperken moeten gedeactiveerde doppen worden gebruikt, zoals schroefdoppen met teflonbekleding;

d) facultatief: filtreerapparatuur; steriele wegwerpfilters met een porositeit van 0,2 μm. Bij de keuze van het filtermateriaal moet goed worden opgelet, zodat verliezen van de teststof aan dit materiaal worden voorkomen; voor slecht oplosbare teststoffen wordt organisch filtermateriaal afgeraden;

e) analyse-instrumentarium dat geschikt is om de concentratie van de teststof te meten;

f) laboratoriumoven die kan worden ingesteld op een temperatuur van 103 °C tot 110 °C.

1.7.2. **Karakterisering en selectie van de bodem**

De bodem moet worden gekarakteriseerd aan de hand van drie parameters die worden geacht grotendeels bepalend voor de adsorptiecapaciteit te zijn: gehalte aan organische koolstof, kleigehalte en bodemtextuur en pH. Zoals reeds is vermeld (zie „Toepassingsgebied"), kunnen ook andere fysisch-chemische eigenschappen van de bodem invloed hebben op de adsorptie/desorptie van een bepaalde stof en daarmee moet in die gevallen rekening worden gehouden.

De voor de karakterisering van de bodem gebruikte methoden zijn heel belangrijk en kunnen een significante invloed op de resultaten hebben. Daarom wordt aanbevolen de pH van de bodem in een 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (de oplossing die bij de adsorptie/desorptietest wordt gebruikt) volgens de desbetreffende ISO-methode (ISO 10390-1) te bepalen. Tevens wordt aanbevolen de andere relevante bodemeigenschappen volgens de standaardmethoden (ISO-handboek voor bodemanalyse) te bepalen; in dat geval kunnen de sorptiegegevens op basis van algeheel gestandaardiseerde bodemparameters worden geanalyseerd. In de referenties (50-52) worden enige richtsnoeren gegeven voor bestaande standaardmethoden voor bodemanalyse en -karakterisering. Voor de kalibratie van bodemtestmethoden wordt het gebruik van referentiebodem aanbevolen.

Tabel 1 bevat richtsnoeren voor de selectie van bodemtypes voor adsorptie/desorptie-experimenten. De zeven vermelde bodemtypes bestrijken het scala dat in gematigde geografische zones voorkomt. Voor ioniseerbare teststoffen moeten de geselecteerde bodemtypes een breed pH-bereik beslaan om de adsorptie van de stof in geïoniseerde en niet-geïoniseerde vorm te kunnen bepalen. Onder punt 1.9 „Uitvoering van de test", worden richtsnoeren gegeven voor het aantal verschillende bodemtypes dat in de verschillende fasen van de test moet worden gebruikt.

Als de voorkeur wordt gegeven aan andere bodemtypes, moeten deze aan de hand van dezelfde parameters worden gekarakteriseerd en moet de spreiding van de eigenschappen vergelijkbaar zijn met die van tabel 1, ook al voldoen ze niet exact aan de criteria.

▼B

Tabel 1

Richtsnoeren voor de selectie van bodemmonsters voor adsorptie/desorptie

Bodemtype	pH-bereik (in 0,01 M $CaCl_2$)	Organisch koolstofgehalte (%)	Kleigehalte (%)	Bodemtextuur (1)
1	4,5-5,5	1,0-2,0	65-80	klei
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	kleileem
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	siltleem
4	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	leem
5	< 4,0-6,0 (2)	< 0,5-1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	lemig zand
6	> 7,0	< 0,5-1,0 (2) (3)	40-65	kleileem/klei
—	< 4,5	> 10	< 10	zand/lemig zand

(1) Volgens het systeem van de FAO en de VS (85).
(2) De waarde van deze variabelen moet bij voorkeur binnen het vermeide bereik vallen. Als het echter moeilijk is geschikt bodemmateriaal te vinden, is ook een waarde beneden het vermelde minimum aanvaardbaar.
(3) Bodem met minder dan 0,3 % organische koolstof kan de correlatie tussen het gehalte aan organisch materiaal en de adsorptie verstoren. Het verdient dan ook aanbeveling bodem met minimaal 0,3 % organische koolstof te gebruiken.

1.7.3. **Monsterneming en opslag van bodemmonsters**

1.7.3.1. *Monsterneming*

Er worden geen specifieke technieken of gereedschappen voor monsterneming aanbevolen; de monsternemingstechniek is afhankelijk van het doel van het onderzoek (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Er moet rekening worden gehouden met de volgende overwegingen:

a) er moet gedetailleerde achtergrondinformatie over de veldlocatie zijn; daarbij gaat het bijvoorbeeld om de ligging, de vegetatie, behandelingen met pesticiden en/of kunstmest, biologische toevoegingen of onopzettelijke verontreiniging. De aanbevelingen van de ISO-norm voor bodembemonstering (ISO 10381-6) moeten bij de beschrijving van de bemonsteringslocatie in acht worden genomen;

b) de bemonsteringslocatie moet worden gespecificeerd met UTM (Universele Transversale Mercatorprojectie/European Horizontal Datum) of geografische coördinaten; daardoor kan een bepaalde bodem in de toekomst opnieuw worden bemonsterd of kan een betere specificatie van de bodem worden gegeven binnen de uiteenlopende classificatiesystemen die in de verschillende landen worden gebruikt. Tevens mogen monsters alleen in een A-horizont tot maximaal 20 cm diep worden genomen. Met name bij bodemtype nr. 7 moet een O_h-horizont, als deze in de bodem aanwezig is, in het monster worden opgenomen.

De houders waarin en de temperatuur waarbij de bodemmonsters worden vervoerd, moeten zodanig zijn dat significante wijzigingen in de aanvankelijke bodemeigenschappen uitgesloten zijn.

▼B

1.7.3.2. *Opslag*

Het gebruik van verse bodemmonsters verdient de voorkeur. Alleen als dit niet mogelijk is, moeten de monsters bij kamertemperatuur en luchtdroog worden bewaard. Er is geen aanbevolen houdbaarheidstermijn, maar monsters die meer dan drie jaar zijn bewaard moeten vóór gebruik opnieuw worden geanalyseerd op hun gehalte aan organische koolstof. pH en capaciteit voor kationuitwisseling.

1.7.3.3. *Behandeling en voorbereiding van bodemmonsters voor de test*

De bodemmonsters worden bij kamertemperatuur (bij voorkeur 20-25 ^{o}C) aan de lucht gedroogd. Bij het losmaken moet zo weinig mogelijk kracht worden gebruikt om de oorspronkelijke textuur van de bodem zo veel mogelijk intact te houden. De monsters worden gezeefd tot een deeltjesgrootte $\leq$ 2 mm; bij het zeven moeten de aanbevelingen van de ISO-norm voor bodembemonstering (ISO 10381-6) worden opgevolgd. Een zorgvuldige homogenisering wordt aanbevolen, aangezien de reproduceerbaarheid van de resultaten daardoor wordt bevorderd. Het vochtgehalte van de bodem wordt bij drie monsters bepaald door verhitting op 105 ^{o}C tot constant gewicht (ongeveer 12 uur). Bij alle berekeningen wordt onder de massa van het bodemmonster het drooggewicht verstaan, d.w.z. de voor het vochtgehalte gecorrigeerde massa.

1.7.4. **Voorbereiding van de teststof voor de toevoeging aan de bodemmonsters**

De teststof wordt opgelost in 0,01 M $CaCl_2$ in gedestilleerd of gedeïoniseerd water; de $CaCl_2$-oplossing wordt als waterfase gebruikt om het centrifugeren te vergemakkelijken en de kationuitwisseling tot een minimum te beperken. De concentratie van de stockoplossing moet bij voorkeur drie ordes van grootte hoger zijn dan de detectiegrens van de gebruikte analysemethode. Deze drempel vormt een waarborg voor nauwkeurige metingen bij de hier gevolgde methode; daarnaast moet de concentratie van de stockoplossing lager zijn dan de oplosbaarheid van de teststof in water.

De stockoplossing moet bij voorkeur vlak voor de toevoeging aan het bodemmonster worden bereid en moet afgesloten in het donker bij 4 ^{o}C worden bewaard. De houdbaarheidstermijn is afhankelijk van de stabiliteit van de teststof en de concentratie in de oplossing.

Alleen bij slecht oplosbare stoffen ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) kan, als het moeilijk is de teststof op te lossen, een solubilisator nodig zijn. Deze solubilisator: a) moet mengbaar zijn met water, zoals methanol of acetonitril; b) mag niet in een hogere concentratie dan 1 % van het totale volume van de stockoplossing aanwezig zijn en de concentratie in de oplossing van de teststof die met het bodemmonster in contact komt moet lager zijn (bij voorkeur lager dan 0,1 %); en c) mag geen oppervlakteactieve stof zijn en geen solvolysereactie met de teststof aangaan. Het gebruik van een solubilisator moet bij de rapportage van de gegevens worden vermeld en gemotiveerd.

Slecht oplosbare stollen kunnen ook door „spiking” aan het testsysteem worden toegevoegd: de teststof wordt opgelost in een organisch oplosmiddel en een hoeveelheid daarvan wordt toegevoegd aan het systeem met het bodemmonster en de 0,01 M $CaCl_2$-eplossing in gedestilleerd of gedeïoniseerd water. Het gehalte van de waterfase aan organisch oplosmiddel moet zo laag mogelijk worden gehouden, normaal gesproken maximaal 0,1 %. „Spiking” uit een organisch oplosmiddel kan als nadeel hebben dat de reproduceerbaarheid qua volume slecht is. Dit betekent dat er sprake is van een extra fout aangezien de concentratie van de teststof en het co-oplosmiddel niet bij alle tests gelijk is.

▼B

1.8. VOORWAARDEN WAARAAN DE UITVOERING VAN DE ADSORPTIE/DESORPTIETEST MOET VOLDOEN

1.8.1. **De analysemethode**

De belangrijkste parameters die de nauwkeurigheid van de sorptiemetingen kunnen beïnvloeden zijn: de nauwkeurigheid van de analysemethode voor zowel de opgeloste als de geadsorbeerde fase, de stabiliteit en zuiverheid van de teststof, het bereiken van het sorptie-evenwicht, de omvang van de concentratieverandering in de oplossing, de verhouding bodemmonster/oplossing en de veranderingen in de bodemstructuur tijdens de instelling van het evenwicht (35) (59-62). Aanhangsel 2 bevat enkele voorbeelden die relevant zijn voor de nauwkeurigheid.

De betrouwbaarheid van de gebruikte analysemethode moet worden gecontroleerd op het concentratiebereik dat bij de test wordt verwacht. Het staat de experimentator volledig vrij een geschikte methode te ontwikkelen waarvan de nauwkeurigheid, de precisie, de reproduceerbaarheid, de detectiegrenzen en de recovery aan de eisen voldoen. In het volgende experiment worden richtsnoeren voor de uitvoering van een dergelijke test gegeven.

Een geschikt volume 0,01 M $CaCl_2$ bijvoorbeeld 100 cm^3, wordt gedurende 4 uur geschud met een hoeveelheid, bijvoorbeeld 20 g, van een sterk adsorberend bodemtype, d.w.z. met een hoog gehalte aan organische koolstof en klei; het gebruikte gewicht en volume kan aan de behoefte worden aangepast, maar een verhouding bodemmonster/oplossing van 1:5 is een goed uitgangspunt. Het mengsel wordt gecentrifugeerd en de waterfase kan worden gefiltreerd. Aan deze fase wordt een bekend volume van de stockoplossing met de teststof toegevoegd om te zorgen dat de nominale concentratie binnen het bereik ligt dat bij de test wordt verwacht. Om de aard van de oplossing zo weinig mogelijk te veranderen mag dit volume niet groter zijn dan 10 % van het uiteindelijke volume van de waterfase. De oplossing wordt geanalyseerd.

Om artefacten in de analysemethode en matrixeffecten van de bodem op te sporen moet één blancobepaling met bodemmonster + $CaCl_2$-oplossing (zonder teststof) worden uitgevoerd.

Voor sorptiemetingen kunnen bijvoorbeeld de volgende analysemethoden worden gebruikt: gaschromatografie (GLC), hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC), spectrometrie (bv. GC/massaspectrometrie of HPLC/massaspectrometrie) en vloeistofscintillatietelling (voor radioactief gelabelde stoffen). Onafhankelijk van de gebruikte analysemethode wordt deze geschikt geacht als de recovery tussen 90 % en 110 % van de nominale waarde ligt. Om detectie en evaluatie na de faseverdeling mogelijk te maken moeten de detectiegrenzen van de analysemethode ten minste twee ordes van grootte onder de nominale concentratie liggen.

De kenmerken en detectiegrenzen van de beschikbare analysemethode voor het adsorptieonderzoek spelen een belangrijke rol bij de bepaling van de testomstandigheden en de hele praktische uitvoering van de test. In de hier gegeven beschrijving wordt een algemene route vermeld en worden aanbevelingen en richtsnoeren gegeven voor andere oplossingen wanneer de analysemethode en de omstandigheden in het laboratorium beperkingen opleggen.

▼B

1.8.2. **De keuze van een optimale verhouding bodemmonster/oplossing**

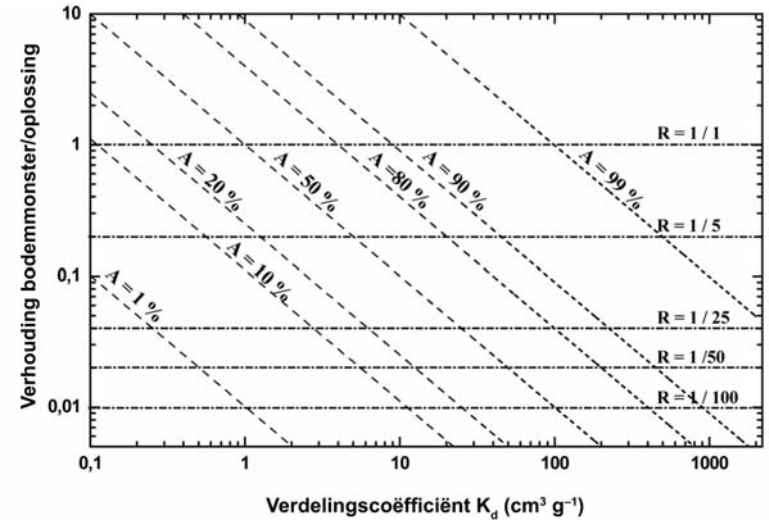
De keuze van een geschikte verhouding bodemmonster/oplossing voor het sorptieonderzoek wordt bepaald door de verdelingscoëfficiënt K_d en de gewenste relatieve adsorptie. De verandering van de concentratie van de stof in de oplossing bepaalt de statistische nauwkeurigheid van de meting op basis van de vorm van de adsorptievergelijking en de beperkingen van de analysemethode bij de bepaling van de concentratie van de stof. Daarom is het meestal verstandig een aantal vaste verhoudingen te kiezen waarbij de adsorptie hoger is dan 20 % en liefst hoger dan 50 % (62). terwijl erop moet worden gelet dat de concentratie van de teststof in de waterfase hoog genoeg blijft om nauwkeurig te kunnen worden gemeten. Dit is vooral belangrijk bij hoge adsorptiepercentages.

Een geschikte manier om de juiste verhouding bodemmonster/waterfase te kiezen is op basis van een raming van de K_d-waarde door voorbereidend onderzoek of erkende schattingstechnieken (zie aanhangsel 3). Vervolgens kan een geschikte verhouding worden gekozen op basis van een grafiek waarin de verhouding bodemmonster/oplossing bij vaste adsorptiepercentages is uitgezet tegen de K_d (zie figuur 1). In deze grafiek wordt uitgegaan van een lineaire adsorptievergeliiking ([1]). Het verband wordt verkregen door vergelijking 4 voor de K_d te herschikken tot vergelijking 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

of in de logaritmische vorm, uitgaande van $R = m_{soil}/V_0$ en $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$



Figuur 1: Verband tussen de verhouding bodemmonster/oplossing en K_d bij verschillende adsorptiepercentages

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Figuur 1 geeft een overzicht van de vereiste verhouding bodemmonster/oplossing als functie van K_d bij verschillende adsorptiepercentages. Zo wordt bij een verhouding 1:5 en een K_d van 20 ongeveer 80 % van de teststof geadsorbeerd. Om bij dezelfde K_d een adsorptie van 50 % te krijgen moet een verhouding van 1:25 worden gebruikt. Als de geschikte verhouding bodemmonster/oplossing op deze manier wordt gekozen, geeft dit de nodige flexibiliteit om aan de experimentele behoeften te voldoen.

De gevallen waarin de chemische stof sterk of nauwelijks wordt geadsorbeerd, leveren meer problemen op. Bij een geringe adsorptie wordt een verhouding bodemmonster/oplossing van 1:1 aanbevolen, hoewel bij sommige zeer organische bodemtypes een lagere verhouding nodig kan zijn om een suspensie te verkrijgen. Bij de meting van kleine veranderingen in de concentratie in de oplossing moet zorgvuldig naar de analysemethode worden gekeken om te voorkomen dat de adsorptiemeting onnauwkeurig wordt. Anderzijds kan bij een zeer hoge verdelingscoëfficiënt K_d de verhouding bodemmonster/oplossing worden opgevoerd tot wel 1:100 om ervoor te zorgen dat er een significante hoeveelheid van de stof in de oplossing achterblijft. Er moet echter voor een goede menging worden gezorgd en het systeem moet voldoende tijd krijgen voor de instelling van het evenwicht. Een andere aanpak is schatting van de K_d-waarde met behulp van ramingstechnieken op basis van bijvoorbeeld de P_{ow}-waarde (zie aanhangsel 3). Dit kan met name nuttig zijn bij slecht geadsorbeerde/polaire stoffen met een $P_{ow} < 20$ en lipofiele/sterk geadsorbeerde stoffen met een $P_{ow} > 10^4$.

1.9. UITVOERING VAN DE TEST

1.9.1. **Testomstandigheden**

Alle experimenten worden uitgevoerd bij kamertemperatuur en indien mogelijk bij een constante temperatuur tussen 20 °C en 25 °C.

Bij het centrifugeren moeten de omstandigheden zodanig zijn dat deeltjes groter dan 0,2 μm uit de oplossing kunnen worden verwijderd. Dit zijn de kleinste deeltjes die als vaste deeltjes worden beschouwd; beneden deze grenswaarde vallen ze in de categorie colloïddeeltjes. Aanhangsel 4 bevat richtsnoeren om de centrifugeeromstandigheden te bepalen.

Als het centrifugeren niet zodanig kan gebeuren dat de verwijdering van grotere deeltjes dan 0,2 μm wordt gewaarborgd, moet een combinatie van centrifugeren en filtreren met filters van 0,2 μm worden gebruikt. Deze filters moeten van een geschikt inert materiaal zijn vervaardigd om verliezen van de teststof daaraan te voorkomen. In elk geval moet worden aangetoond dat er bij het filtreren geen teststof verloren gaat.

1.9.2. **Fase 1: Voorbereidend onderzoek**

Het doel van de uitvoering van een voorbereidend onderzoek is al in het hoofdstuk „Toepassingsgebied” beschreven. In onderstaande beschrijving worden richtsnoeren gegeven voor de wijze waarop een dergelijk experiment kan worden opgezet.

1.9.2.1. *Selectie van de optimale verhouding bodemmonster/oplossing*

Er worden twee bodemtypes en drie verhoudingen bodemmonster/oplossing gebruikt (zes experimenten). Eén bodemtype heeft een hoog gehalte aan organische koolstof en een laag kleigehalte en het andere een laag gehalte aan organische koolstof en een hoog kleigehalte. De volgende verhoudingen worden aangeraden:

— 50 g bodemmonster en 50 cm^3 oplossing van de teststof in water (verhouding 1:1),

▼B

— 10 g bodemmonster en 50 cm^3 oplossing van de teststof in water (verhouding 1:5),

— 2 g bodemmonster en 50 cm^5 oplossing van de teststof in water (verhouding 1:25).

De minimale hoeveelheid bodemmonster waarmee het experiment kan worden uitgevoerd, is afhankelijk van de mogelijkheden van het laboratorium en de gebruikte analysemethode. Om betrouwbare resultaten te krijgen wordt echter aangeraden minimaal 1 g en bij voorkeur 2 g te gebruiken.

Eén controlemonster met uitsluitend de teststof in 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (zonder bodemmonster) wordt aan exact dezelfde behandeling onderworpen als de testsystemen om de stabiliteit van de teststof in de $CaCl_2$-op-lossing en de mogelijke adsorptie aan de wanden van het proefvat te controleren.

Voor elk bodemtype wordt één blancobepaling met dezelfde hoeveelheid bodemmonster en een totaalvolume van 50 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$-oplossing (zonder teststof) op dezelfde wijze behandeld. Deze bepaling fungeert als achtergrond tijdens de analyse om storende stoffen of verontreinigde bodem te kunnen signaleren.

Alle experimenten, ook de controle- en blancobepalingen, moeten minimaal in duplo worden uitgevoerd. Het totale aantal monsters dat voor het onderzoek nodig is kan aan de hand van de gevolgde methode worden bepaald.

In het algemeen worden voor het voorbereidend onderzoek en het hoofdonderzoek dezelfde methoden gebruikt. Uitzonderingen op deze regel worden waar nodig vermeld.

De aan de lucht gedroogde bodemmonsters worden geëquilibreerd door de nacht vóór de dag van het experiment (gedurende 12 uur) te schudden met een minimaal volume van 45 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$-oplossing. Vervolgens wordt een bepaald volume van de stockoplossing met de teststof toegevoegd om het uiteindelijke volume op 50 cm^3 te brengen. Dit toegevoegde volume stockoplossing: a) mag niet groter zijn dan 10 % van het uiteindelijke volume van de waterfase van 50 cm^3 om de aard van de oplossing vóór equilibreren zo weinig mogelijk te veranderen en b) moet bij voorkeur leiden tot een beginconcentratie van de teststof in contact met het bodemmonster (C_o) die ten minste twee ordes van grootte hoger ligt dan de detectiegrens van de analysemethode: deze drempelwaarde waarborgt dat er ook bij een hoge adsorptie (> 90 %) nauwkeurige metingen kunnen worden uitgevoerd en dat later de adsorptie-isothermen kunnen worden bepaald. Tevens wordt indien mogelijk een lagere beginconcentratie van de stof (C_o) dan de helft van de oplosbaarheidsgrens aanbevolen.

De concentratie van de stockoplossing (C_{st}) kan analoog aan het volgende voorbeeld worden berekend. Uitgaande van een detectiegrens van 0,01 µg cm^{-3} van 90 % en een adsorptie van 90 % moet de beginconcentratie van de teststof in contact met het bodemmonster bij voorkeur 1 µg cm^{-3} zijn (twee ordes van grootte hoger dan de detectiegrens). Wanneer het maximale aanbevolen volume van de stockoplossing wordt toegevoegd, d.w.z. 5 cm^3 aan 45 cm^3 geëquilibreerde 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (=10 % van de stockoplossing t.o.v. het totaalvolume van de waterfase van 50 cm^3), moet de concentratie van de stockoplossing 10 µg cm^{-3} zijn: dit is drie ordes van grootte hoger dan de detectiegrens van de analysemethode.

De pH van de waterfase moet voor en na het contact met het bodemmonster worden gemeten, aangezien deze een belangrijke rol bij het hele adsorptieproces speelt, met name bij ioniseerbare stoffen.

▼B

Het mengsel wordt geschud totdat het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld. De daarvoor benodigde tijd varieert sterk, afhankelijk van de stof en het bodemmonster: meestal volstaat een periode van 24 uur (77). Aanbevolen wordt tijdens het voorbereidend onderzoek gedurende een schudperiode van 48 uur achtereenvolgens verschillende monsters te nemen (bv. na 4, 8, 24 en 48 uur). De analysetijdstippen moeten echter gelet op het werkschema in het laboratorium flexibel worden gehanteerd.

Er zijn twee mogelijkheden voor de analyse van de teststof in de waterige oplossing: a) de parallelle methode en b) de seriële methode. Met nadruk moet worden gesteld dat de parallelle methode weliswaar experimenteel omslachtiger is, maar dat de mathematische behandeling van de resultaten eenvoudiger is (zie aanhangsel 5). De keuze van de gevolgde methode wordt echter aan de experimentator overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

a) Parallelle methode: per tijdsinterval waarvoor de adsorptiekinetiek wordt onderzocht, wordt een mengsel met dezelfde verhouding bodemmonster/oplossing bereid. Na bijvoorbeeld 4 uur wordt de waterfase na centrifugeren en desgewenst filtreren zo volledig mogelijk uit de eerste buis verwijderd en vervolgens gemeten; na bijvoorbeeld 8 uur gebeurt dit voor de tweede buis, na 24 uur voor de derde buis enz.

b) Seriële methode: voor elke verhouding bodemmonster/oplossing wordt slechts één mengsel in duplo bereid. Op vooraf bepaalde tijdstippen wordt het mengsel gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. In een kleine hoeveelheid van de waterfase wordt de teststof onmiddellijk geanalyseerd; vervolgens gaat het experiment verder met het oorspronkelijke mengsel. Als na het centrifugeren wordt gefiltreerd, moet filtratie van kleine hoeveelheden waterige oplossing in het laboratorium mogelijk zijn. Om te zorgen dat de verhouding bodemmonster/oplossing niet significant verandert en de voor adsorptie beschikbare hoeveelheid oplossing tijdens de test niet afneemt, wordt aanbevolen in totaal niet meer dan 1 % van het totale volume van de oplossing voor de analyses te gebruiken.

Het adsorptiepercentage A_{t_i} wordt op elk tijdstip t_i berekend op basis van de nominale beginconcentratie en de gemeten concentratie op het bemonsteringstijdstip t_i en gecorrigeerd voor de waarde van de blanco-bepaling. De A_{t_i}. wordt uitgezet tegen de tijd (zie figuur 1 in aanhangsel 5) om te bepalen wanneer het evenwicht wordt bereikt ([1]). Tevens wordt de K_d-waarde bij evenwicht berekend. Op basis van deze K_d-waarde worden geschikte verhoudingen bodemmonster/oplossing uit figuur 1 gekozen, zodat het adsorptiepercentage hoger dan 20 % en bij voorkeur hoger dan 50 % is (61). Alle vergelijkingen en beginselen voor het tekenen van de curve worden vermeld in het hoofdstuk over gegevens en rapportage en in aanhangsel 5.

1.9.2.2. *Bepaling van de equilibratietijd voor adsorptie en de bij evenwicht geadsorbeerde hoeveelheid teststof*

Zoals reeds is vermeld, kan aan de hand van curves waarin A_{t_i} of C_{aq}^{ads} tegen de tijd wordt uitgezet, worden bepaald wanneer het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld en hoeveel teststof bij evenwicht is geadsorbeerd. De figuren 1 en 2 in aanhangsel 5 zijn voorbeelden van dergelijke curves. De equilibratietijd is de tijd die het systeem nodig heeft om stationair te worden.

([1]) Curves waarin de concentratie van de teststof wordt uitgezet tegen de tijd, kunnen ook worden gebruikt om te bepalen wanneer het evenwicht (C_{aq}^{ads}) wordt bereikt (zie figuur 2 in aanhangsel 5).

▼B

Indien bij een bepaald bodemmonster de curve niet horizontaal gaat lopen maar blijft stijgen, kan dit worden veroorzaakt door complicerende factoren zoals biologische afbraak of trage diffusie. Biologische afbraak kan worden aangetoond door het experiment te herhalen met een gesteriliseerd bodemmonster. Als zich ook in dat geval geen evenwicht instelt, moet er worden gezocht naar andere verschijnselen die zich in dat specifieke geval kunnen voordoen; dit kan gebeuren door de experimentele omstandigheden (temperatuur, schudtijd, verhouding bodemmonster/oplossing) te wijzigen. De experimentator moet zelf bepalen of het zinvol is de testprocedure verder uit te voeren, ook al zal zich wellicht geen evenwicht instellen.

1.9.2.3. *Adsorptie aan het oppervlak van hei proefvat en stabiliteit van de teststof*

Enige informatie over de adsorptie van de teststof aan het oppervlak van de proefvaten en over de stabiliteit van de stof kan uit een analyse van de controlemonsters worden afgeleid. Als er meer stof verdwijnt dan de standaardafwijking van de analysemethode, kan er sprake zijn van niet-biologische afbraak en/of adsorptie aan het oppervlak van het proefvat. Deze verschijnselen kunnen van elkaar worden onderscheiden door de wanden van het proefvat grondig te wassen met een bekend volume van een geschikt oplosmiddel en de wasvloeistof op de teststof te analyseren. Als er geen adsorptie aan het oppervlak van het proefvat wordt waargenomen, wijst het verdwijnen van de teststof op niet-biologische afbraak. Als er wel adsorptie wordt geconstateerd, moeten er proefvaten van een ander materiaal worden gebruikt. De bij dit experiment verkregen gegevens over de adsorptie aan het oppervlak van de proefvaten kunnen echter niet rechtstreeks naar het experiment met bodemmonster/oplossing worden geëxtrapoleerd, aangezien deze adsorptie door de aanwezigheid van het bodemmonster wordt beïnvloed.

Aanvullende informatie over de stabiliteit van de teststof kan worden verkregen door de bepaling van de massabalans van de teststof in de loop van de tijd. Dit betekent dat de waterfase, bodemextracten en de wanden van het proefvat op de teststof worden geanalyseerd. Het verschil tussen de toegevoegde massa en de som van de hoeveelheden die in de waterfase en bodemextracten en aan de wanden van het proefvat worden teruggevonden, is gelijk aan de afgebroken en; of verdampte en/of niet-geëxtraheerde hoeveelheid. Om een massabalans te kunnen bepalen moet net adsorptie-evenwicht zich binnen de periode waarin het experiment wordt uitgevoerd, hebber, ingesteld.

De massabalans wordt bepaald voor beide bodemtypes en één verhouding bodemmonster/oplossing per bodemtype waarbij de depletie bij evenwicht hoger is dar, 20 % en bij voorkeur hoger dan 50 %. Wanneer het experiment om de verhouding te bepalen wordt afgerond met de analyse van het laatste monster van de waterfase na 48 uur, worden de fasen door centrifugeren en desgewenst filtreren gescheiden. De waterfase wordt zo volledig mogelijk verwijderd en aan de bodemfase wordt een geschikt oplosmiddel (een extractiecoëfficiënt van minimaal 95 %) toegevoegd om de reststof te extraheren. Aanbevolen wordt deze extractie ten minste twee maal na elkaar uit te voeren. De hoeveelheid teststof in het bodem- en het proefvatextract wordt gemeten en de massabalans wordt bepaald (zie vergelijking 10 in het hoofdstuk Gegevens en rapportage). Als de massabalans lager is dan 90 %, wordt de reststof geacht binnen de tijdschaal van de test instabiel te zijn. Het onderzoek kan dan wel worden voortgezet, mits echter rekening wordt gehouden met de instabiliteit van de teststof; in dit geval wordt: aanbevolen in het hoofdonderzoek beide fasen te analyseren.

▼B

1.9.2.4. *Fase 2: Adsorptiekinetiek hij één concentratie van de teststof*

Er worden vijf bodemtypes gebruikt, die uit tabel 1 worden gekozen. Indien mogelijk verdient het aanbeveling enkele of alle bodemtypes uit het voorbereidende onderzoek te gebruiken, omdat in dat geval fase 2 voor deze bodemtypes niet behoeft te worden herhaald.

Op basis van de resultaten van het voorbereidend onderzoek worden de equilibratietijd, de verhouding bodemmonster/oplossing, het gewicht van het bodemmonster, het volume van de waterfase in contact met het bodemmonster en de concentratie van de teststof in de oplossing gekozen. Analyse moet bij voorkeur gebeuren na ongeveer 2, 4, 6, 8 (indien mogelijk ook 10} en 24 uur contacttijd; de schudtijd kan tot maximaal 48 uur worden verlengd, wanneer is gebleken dat een stof een langere equilibratietijd vergt. De analysetijdstippen kunnen echter met enige flexibiliteit worden bepaald.

Elk experiment (één bodemmonster en één oplossing) wordt ten minste in duplo uitgevoerd om de spreiding van de resultaten te kunnen bepalen. In elk experiment wordt één blancobepaling opgenomen. Daarbij worden dezelfde massa bodemmonster en hetzelfde volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (zonder teststof) als bij het experiment gebruikt. Een controlemonster met alleen de teststof in 0,01 M Ca Cl_2-op lossing (zonder bodemmonster) wordt aan dezelfde behandeling onderworpen om onverwachte afwijkingen te kunnen constateren.

Het adsorptiepercentage wordt op elk tijdstip (A_{t_i}) en/of over elk tijdsinterval ($A_{\Delta t_i}$) berekend (al naar behoefte) en tegen de tijd uitgezet. Tevens worden de verdelingscoëfficiënt K_d bij evenwicht en de genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof K_{or}. (voor apolaire organische stoffen) berekend.

Resultaten van de bepaling van de adsorptiekinetiek

De lineaire K_d-waarde is meestal een nauwkeurige beschrijving van het sorptiegedrag in de bodem (35)(78) en geeft de inherente mobiliteit van chemische stoffen in de bodem aan. Zo worden chemische stoffen met een $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} in het algemeen als mobiel beschouwd. Ook op basis van de K_{oc}-waarden is een indelingssysteem voor de mobiliteit opgezet door MacCall et al. (16). Daarnaast zijn er indelingssytemen voor de uitloging op basis van een verband tussen K_{oc} en DT-50 ([1]) (32) (79).

Op basis van ten foutenanalyse (61) is geconcludeerd dat K_d-waarden lager dan 0,3 cm^3 g^{-1} niet nauwkeurig kunnen worden bepaald aan de hand van een afname van de concentratie in de waterfase, zelfs als de (met het oog op de nauwkeurigheid) gunstigste verhouding bodemmonster/oplossing, d.w.z. 1:1 wordt gebruikt. In dit geval wordt een analyse van beide fasen, zowel bodem als oplossing, aanbevolen.

([1]) DT-50 tijd waarin 50 1/2 van de teststof wordt afgebroken.

▼B

Gelet op bovenstaande opmerkingen wordt aanbevolen het onderzoek naar het adsorptiegedrag van een chemische stof in de bodem en zijn potentiële mobiliteit uit te breiden met een bepaling van de adsorptie-isothermen volgens Freundlich, wanneer een nauwkeurige bepaling van K_d met het hier beschreven experimentele protocol mogelijk is. Een nauwkeurige bepaling is mogelijk als vermenigvuldiging van K_d met de verhouding bodemmonster/oplossing een getal groter dan 0,3 opleven wanneer de daling van de concentratie in de waterfase wordt gemeten (indirecte methode) of een getal groter dan 0,1 wanneer beide fasen worden geanalyseerd (directe methode) (61).

1.9.2.5. *Fase 3: Adsorptie-isothermen en desorptiekinetiek/desorptie-isothermen*

1.9.2.5.1. Adsorptie-isothermen

Er worden vijf concentraties van de teststof gebruikt, die bij voorkeur twee ordes van grootte beslaan: bij de keuze van deze concentraties moet rekening worden gehouden met de oplosbaarheid in water en de resulterende evenwichtsconcentraties in de waterfase. Per bodemmonster moet in het hele onderzoek dezelfde verhouding bodem/oplossing worden gebruikt. De adsorptietest wordt volgens bovenstaande methode uitgevoerd, met als enige verschil dat de waterfase slechts éénmaal wordt geanalyseerd op het tijdstip waarop het evenwicht zich heeft ingesteld zoals bepaald tijdens fase 2. De evenwichtsconcentraties in de oplossing worden bepaald en de geadsorbeerde hoeveelheid wordt aan de hand van de afname van de hoeveelheid teststof in de oplossing berekend of met de directe methode bepaald. De geadsorbeerde massa teststof per massaeenheid bodemmonster wordt uitgezet tegen de evenwichtsconcentratie van de teststof (zie het hoofdstuk Gegevens en rapportage).

Resultaten van de bepaling van de adsorptie-isotherm

Van de tot op heden gesuggereerde mathematische modellen voor de adsorptie wordt voor de beschrijving van het adsorptieproces meestal de Freundlich-isotherm gebruikt. Gedetailleerdere informatie over de interpretatie en relevantie van adsorptiemodellen is te vinden in de referenties (41) (45) (80) (83) (82).

NB: Er dient te worden opgemerkt dat een vergelijking van de waarde van K_F (adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich) voor verschillende stoffen alleen mogelijk is als deze K_1-waarden in dezelfde eenheden worden uitgedrukt (83).

1.9.2.5.2. Desorptiekinetiek

Dit experiment is bedoeld om na te gaan of een chemische stof reversibel of irreversibel aan de bodem wordt geadsorbeerd. Deze informatie is belangrijk, aangezien het desorptieproces ook bij het gedrag van een stof in de praktijksituatie een belangrijke rol speelt. Bovendien kunnen desorptiegegevens goed worden gebruikt bij computermodellen voor uitloging en de simulering van de afspoeling van opgeloste stoffen. Als een desorptie-onderzoek gewenst wordt, wordt aanbevolen de hier beschreven methode te volgen voor elk systeem waarvoor een nauwkeurige bepaling van K_d bij de reeds beschreven methode ter bepaling van de adsorptiekinetiek mogelijk was.

Net als voor de bepaling van de adsorptiekinetiek zijn er twee mogelijkheden voor de uitvoering van het desorptiekinetiekexperiment: a) de parallelle methode en b) de seriële methode. De keuze van de gevolgde methode wordt aan de experimentator overgelaten, die rekening moet houden met de beschikbare laboratoriumfaciliteiten en middelen.

▼B

a) Parallelle methode: voor elk bodemmonster waarvoor het desorptieonderzoek wordt uitgevoerd, wordt per tijdsinterval waarvoor de desorptiekinetiek wordt onderzocht, een mengsel met dezelfde verhouding bodemmonster/oplossing bereid. Bij voorkeur dienen dezelfde tijdsintervallen als bij het adsorptiekinetiekexperiment te worden gebruikt; het totale tijdsinterval kan echter waar nodig worden verlengd om te zorgen dat het desorptie-evenwicht zich kan instellen. Voor elk experiment (één bodemmonster, één oplossing) wordt één blancobepaling uitgevoerd met dezelfde hoeveelheid bodemmonster en 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (zonder teststof) als bij bet experiment. Een controlemonster met de teststof in 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (zonder bodemmonster) wordt aan dezelfde behandeling onderworpen. Alle mengsels van bodemmonster met oplossing worden geschud totdat het adsorptie-evenwicht (zoals bepaald tijdens fase 2) zich instelt. Vervolgens worden de fasen door centrifugeren gescheiden en wordt de waterfase zo volledig mogelijk verwijderd. De verwijderde oplossing wordt vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing zonder teststof en het nieuwe mengsel wordt opnieuw geschud. De waterfase van de eerste buis wordt na bijvoorbeeld 2 uur zo volledig mogelijk verwijderd en gemeten, van de tweede buis na 4 uur, van de derde buis na 6 uur, enz., totdat het desorptie-evenwicht wordt bereikt.

b) Seriële methode: na het adsorptiekinetiekexperiment wordt het mengsel gecentrifugeerd en wordt de waterfase zo volledig mogelijk verwijderd. De verwijderde oplossing wordt vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$- oplossing zonder teststof. Het nieuwe mengsel wordt geschud totdat het desorptie-evenwicht zich heeft ingesteld. Tijdens deze periode wordt het mengsel op vooraf bepaalde tijdstippen gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. In een kleine hoeveelheid van de waterfase wordt de teststof onmiddellijk geanalyseerd: vervolgens gaat het experiment verder met het oorspronkelijke mengsel. Het volume van elk monster voor de analyse mag niet groter zijn dan 1 % van het totale volume. Om te zorgen dat de verhouding bodemmonster/oplossing niet verandert, wordt het mengsel aangevuld met hetzelfde volume verse 0,01 M $CaCl_2$-oplossing en vervolgens wordt het schudden hervat tot het volgende analysetijdstip.

Het desorptiepercentage wordt op elk tijdstip ((D_{t_i})) over elk tijdsinterval ($(D_{\Delta t_i})$) berekend (al naar behoefte) en tegen de tijd uitgezet. Tevens wordt de desorptiecoëfficiënt K_{des} bij evenwicht berekend. Alle benodigde vergelijkingen zijn vermeld in het hoofdstuk Gegevens en rapportage en aanhangsel 5.

Resultaten van het desorptiekinetiekietiekexperiment

Door het desorptiepercentage D_{t_i} en het adsorptiepercentage A_{t_i} in één figuur tegen de tijd uit te zetten, kan de omkeerbaarheid van het adsorptieproces worden bepaald. Als het desorptie-evenwicht zich binnen uiterlijk tweemaal de equilibratietijd voor de adsorptie instelt en in totaal meer dan 95 % van de geadsorbeerde hoeveelheid wordt gedesorbeerd, wordt de adsorptie als reversibel beschouwd.

1.9.2.5.3. Desorptie-isothermen

Desorptie-isothermen volgens Freundlich worden bepaald voor de bodemmonsters waarvoor ook de adsorptie-isothermen zijn bepaald. De uitvoering van het experiment gebeurt net als bij de bepaling van de desorptiekinetiek met als enige verschil dat de waterfase slechts éénmaal, bij het desorptie-evenwicht, wordt geanalyseerd. De gedesorbeerde hoeveelheid reststof wordt berekend. De hoeveelheid teststof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft, wordt uitgezet tegen de evenwichtsconcentratie van de teststof in de oplossing (zie het hoofdstuk Gegevens en rapportage en aanhangsel 5).

▼B

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

De analysegegevens worden in de vorm van tabellen weergegeven (zie aanhangsel 6). De afzonderlijke metingen er de berekende gemiddelden worden vermeld. De adsorptie-isothermen worden grafisch weergegeven. De berekeningen worden volgens onderstaande voorschriften uitgevoerd.

In dit verband wordt ervan uitgegaan dat 1 cm^3 waterige oplossing 1 g weegt. De verhouding bodemmonster/oplossing kan in eenheden g/g of g/vol met hetzelfde getal worden weergegeven.

2.1. ADSORPTIE

De adsorptie (A_{t_i}) wordt gedefinieerd als het percentage van de aan het begin van de test aanwezige stof dat onder de testomstandigheden aan het bodemmonster wordt geadsorbeerd. Als de teststof stabiel is en niet in significante mate aan de wanden van het vat wordt geadsorbeerd, wordt A_{t_i} op elk tijdstip t_i, als volgt berekend:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

Hierbij is:

A_{t_i} = adsorptiepercentage op het tijdstip t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa van de op het tijdstip t_i aan bet bodemmonster geadsorbeerde teststof (μg);

m_0 = massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de test (μg).

Aanhangsel 5 bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop het adsorptiepercentage A_{t_i}, voor de parallelle en seriële methode wordt berekend.

De verdelingscoëfficiënt K_d is de verhouding tussen het gehalte van de bodemfase aan de slof en de massaconcentratie van de stof in de waterige oplossing onder de testomstandigheden nadat het adsorptie-evenwicht is bereikt.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

Hierbij is:

$C_s^{ads}(eq)$ = gehalte aan de geadsorbeerde stof in het bodemmonster bij het adsorptie-evenwicht (μg g^{-1})

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massaconcentratie van de stof in de waterfase bij adsorptie-evenwicht (μg cm^{-3}). Deze concentratie wordt door analyse bepaald waarbij rekening wordt gehouden met het resultaat van de blancobepaling

$m_s^{ads}(eq)$ = bij adsorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerde massa teststof (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa van de stof in de oplossing bij adsorptie-evenwicht (μg)

m_{soil} = hoeveelheid van het bodemmonster, uitgedrukt in droge massa (g);

V_0 = volume van de waterfase die aan het begin van de test in contact met het bodemmonster is (cm^{-3}).

Het verband tussen A_{eq} en K_d is:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

Hierbij is:

A_{eq} = adsorptiepercentage bij adsorptie-evenwicht in %.

De genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor organische koolstof K_{oc} geeft het verband aan tussen de verdelingscoëfficiënt K_d en het gehalte van het bodemmonster aan organische koolstof:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

Hierbij is:

% OC = percentage organische koolstof in het bodemmonster (g g^{-1}).

K_{oc} is een coëfficiënt die vooral kenmerkend is voor de verdeling van apolaire organische stoffen over de organische koolstof in de bodem of het sediment en water. De adsorptie van deze stoffen is gecorreleerd aan het gehalte van de sorberende vaste stof aan organisch materiaal (7); K_{oc} is derhalve afhankelijk van de specifieke kenmerken van de humusfracties die door verschillen in onder andere herkomst en ontstaanswijze aanzienlijke verschillen in sorptiecapaciteit vertonen.

2.1.1. **Adsorptie-isothermen**

De vergelijking voor de adsorptie-isothermen volgens Freundlich geeft het verband aan tussen de geadsorbeerde hoeveelheid teststof en de concentratie van de teststof in oplossing bij evenwicht (vergelijking 8).

De gegevens worden behandeld als onder „Adsorptie” en voor elke proefbuis wordt het gehalte aan de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof na de adsorptietest $C_s^{ads}(eq)$, elders aangegeven als x/m) berekend. Aangenomen wordt dat het evenwicht zich heeft ingesteld en dat $C_s^{ads}(eq)$ de waarde bij evenwicht vertegenwoordigt:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

De adsorptievergelijking volgens Freundlich is:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \,.\, C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

of in de lineaire vorm:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

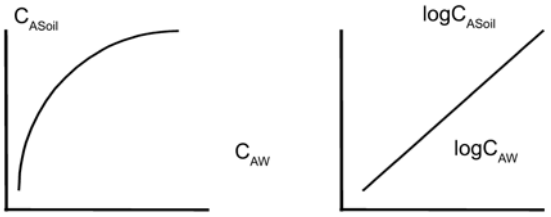
Hierbij is:

K_F^{ads} = de adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich; de dimensie is uitsluitend $cm^3\ g^{-1}$ als l/n = 1; in alle andere gevallen wordt de helling 1/n geïntroduceerd in de dimensie van K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$);

n = de regressieconstante; 1/n ligt meestal tussen 0,7 en 1,0 hetgeen aangeeft dat de sorptiegegevens vaak enigszins niet-lineair zijn.

De vergelijkingen 8 en 9 worden uitgezet en de waarden van K_F^{ads} en 1/n worden berekend door regressieanalyse met behulp van vergelijking 9. De correlatiecoëfficiënt r^2 van de log-vergelijking wordt ook berekend. Figuur 2 bevat een voorbeeld van dergelijke curves.

▼B



Figuur 2: Freundlich-adsorptiecurves, normaal en lineair.

2.1.2. **Massabalans**

De massabalans (MB) wordt gedefinieerd als het percentage van een stof dat na een adsorptietest door analyse wordt teruggevonden in vergelijking met de nominale hoeveelheid stof aan het begin van de test.

De behandeling van de gegevens verschilt voor oplosmiddelen die al dan niet volledig mengbaar zijn met water. Voor met water mengbare oplosmiddelen kan de onder „Desorptie" beschreven behandeling van de gegevens worden gebruikt om de door oplosmiddelextractie teruggevonden hoeveelheid stof te bepalen. Als het oplosmiddel minder goed mengbaar is met water, moet de teruggevonden hoeveelheid apart worden bepaald.

De massabalans MB voor de adsorptie wordt als volgt berekend (aangenomen wordt dat de term (m_E) overeenkomt met de totale hoeveelheid teststof die met een organisch oplosmiddel uit het bodemmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd):

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

Hierbij is:

MB = massabalans (%);

m_E = totale hoeveelheid teststof die in twee stappen uit het bodemmonster en de wanden van het proefvat wordt geëxtraheerd (μg);

C_o = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip t = 0 (μg cm^{-3}):

V_{rec} = volume van het supernatans dat na het adsorptie-evenwicht wordt verwijderd (cm^{-3}),

2.2. DESORPTIE

De desorptie (D) wordt gedefinieerd als het percentage van de teststof dat onder de testomstandigheden wordt gedesorbeerd in vergelijking met de hoeveelheid stof die daarvoor was geadsorbeerd:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (11)$$

Hierbij is:

D_{ti} = desorptiepercentage op het tijdstip t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa van de uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof op het tijdstip t_i (µg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa van de bij adsorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof (µg).

Aanhangsel 5 bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop het desorptiepercentage D_{t^i} voor de parallelle en de seriële methode wordt berekend.

De schijnbare desorptiecoëfficiënt (K_{des}) is de verhouding tussen het resterende gehalte van de bodemfase aan de stof en de massaconcentratie van de gedesorbeerde stof in de waterige oplossing onder de testomstandigheden nadat het desorptie-evenwicht is bereikt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

Hierbij is:

K_{des} = desorptiecoëfficiënt ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = totale massa van de bij dessorptie-evenwicht uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (µg);

V_T = totaalvolume van de waterfase die tijdens de desorptiekinetiektest in contact met het bodemmonster is (cm^{-3})

In aanhangsel 5 worden in het hoofdstuk „Desorptie” richtsnoeren gegeven voor de berekening van $m_{aq}^{des}(eq)$.

Opmerking

Als de adsorptietest volgens de parallelle methode werd uitgevoerd, wordt het volume V_T in vergelijking 12 gelijkgesteld aan V_o.

2.2.1. **Desorptie-isothermen**

De vergelijking voor de desorptie-isothermen volgens Freundlich geeft het verband aan tussen de hoeveelheid teststof die aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft en de concentratie van de teststof in oplossing bij het desorptie-evenwicht (vergelijking 16).

Voor elke proefbuis wordt de hoeveelheid teststof die bij het desorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft, als volgt berekend:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ wordt gedefinieerd als:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

Hierbij is:

$C_s^{des}(eq)$ = gehalte aan de teststof dat bij het desorptie-evenwicht aan het bodemmonster geadsorbeerd blijft (µg g^{-1}):

$m_m^{des}(eq)$ = analytisch bepaalde massa van de stof in de waterfase bij desorptie-evenwicht (µg);

▼B

m_{aq}^{A} = massa van de stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie- evenwicht (µg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa van de stof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht (µg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volume van de oplossing dat voor de bepaling van de teststof bij het desorptie-evenwicht uit de buis is genomen (cm^3);

V_R = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis is verwijderd en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (cm^3);

De desorptievergelijking volgens Freundlich is:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

of in de lineaire vorm:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

Hierbij is:

K_F^{des} = de desorptiecoëfficiënt volgens Freundlich;

n = de regressieconstante;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = de massaconcentratie van de stof in de waterfase bij desorptie-evenwicht (µg cm^{-1}).

De vergelijkingen 16 en 17 kunnen worden uitgezet en en K_F^{des} en 1/n worden berekend door regressie-analyse met behulp van vergelijking 17.

Opmerking

Als de adsorptie- of desorptie-exponent volgens Freundlich (1/n) gelijk is aan 1, is de adsorptie- of desorptie-coëfficiënt volgens Freundlich K_F^{ads} respectievelijk K_F^{des}) gelijk aan de adsorptie- of desorptie-evenwichtsconstante (K_d respectievelijk K_{des} en is de curve van C_s tegen C_{aq} lineair. Als de exponent niet gelijk is aan 1, is de curve van C_s tegen C_{aq} niet lineair en varieert de adsorptie- en desorptieconstante over de isotherm.

2.2.2. **Testverslag**

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

— Volledige identificatie van de gebruikte bodemmonsters met vermelding van:

— geografische gegevens van de locatie (lengte en breedte),

— datum van monsterneming,

▼B

— gebruikspatroon (landbouw, bosbouw, enz.),

— diepte van monsterneming,

— zand/silt/kleigehalte,

— pH-waarden (in 0,01 M $CaCl_2$),

— gehalte aan organische koolstof,

— gehalte aan organisch materiaal,

— stikstofgehalte,

— C/N-verhouding,

— kationuitwisselingscapaciteit (mmol/kg),

— alle informatie over het verzamelen en de opslag van bodemmonsters,

— indien van toepassing, alle relevante informatie voor de interpretatie van de adsorptie/desorptie van de teststof,

— referentie van de methoden die voor de bepaling van de verschillende parameters zijn gebruikt;

— informatie over de teststof, indien van toepassing;

— temperatuur van de experimenten;

— omstandigheden bij het centrifugeren;

— analysemethode die voor de bepaling van de teststof is gebruikt;

— motivering voor een eventueel gebruik van een solubilisator bij de bereiding van de stockoplossing van de teststof;

— verklaring voor correcties bij de berekeningen, indien van toepassing;

— gegevens aan de hand van het formulier daarvoor (aanhangsel 6) en grafische afbeeldingen;

— alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de testresultaten.

3. **REFERENTIES**

(1) Kukowski H. and Brümmer G.. (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Franzle O., Kuhnt G. and Vetter L. (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No l.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. Beligirate. 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: l 1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines. Series 83 5-rate. Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-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, pp. 83-122.

(14) Hasset J.)., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M.Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L, and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, pp. IS5-190.

(18) Rhodes R.C, Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. H., (199 5), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R.J., Klein W, Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and O.sgerbybv J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A.. (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973). „Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem. Heft 37. pp. 143-154.

(27) Hamaker I.W. (1975). „The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed.), pp. 13 5-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S. (1971). „Pesticide mobility in soils". Soil Soc. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker I. W. (1972). „Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds). Vol. l. pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movementin soils". J. of Soil Sci., 28, pp. 340-3 50.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxidation products in fallow soils". Pest. Sci., 11. pp. 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), „Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling fed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.

(36) Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). „Adsorption in organic chemicals' in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I, and Hamaker J.W.. eds), Vol 1 and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972. pp. 49-143."

(46) Deli J., and Warren G F., 19 71, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu. Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson I.M. (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J. (l980), „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 Schachtsschabel, Lekrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J, L., Ensminger L.E. and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Pan 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Pan 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc, 34, pp. 3 5 3-3 54.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I., „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990. 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106". Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ.Qual., 10(3), pp. 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), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U. (1984)„„Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C, (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E. and Goring C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707. Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J. and Freed Y. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G. and Means J.C. (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrorophobic. sorption". Soil Sci. Soc. Am.). 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere, Vol. 10iS), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R. (1981). „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité". Revue de l'Agric, 34-14). pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996). „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". Chemosphere, 32(12). pp. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G.. Müller M. (1995). „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefricien: on soil — results of a ring test". Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases". Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". Weed Research. Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W.O 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., Carsei R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970). „Interpretation and use of sorption isotherms" in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D. (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C. (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de 1'adsorption". Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation", Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

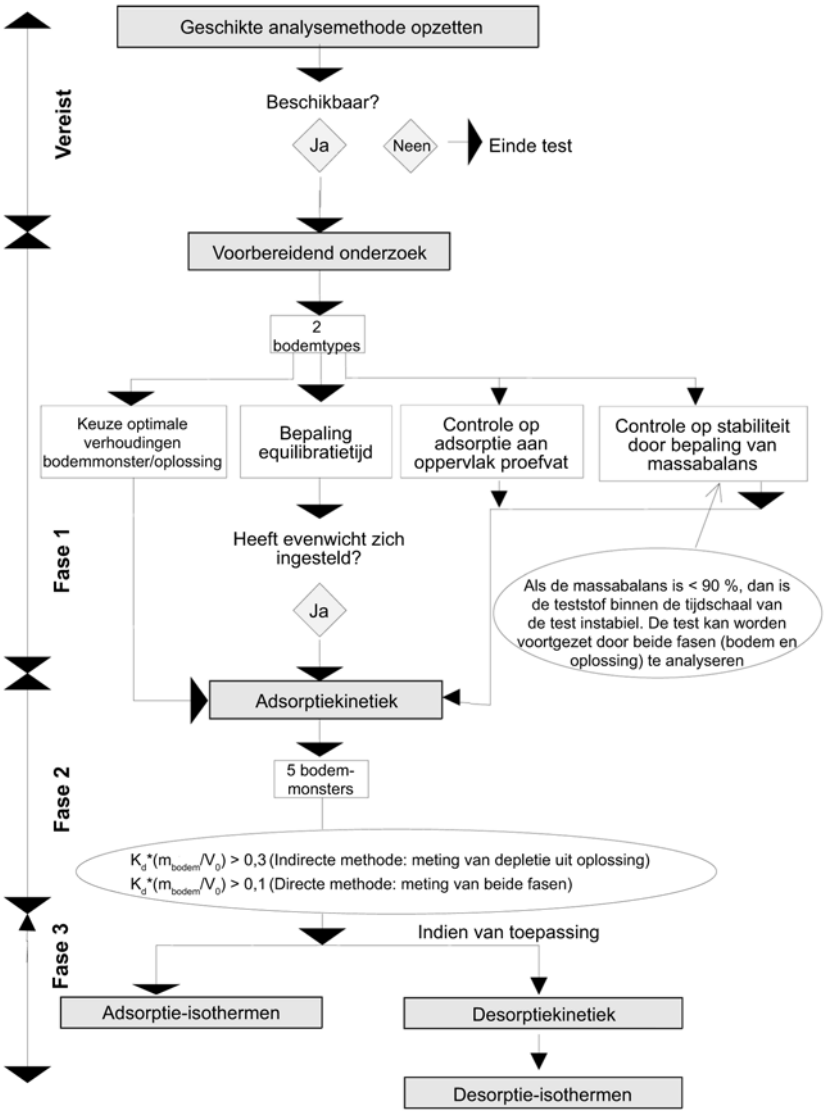
(84) Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption", in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and 1AO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:505 (1962).

▼B

Aanhangsel 1

Testschema



▼B

Aanhangsel 2

INVLOED VAN DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ANALYSEMETHODE EN DE CONCENTRATIEVERANDERING OP DE NAUWKEURIGHEID VAN DE ADSORPTIERESULTATEN

Uit onderstaande tabel (84) blijkt duidelijk dat wanneer het verschil tussen de aanvankelijke massa (m_0 =110 µg) en de evenwichtsmassa $mm_{aq}^{ads}(eq)$ (eq) = 100 µg) van de teststof in de oplossing heel klein is, een fout van 5 % in de meting van de evenwichtsconcentratie leidt tot een fout van 50 % bij de berekening van het gehalte aan de stof dat aan het bodemmonster is geadsorbeerd ($m_s^{ads}(eq)$) en van 52,4 % bij de berekening van K_d.

Hoeveelheid bodemmonster: m_{soil} = 10 g

Volume van de oplossing: V_o = 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^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	VOOR A = 9 %							
m_0 = 110 µg of C_0=1,100 µg/cm^3	100	1,000	Ware waarde	10	1,00	Ware waarde	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 %
	VOOR A = 55 %							
m_0= 110 µg of C_0=1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	Ware waarde	60,0	6,00	Ware waarde	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	0,5 50	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	VOOR A = 99 %							
m_0 = 110 µg of C_0=1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	Ware waarde	108,9	10,89	Ware waarde	990	
	1,111	0,0111	1 %	108,88	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 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}.Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)}\frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = waarin: massa van de teststof in de bodemfase bij evenwicht (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa van de teststof in, de waterfase bij evenwicht (µg)

$C_s^{ads}(eq)$ = gehalte van de bodemfase aan de teststof bij evenwicht (µg g^{-1};

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massaconcentratie van de teststot in de waterfase bij evenwicht µg (cm^{-3};

R = analysefout in de bepaling van $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = fout in berekening ten gevolge van de analysefout R.

▼B

Aanhangsel 3

SCHATTINGSTECHNIEKEN VOOR K_d

1. Schattingstechnieken maken een prognose van K_d mogelijk op basis van een correlatie met bijvoorbeeld P_{ow} -waarden (12) (39) (63-68), gegevens over de oplosbaarheid in water (12) (19) (21) (39) (68-73), of polariteitsgegevens die door HPLC bij omgekeerde fase zijn verkregen (74-76). K_{oc} of K_{om} wordt berekend met behulp van de vergelijkingen in de tabellen 1 en 2 en vervolgens wordt K_d berekend uit de vergelijkingen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1})$$

2. Deze correlaties zijn gebaseerd op twee uitgangspunten: (1.) de adsorptie van een stof wordt vooral bepaald door het organisch materiaal in de bodem en (2.) de interacties daarbij zijn voornamelijk niet-polair. Dit betekent dat deze correlaties: (1) niet of slechts tot op zekere hoogte gelden voor polaire stoffen en (2.) niet kunnen worden gebruikt wanneer het gehalte van de bodem aan organisch materiaal zeer laag is (12). Bovendien is de correlatie tussen P_{ow} en de adsorptie wel bevredigend gebleken (19), maar kan dit niet worden gezegd voor het verband tussen de oplosbaarheid in water en de adsorptie (19) (21); tot op heden zijn de resultaten van de studies zeer tegenstrijdig.

3. In de tabellen 1 en 2 worden enkele voorbeelden gegeven van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en respectievelijk de verdelingscoëfficiënt octanol/water en de oplosbaarheid in water.

Tabel 1

Voorbeelden van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en de verdelingscoëfficiënt octanol/water; zie voor andere voorbeelden (12) en (68)

Stoffen	Correlaties	Auteurs
Gesubstitueerde ureumverbin-dingen	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Gechloreerde aromaten	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou et al (1983) (65)
Uiteenlopende pesticiden	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl en Mingelgrin (1984) (66)
Aromatische koolwaterstoffen	$\log K_{oc} = - 2{,}5\ 3 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles en Mantoura (1987) (67)

Tabel 2

Voorbeelden van de correlatie tussen de adsorptiecoëfficiënt en de oplosbaarheid in water; zie voor andere voorbeelden (68) en (69).

Verbindingen	Correlaties	Auteurs
Uiteenlopende pesticiden	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl en Mingelgrin (1984) (66)
Gechloreerde alifaten en aromaten	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) -(0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
a-Naftol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cyclische alifaten en aromaten	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Uiteenlopende stoffen	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Aanhangsel 4

BEREKENINGEN VOOR DE BEPALING VAN DE CENTRIFUGEER-OMSTANDIGHEDEN

1. Voor de centrifugeertijd geldt, uitgaande van ronde deeltjes, de volgende formule:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Ter vereenvoudiging worden alle parameters in niet-Sl-eenheden (g, cm) beschreven.

Hierbij is:

ω = rotatiesnelheid (= 2 π rpm/60) in rad s^{-1}

rpm = aantal omwentelingen per minuut

η = viscositeit van de oplossing in g s^{-1} cm^{-1}

r_p = straal van de deeltjes in cm

ρ_s = dichtheid van het bodemmonster in g cm^{-3}

ρ_{aq} = dichtheid van de oplossing in g cm^{-3}

R_t = afstand tussen het middelpunt van de centrifugerotor en het vloeistofoppervlak in de centrifugebuis in cm

R_b = afstand tussen het middelpunt van de centrifugerotor en de bodem van de centrifugebuis in cm

R_b-R_t = hoogte van het mengsel bodemmonster/oplossing in de centrifugebuis in cm.

Om een volledige scheiding te waarborgen moet in het algemeen het dubbele van de berekende tijd worden gebruikt.

2. Vergelijking (1) kan verder worden vereenvoudigd als we ervan uitgaan dat de viscositeit (η) en de dichtheid (ρ_{aq}) van de oplossing gelijk zijn aan de viscositeit en de dichtheid van water bij 25 °C, d.w.z. $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} en $\rho_{aq} = 1{,}0$ g.cm^{-3}.

In dat geval geldt voor de centrifugeertijd:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2.r_p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

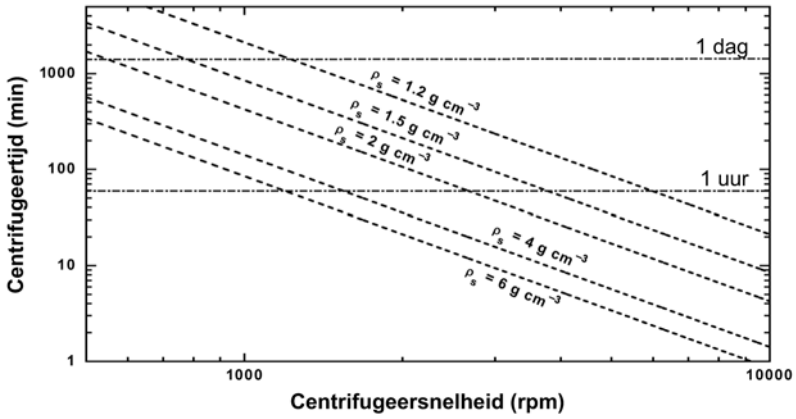
3. Uit vergelijking (2) blijkt dat voor een scheiding van deeltjes met een specifieke grootte (in ons geval een straal van 0,1 µm) twee parameters belangrijk zijn bij de bepaling van de centrifugeeromstandigheden (tijd en snelheid): 1. de dichtheid van het bodemmonster en 2. de hoogte van het mengsel in de centrifugebuis (R_b-R_t), d.w.z. de afstand die een bodemdeeltje van het vloeistofoppervlak van de oplossing naar de bodem van de buis moet afleggen; bij een vast volume wordt de hoogte van het mengsel in de buis uiteraard bepaald door het kwadraat van de straal van de buis.

4. Figuur 1 geeft het verband tussen centrifugeertijd (t) en -snelheid (rpm) bij uiteenlopende bodemdichtheid (ρ_s) (figuur la) en uiteenlopende hoogte van het mengsel in de centrifugebuis (figuur 1b). Uit figuur la blijkt duidelijk wat de invloed van de bodemdichtheid is: bij een gangbare centrifugeersnelheid van 3 000 rpm is de centrifugeertijd ongeveer 240 minuten bij een bodemdichtheid van 1,2 g cm^3 en slechts 50 minuten bij 2,0 g cm^3. Figuur lb levert voor een gangbare centrifugeersnelheid van 3 000 rpm ongeveer 50 minuten op bij een hoogte van het mengsel van 10 cm en slechts zeven minuten bij een hoogte van 1 cm. Het is echter belangrijk dat er een optimaal compromis wordt gevonden tussen zo kort mogelijk centrifugeren en optimaal gebruiksgemak bij de scheiding van de fasen na het centrifugeren.

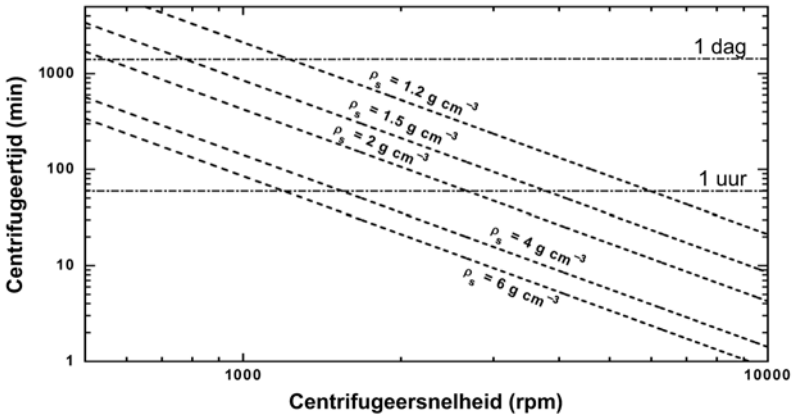
▼B

5. Bovendien moet bij de bepaling van de experimentele omstandigheden bij het scheiden van bodemfase en oplossing worden bedacht dat er een derde „pseudofase" kan ontstaan: colloïden. Deze deeltjes met een grootte van minder dan 0,2 µm kunnen een belangrijke rol spelen bij het hele adsorptiemechanisme van een stof in een bodemsuspensie. Wanneer wordt gecentrifugeerd zoals hierboven is beschreven, blijven de colloïden in de waterfase en worden ze tegelijk met de waterfase geanalyseerd. Dit betekent dat de informatie over het effect van deze deeltjes verloren gaat.

   Als het laboratorium beschikt over ultracentrifuges of ultrafiltratiefaciliteiten, kan de adsorptie/desorptie van een stof in de bodem diepgaander worden onderzocht en kan ook informatie worden verkregen over de adsorptie van de stof aan colloïden. In dit geval moet ultracentrifugatie bij 60 000 rpm of ultrafiltratie met een porositeit van 100 000 Dalton worden gebruikt voor een scheiding van de drie fasen bodem, colloïden en oplossing. Het testprotocol moet ook dienovereenkomstig worden gewijzigd, zodat de analyse van de stof bij alle drie fasen wordt uitgevoerd.



Figuur la: Verband tussen centrifugeertijd (t) en centrifugeersnelheid (rpm) bij uiteenlopende bodemdichtheid (ρ_5). R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10-^{3} g s-^{1} cm-^{1} en ρ_{aq} = 1,0 g cm-^{3} bij 25 °C.



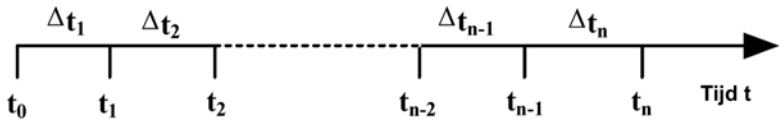
Figuur 1b: Verband tussen centiïiugeertijd (t) en centrifugeersnelheid (rpm) bij uiteenlopende hoogte van het meng sel in de centrifugebuis (R_b-R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,9 5 x 10-^{3} g s-^{1} cm-^{1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm-^{3} bij 25 °C en ρ_s = 2,0 g cm-^{3}.

▼B

Aanhangsel 5

BEREKENING VAN DE ADSORPTIE A (%) EN DESORPTIE D (%)

Het tijdschema voor de procedure is:



Voor alle berekeningen wordt ervan uitgegaan dat de teststof stabiel is en niet in significante mate aan de wanden van het proefvat wordt geadsorbeerd.

ADSORPTIE A (%)

a) *Parallelle methode*

Het adsorptiepercentage wordt voor elke proefbuis (i) op elk tijdstip t_i berekend volgens de vergelijking:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

De factoren in deze vergelijking worden als volgt berekend:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

Hierbij is:

A_{ti} = adsorptiepercentage (%) op het tijdstip t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof op het tijdstip t_i waarop de analyse wordt uitgevoerd (µg)

m_0 = massa van de teststof in de proefbuis aan het begin van de test (µg)

C_o = massaconcentratie van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip t = 0 (µg cm^{-3})

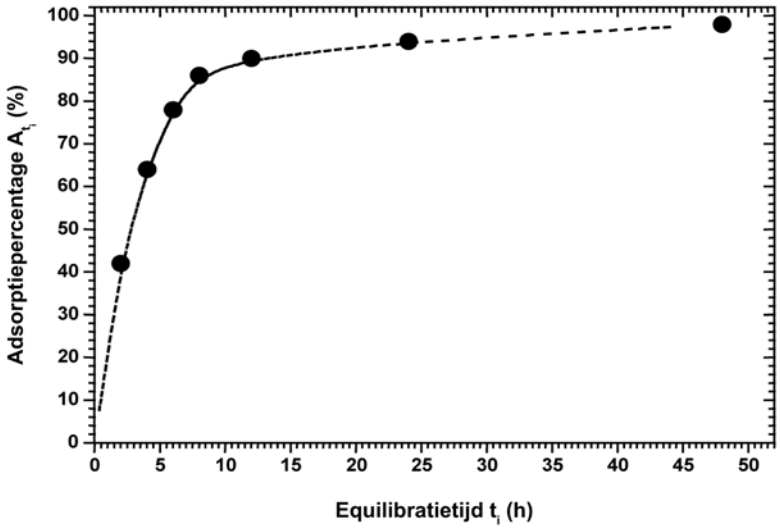
(1) Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = massaconcentratie van de stof in de waterfase op het tijdstip t_i waarop de analyse wordt uitgevoerd (µg cm^{-3}): deze concentratie wordt door analyse bepaald, rekening houdend met de resultaten van de blancobepaling

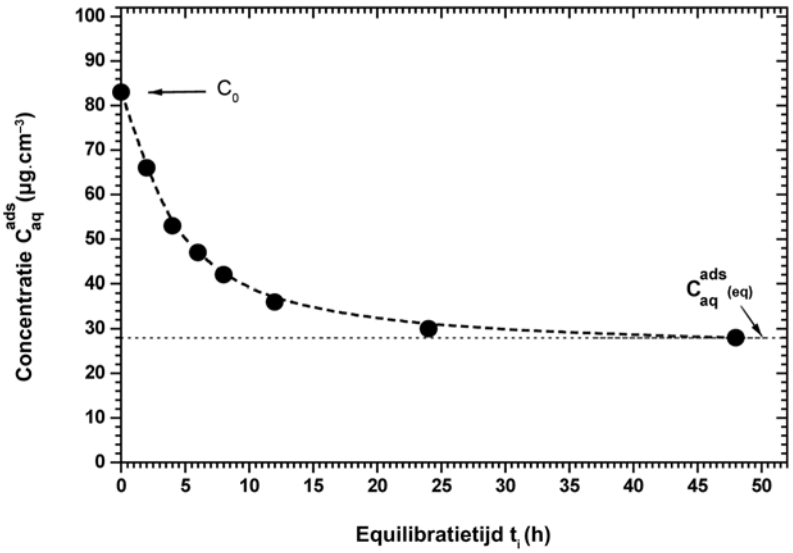
V_O = volume van de testoplossing in contact met het bodemmonster op het tijdstip t = 0 (cm^3).

Het adsorptiepercentage A_{t_i} of $C_{aq}^{ads}(t_i)$ wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het sorptie-evenwicht zich heeft ingesteldt de figuren 1 en 2 bevatten voorbeelden van dergelijke curves.



Figuur 1

Adsorptie-evenwichtscurve



Figuur 2

Massaconcentratie van de teststof in de waterfase (C_{aq}) uitgezet tegen de tijd

▼B

b) *Seriële methode*

In de volgende vergelijkingen wordt er rekening mee gehouden dat de adsorptieprocedure wordt uitgevoerd door meting van de teststof in kleine porties van de waterfase na specifieke tijdsintervallen.

— De hoeveelheid van de stof die gedurende elk tijdsinterval aan het bodemmonster wordt geadsorbeerd, wordt als volgt berekend:

— voor het eerste tijdsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_o$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— voor het tweede tijdsinterval $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— voor het derde tijdsinterval $\Delta t_3 = t_3 — t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— voor het n^e tijdsinterval $\Delta t_n = t_n — t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Het adsorptiepercentage over elk tijdsinterval ($A_{\Delta t_i}$) wordt berekend met behulp van de volgende vergelijking:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)\,(1)$$

terwijl het adsorptiepercentage op het tijdstip t_i (A_{t_i}) wordt berekend met de vergelijking:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)(1)$$

Het adsorptiepercentage A_{t_i} of $A_{\Delta t_i}$ (afhankelijk van de eisen van de studie) wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het sorptie-evenwicht zich heeft ingesteld.

— Op het evenwichtstijdstip t_{eq}:

— is de massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)(1)$$

(1) Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.

▼B

— is de massa van de teststof in de oplossing:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)(1)$$

— en is het adsorptiepercentage bij evenwicht:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)(1)$$

De hier gebruikte parameters worden gedefinieerd als:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof gedurende de tijdsintervallen Δt_1, Δt_2 ... Δt_n (µg)

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = massa van de stof, gemeten in een monster op het tijdstip v_a^A op het tijdstip t_1, t_2,t_n (µg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa van de aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof bij het adsorptie-evenwicht f(µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa van de stof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht (µg)

v_a^A = volume van het monster waarin de teststof wordt bepaald (cm^3)

$A_{\Delta ti}$ = adsorptiepercentage dat overeenkomt met een tijdsinterval At_i (%)

A_{eq} = adsorptiepercentage bij het adsorptie-evenwicht (%).

DESORPTIE D (%)

Als het tijdstip t_0 waarop het desorptie-experiment begint, wordt het moment beschouwd waarop het maximale volume van de oplossing met teststof (nadat het adsorptie-evenwicht zich heeft ingesteld) wordt verwijderd en vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing.

a) *Parallelle methode*

Op een tijdstip t_i wordt de massa van de teststof gemeten in de waterfase die uit buis i is verwijderd (V_r^i) en wordt de gedesorbeerde massa berekend met behulp van de vergelijking:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Bij het desorptie-evenwicht is $t_i = t_{eq}$ en derhalve $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

De massa van de gedurende een tijdsinterval (Δt_i) gedesorbeerde teststof is:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Het desorptiepercentage wordt berekend:

op een tijdstip t_i met de vergelijking:

(1) Deze vergelijkingen gelden voor zowel de directe als de indirecte methode. Alle andere vergelijkingen gelden alleen voor de indirecte methode.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

en gedurende een tijdsinterval (Δt_i) met de vergelijking:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

Hierbij is:

D_{ti} = desorptiepercentage op een tijdstip t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = desorptiepercentage over een tijdsinterval Δt_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massa van de op een tijdstip t_i gedesorbeerde teststof (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massa van de gedurende een tijdsinterval Δt_i gedesorbeerde teststof (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = analytisch bepaalde massa van de teststof in een op een tijdstip t; voor analyse genomen volume-oplossing (μg).V_r^i

$m_{aq}{}^A$ = massa van de teststof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorp-tie-evenwicht (μg).

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa van de teststof in de oplossing bij het adsorptie-evenwicht (μg)

V_R = volume van het supematans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (cm^3)

V_r^i = volume van de oplossing die bij het desorptiekinetiek-experiment voor de bepaling van de teststof uit buis (i) is genomen (cm^3)

Het desorptiepercentage D_t^i of $D_{\Delta t^i}$ (afhankelijk van de eisen van de studie) wordt uitgezet tegen de tijd en vervolgens wordt het tijdstip bepaald waarop het desorptie-evenwicht zich heeft ingesteld.

b) *Seriële methode*

In de volgende vergelijkingen wordt er rekening mee gehouden dat de adsorptieprocedure is uitgevoerd door meting van de teststof in kleine porties ((v_a^A)) van de waterfase (de seriële methode in punt 1.9: „Uitvoering van de test"). Aangenomen wordt dat a) het na het adsorptiekinetiek-experiment uit de buis verwijderde supernatans is vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (V_R) en b) het totale volume van de waterfase in contact met het bodemmonster (V_T) gedurende het desorptiekinetiek-experiment constant blijft en wordt gegeven door de vergelijking:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Op een tijdstip t_i:

— De massa van de teststof in een kleine hoeveelheid oplossing ((v_a^D)) wordt bepaald en de gedesorbeerde massa wordt berekend met behulp van de vergelijking:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— Bij het desorptie-evenwicht is $t_i = t_{eq}$ en derhalve $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Het desorptie-percentage D_{t_i} wordt berekend met behulp van de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{20}$$

Over een tijdsinterval (Δt_i):

Over elk tijdsinterval wordt de hoeveelheid gedesorbeerde stof als volgt berekend:

— voor het eerste tijdsinterval $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_o$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— voor het tweede tijdsinterval $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right)$$
en
$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— voor het n^e tijdsinterval $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{en}$$
$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \tag{23}$$

Ten slotte wordt het desorptiepercentage over elk tijdsinterval $D_{\Delta t_i}$ berekend met behulp van de vergelijking:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{24}$$

terwijl het desorptiepercentage op het tijdstip t_i (D_{t_i}) wordt berekend met de vergelijking:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{25}$$

▼B

De hier gebruikte parameters worden gedefinieerd als:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massa van de teststof die aan het bodemmonster blijft geadsorbeerd na de tijdsintervallen Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = massa van de teststof die wordt gedesorbeerd gedurende de tijdsintervallen $At_,$, Δt_2, ..., Δt_n (μg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = massa van de teststof die in een hoeveelheid oplossing ((v_a^D)) wordt gemeten op de tijdstippen t_1, t_2, ..., t_n (μg)

V_T = totaalvolume van de waterfase die tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment in contact met het bodemmonster is (cm^3)

$m^A{}_{aq}$ = massa van de teststof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht (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 = volume van het supernatans dat na het bereiken van het adsorptie-evenwicht uit de buis verwijderd is en is vervangen door een gelijk volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing (cm^3)

v_a^D = volume van het monster dat tijdens het volgens de seriële methode uitgevoerde desorptiekinetiek-experiment voor analysedoeleinden uit buis (i) wordt genomen (cm^3).

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Aanhangsel 6

ADSORPTIE/DESORPTIE IN DE BODEM: RAPPORTAGEFORMULIEREN

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur ..... °C

Geschiktheid van de analysemethode

Gewicht bodemmonster	g	
Droge massa in bodemmonster	g	
Volume $CaCl_2$-oplossing	cm^3	
Nominale concentratie eindoplossing	µg cm^{-3}	
Concentratie eindoplossing bij analyse	µg cm^{-3}	

Principe van de gebruikte analysemethode:

Kalibratie van de analysemethode:

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur ..... °C

Gevolgde analysemethodologie Indirect ☐ Parallel ☐ Serieel ☐

Direct ☐

Adsorptietest: testmonsters

	Symbool	Eenheid	Equilibratie-tijd		Equilibratie-tijd		Equilibratie-tijd		Equilibra-tietjjd	
Buis nr.										
Gewicht bodemmonster	—	g								
Droge massa bodemmonster	m_{soil}	g								
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	V_{ws}	cm^3								
Volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing voor equilibratie bodemmonster		cm^3								
Volume stockoplossing		cm^3								
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster	V_O	cm^3								
Beginconcentratie testoplossing	C_0	µg cm^{-3}								
Massa teststof aan begin van de test	m_0	µg								

▼B

	Symbool	Eenheid	Equilibratie-tijd		Equilibratie-tijd		Equilibratie-tijd		Equilibra-tietjjd	
Na schudden en centrifugeren										
INDIRECTE METHODE										
Parallelle methode										
Concentratie teststof in waterfase na correctie blanco	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Seriële methode										
Gemeten massa teststof in het analysemonster VV_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
DIRECTE METHODE										
Massa aan het bodemmonster geadsorbeerde teststof	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Berekening van de adsorptie										
Adsorptie	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Gemiddelde										
Adsorptie	K_d	cm^3 g^{-1}								
Gemiddelde										
Adsorptie	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Gemiddelde										

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

Adsorptietest: blanco- en controlebepalingen

	Symbool	Eenheid	Blanco		Blanco		Controle	
Buis nr.								
Gewicht bodemmonster		g					0	0
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)		cm^3					—	—
Toegevoegd volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing		cm^3						
Toegevoegd volume stockoplossing met teststof		cm^3	0	0				
Totaal volume waterfase (berekend)		cm^3					—	—

▼B

	Symbool	Eenheid	Blanco		Blanco		Controle	
Beginconcentratie van de teststof in de waterfase		µg cm^{-3}						

Na schudden en centrifugeren

Concentratie in waterfase		µg cm^{-3}						

NB: Indien nodig kolommen toevoegen.

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 1 2 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

Massabalans

	Symbool	Eenheid				
Buis nr.						
Gewicht bodemmonster	—	g				
Droge massa bodemmonster	m_{soil}	g				
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	V_{ws}	ml				
Volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing voor equili-bratie bodemmonster		ml				
Volume stockoplossing		cm^3				
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster	V_0	cm^3				
Beginconcentratie testoplossing	C_0	µg cm^{-3}				
Equilibratietijd	—	uur				

Na schudden en centrifugeren

Concentratie teststof in waterfase bij adsorptie-evenwicht na correctie blanco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Equilibratietijd	t_{eq}	uur				

Eerste verdunning met oplosmiddel

Volume verwijderde waterfase	V_{rec}	cm^3				
Volume toegevoegd oplosmiddel	ΔV	cm^3				

Eerste extractie met oplosmiddel

Signaal geanalyseerd in oplosmiddel	S_{E1}	var.				
Concentratie teststof in oplosmiddel	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symbool	Eenheid				
Massa van uit bodemmonster en wanden proefvat geëxtraheerde teststof	m_{E1}	µg				
Tweede verdunning met oplosmiddel						
Volume verwijderd oplosmiddel	ΔV_s	cm^3				
Volume toegevoegd oplosmiddel	$\Delta V'$	cm^3				
Tweede extractie met oplosmiddel						
Signaal geanalyseerd in oplosmiddel	S_{E2}	var.				
Concentratie teststof in oplosmiddel	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massa van uit bodemmonster en wanden proefvat geëxtraheerde teststof	m_{E2}	µg				
Totale massa in twee stappen geëxtraheerde teststof	m_E	µg				
Massabalans	MB	%				

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): .....%

Temperatuur: .....°C

Adsorptie-isothermen

	Symbool	Eenheid								
Buis nr.										
Gewicht bodemmonster	—	g								
Droge massa bodemmonster	E	g								
Volume water in afgewogen bodemmonster (berekend)	V_{ws}	cm^3								
Volume 0,01 M $CaCl_2$-oplossing voor equilibratie bodemmonster		cm^3								
Volume toegevoegde stockoplossing		cm^3								
Totaal volume waterfase in contact met bodemmonster (berekend)	V_0	cm^3								
Concentratie oplossing	C_0	µg cm^{-3}								
Equilibratietijd	—	uur								

▼B

	Symbool	Eenheid								
Na schudden en centrifugeren										
Concentratie teststof in waterfase na correctie blanco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatuur		°C								
Massa geadsorbeerde teststof per eenheid bodemmonster	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressie-analyse:

Waarde van: K_F^{ads}:

Waarde van l/n:

Regressiecoëfficiënt r^2:

Geteste stof:

Getest bodemmonster:

Gehalte van het bodemmonster aan droge massa (105 °C, 12 uur): ..... %

Temperatuur: ..... °C

Gevolgde analysemethodologie: Indirect ☐ Parallel ☐ Serieel ☐

Desorptietest

		Symbool	Eenheid	Tijdsinterval	Tijdsinterval	Tijdsinterval	Tijdsinterval
Buis nr. uit adsorptiestap							
Massa aan het bodemmonster geadsorbeerde stof bij adsorptie-evenwicht		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Verwijderd volume waterfase, vervangen door 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Totaal volume waterfase in contact met bodem	PM	V_o	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Massa stof die door onvolledige vervanging van het volume overblijft van het adsorptie-evenwicht		m_{aq}^{A}	µg				
Desorptiekinetiek							
Gemeten massa van de op het tijdstip t_j uit het bodemmonster gedesorbeerde stof		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volume van de oplossing die voor de meting van de teststof uit buis (i) is genomen	PM	V_r^{i}	cm^3				
	SM	v_a^{D}	cm^3				
Massa van de op het tijdstip t_i uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (berekend)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massa van de gedurende het tijdsinterval Δt_i uit het bodemmonster gedesorbeerde teststof (berekend)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbool	Eenheid	Tijdsin-terval	Tijdsin-terval	Tijdsin-terval	Tijdsin-terval
Desorptiepercentage						
Desorptie op het tijdstip t_i	D_{ti}	%				
Desorptie gedurende het tijdsinterval Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Schijnbare desorptiecoëfficiënt	K_{des}					

PM: Parallelle methode

SM: Seriële methode

▼B

C.19. RAMING VAN DE ADSORPTIECOËFFICIËNT (K_{oc}) AAN DE BODEM EN AAN RIOOLSLIB MET BEHULP VAN HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE (HPLC)

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van OESO TG 121 (2001).

1.1. INLEIDING

Het sorptiegedrag van stoffen ten opzichte van de bodem en van rioolslib kan worden beschreven aan de hand van parameters die langs experimentele weg worden bepaald met behulp van testmethode C.18. Een belangrijke parameter is de adsorptiecoëfficiënt, die wordt gedefinieerd als de verhouding tussen de concentratie van de stof in de bodem/het rioolslib en de concentratie van de stof in de waterfase bij het adsorptie-evenwicht. De genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt voor het organische-koolstofgehalte van de bodem K_{oc} is een bruikbare indicator van de bindingscapaciteit van een chemische stof aan organisch bodemmateriaal en rioolslib en maakt vergelijkingen mogelijk tussen verschillende chemische stoffen. Deze parameter kan worden geraamd door middel van correlaties met de oplosbaarheid in water en de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Bij de in deze test beschreven onderzoeksmethode wordt gebruikgemaakt van HPLC voor de raming van de adsorptiecoëfficiënt K_{oc} aan de bodem en aan rioolslib (8). De ramingen zijn betrouwbaarder dan die op basis van KSAR-berekeningen (9). Aangezien deze onderzoeksmethode gebaseerd is op ramingen, kan zij de bij testmethode C.18 gebruikte batch-evenwichtsexperimenten niet volledig vervangen. Toch kan de geraamde K_{oc} van nut zijn bij de keuze van geschikte testparameters voor adsorptie-/desorptieonderzoeken volgens testmethode C.18 door de berekening van K_d (verdelingscoëfficiënt) of K_f (adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich) volgens vergelijking 3 (zie punt 1.2).

1.2. DEFINITIES

K_d: De verdelingscoëfficiënt wordt gedefinieerd als de verhouding van evenwichtsconcentraties C van een opgeloste teststof in een tweefasensysteem dat bestaat uit een sorptiemiddel (bodem of rioolslib) en een waterfase; deze coëfficiënt is een waarde zonder dimensies wanneer de concentraties in beide fasen worden uitgedrukt in gewicht/gewicht. Indien de concentratie in de waterfase wordt uitgedrukt in gewicht/volume, zijn de eenheden $ml.g^{-1}$. K_d kan variëren naar gelang van de sorptiemiddeleigenschappen en concentratieafhankelijk zijn.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ or } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

Hierbij is:

C_{soil} = concentratie van de teststof in de bodem bij evenwicht ($\mu g \cdot g^{M}$)

C_{sludge} = concentratie van de teststof in slib bij evenwicht ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{aq} = concentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$).

▼B

K_f: De adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich wordt gedefinieerd als de concentratie van de teststof in de bodem of in rioolslib (x/m) wanneer de evenwichtsconcentratie C_{aq} in de waterfase gelijk is aan één; de eenheden zijn µg . g^{-1} sorptiemiddel. De waarde kan variëren naar gelang van de sorptiemiddeleigenschappen.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

Hierbij is:

x/m = hoeveelheid testof x (µg) die is geadsorbeerd aan de hoeveelheid sorptiemiddel m (g) bij evenwicht

l/n = helling van de adsorptie-isotherm volgens Freundlich

C_{aq} = concentratie van de teststof in de waterfase bij evenwicht (µg . ml^{-1})

$$\text{Bij} C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: De verdelingscoëfficiënt (K_d) of adsorptiecoëfficiënt volgens Freundlich (K_f) genormaliseerd voor het organische-koolstofgehalte (f_{oc}) van een sorptiemiddel; deze coëfficiënt is met name voor niet-geïoniseerde chemische stoffen een tamelijk nauwkeurige indicator voor de mate van adsorptie van een stof aan het sorptiemiddel en maakt vergelijkingen mogelijk tussen verschillende chemische stoffen. Afhankelijk van de dimensies van K_d en K_f kan K_{oc} dimensieloos zijn of de eenheden ml . g^{-1} of µg . g^{-1} organisch materiaal hebben.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}} \left(\text{dimensieloos of ml} \cdot g^{-1} \right) \text{ of } \frac{\text{Kf}}{\text{foc}} \left(\mu g \cdot g^{-1} \right) \quad (3)$$

Het verband tussen K_{oc} en K_d is niet altijd lineair; K_{oc}-waarden kunnen dan ook verschillen van bodemtype tot bodemtype, hoewel zij nauwelijks uiteenlopen vergeleken met K_d-of K_f-waarden.

De adsorptiecoëfficiënt (K_{oc}) wordt afgeleid uit de capaciteitsfactor (k') aan de hand van een ijkcurve van log k' versus log K_{oc} van de geselecteerde referentieverbindingen.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

Hierbij is:

t_R = HPLC-retentietijd van test- en referentiestof (minuten)

t_0 = dode tijd HPLC (minuten) (zie punt 1.8.2).

P_{ow}: De verdelingscoëfficiënt octanol/water wordt gedefinieerd als de verhouding van de concentraties van opgeloste stof in n-octanol en water; dit is een dimensieloze waarde

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coctanol}}{\text{Caq}} (= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Voordat de methode wordt gebruikt, moeten de structuurformule, de zuiverheid en de dissociatieconstante (indien van toepassing) bekend zijn. Gegevens over de oplosbaarheid in water en organische oplosmiddelen, de verdelingscoëfficiënt octanol/water en de hydrolysekenmerken zijn nuttig.

▼B

Om de gemeten HPLC-retentiegegevens van een teststof te correleren aan de adsorptiecoëfficiënt K_{oc} van die stof, moet een ijkgrafiek van log K_{oc} versus log k' worden getekend. Er moet gebruik worden gemaakt van minimaal zes referentiepunten, waarvan ten minste één boven en ten minste één onder de verwachte teststofwaarde dient te liggen. De methode zal veel nauwkeuriger zijn als er referentiestoffen worden gebruikt die qua structuur verwant zijn aan de teststof. Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, dient de gebruiker zelf geschikte ijkstoffen te kiezen. In dat geval moet een meer algemene reeks van qua structuur heterogene stoffen worden gekozen. Voor rioolslib zijn toegestane stoffen en K_{oc}-waarden opgenomen in tabel 1, voor de bodem in tabel 3 (zie aanhangsel). De eventuele keuze van andere ijkstoffen moet worden onderbouwd.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er wordt gebruikgemaakt van analytische HPLC-kolommen die zijn gevuld met een in de handel verkrijgbare vaste cyaanpropvifase die lipofiele en polaire bestanddelen bevat. Verder wordt een op een silicamatrix gebaseerde gematigd polaire stationaire fase gebruikt:

— 0 — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
Silica	Arolaire spacer	Polair bestanddeel

Het principe van de testmethode is hetzelfde als dat van testmethode A.8 (verdelingscoëfficiënt, HPLC-methode). Op het moment dat de teststof samen met de mobiele fase door de kolom stroomt, gaat die stof een interactie aan met de stationaire fase. De teststof wordt vertraagd als gevolg van de verdeling tussen mobiele en stationaire fasen. De tweeledige samenstelling van de stationaire fase — polaire en apolaire locaties — maakt dezelfde soort interactie tussen polaire en apolaire groepen van een molecuul mogelijk als bij organisch materiaal in bodem- of rioolslibmatrices. Op basis hiervan kan er een verband worden gelegd tussen de retentietijd in de kolom en de adsorptiecoëfficiënt aan organisch materiaal.

Met name bij polaire stoffen heeft de pH een belangrijke invloed op het sorptiegedrag. Bij landbouwgrond en reservoirs van rioolwaterzuiveringsinstallaties schommelt de pH gewoonlijk tussen 5,5 en 7,5. Voor ioniseerbare stoffen moeten er twee tests worden verricht met zowel geïoniseerde als niet-geioniseerde vormen in geschikte bufferoplossingen, doch alleen in gevallen waarin ten minste 10 % van de testverbinding uiteen zal vallen binnen pH 5,5 tot 7,5.

Aangezien de evaluatie uitsluitend plaatsvindt op basis van het verband tussen de retentie in de HPLC-kolom en de adsorptiecoëfficiënt, is er geen kwantitatieve analysemethode nodig en behoeft slechts de retentietijd te worden bepaald. Indien er een geschikte reeks referentiestoffen beschikbaar is en de methode benut wordt onder standaard experimentele omstandigheden, vormt die methode een snelle en efficiënte manier om de adsorptiecoëfficiënt K_{oc} te ramen.

1.5. TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De HPLC-methode kan worden gebruikt voor chemische stoffen (al dan niet gelabeld) waarvoor een geschikt detectiesysteem (bijv. spectrofotometer, radioactiviteitsdctector) beschikbaar is en die voldoende stabiel zijn gedurende het experiment. De methode kan zeer bruikbaar zijn voor chemische stoffen die moeilijk op een andere manier experimenteel te onderzoeken zijn (zoals vluchtige stoffen; stoffen die niet in water oplosbaar zijn in een concentratie die analyseerbaar is; stoffen met een sterke affiniteit tot het oppervlak van incubatie-systemen). De methode kan worden gebruikt voor mengsels die niet-opgeloste elutiebanden opleveren. In dat geval moeten de onder- en bovengrenzen van de log K_{oc}-waarden van de verbindingen van het testmengsel worden vermeld.

▼B

Hoewel onzuiverheden soms problemen kunnen opleveren voor de interpretatie van HPLC-resultaten, zijn zij van ondergeschikt belang zolang de teststof duidelijk langs analytische weg kan worden geïdentificeerd en van de onzuiverheden kan worden gescheiden.

De methode is geldig verklaard voor de stoffen die zijn opgenomen in tabel 1 van het aanhangsel en is tevens gebruikt voor een aantal andere chemische stoffen, die behoren tot de volgende chemische categorieën:

— aromatische aminen (bijv. trifluralin, 4-chlooraniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naftylamine);

— aromatische carbonzure esters (bijv. benzoëzure methylester, 3,5-dinitrobenzoëzure ethylester);

— aromatische koolwaterstoften (bijv. tolueen, xyleen, ethylbenzeen, nitrobenzeen);

— aryloxyfenoxypropionzure esters (bijv. diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl);

— schimmelwerende middelen, benzimidazol en imidazol (bijv. carbendazim, fuberidazol, triazoxide);

— carbonzure amiden (bv. 2-chloorbenzamide. N.N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-methyl-benzamide, 2-nitrobenzamide. 3-nitrobenzamide);

— chloorkoolwaterstoffen (bv. endosulfan, DDT, hexachloorbenzeen, quintozeen, 1,2,3-trichloorbenzeen);

— organofosfor-insecticiden (bv. azinfos-methyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos);

— fenolen (bijv. fenol. 2-nitrofenol. 4-nitrofenol. pentachloorfenol. 2,4,6-trichloorfenol, 1-naftol);

— fenylureumderivaten (bv. isoproturon monolinuron, pencycuron);

— igmentkleurstoffen (bv. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

— polyaromatische koolwaterstoffen (bv. acenafteen, naftaleen);

— 1,3,5-triazine-herbiciden (bv. prometryn, propazin, simazin, terbutryn);

— triazoolderivaten (bv. tebuconazol, triadimefon, triadimenol, triapentenol).

De methode kan niet worden gebruikt voor stoffen die met het eluent of de stationaire fase reageren, en ook niet voor stoffen die een specifieke interactie aangaan met anorganische bestanddelen (bv. vorming van clustercomplexen met kleimineralen). Het is mogelijk dat de methode niet werkt bij oppervlakteactieve stoffen, anorganische verbindingen en matige of sterke organische zuren en basen. Er kunnen log K_{oc}-waarden van 1,5 tot 5,0 worden bepaald. Ioniseerbare stoffen moeten worden gemeten met behulp van een gebufferde mobiele fase, waarbij er wel op moet worden gelet dat precipitatie van bufferbestanddelen of van de teststof wordt voorkomen.

▼B

1.6. KWALITEITSCRITERIA

1.6.1. **Nauwkeurigheid**

Normaliter kan de adsorptiecoëfficiënt van een teststof worden geraamd tot binnen ± 0,5 log eenheid van de waarde die is bepaald met behulp van de batch-evenwichtsmethode (zie tabel 1 van het aanhangsel). Een hogere nauwkeurigheid is haalbaar als de gebruikte referentiestoffen qua structuur verwant zijn aan de teststof.

1.6.2. **Herhaalbaarheid**

De bepalingen moeten ten minste in duplo worden uitgevoerd. De uit afzonderlijke metingen afgeleide waarden van log K_{OC} moeten binnen een bereik van 0,25 log eenheid vallen.

1.6.3. **Reproduceerbaarheid**

De ervaring die tot nu toe met de methode is opgedaan, ondersteunt de geldigheid ervan. Uit een onderzoek naar de HPLC-methode, waarbij gebruik werd gemaakt van 48 stoffen (merendeels pesticiden) waarvoor betrouwbare gegevens over K_{oc} in de bodem beschikbaar waren, kwam een correlatiecoëfficiënt van R = 0,95 naar voren (10) (11).

Er is een vergelijkingstest onder elf laboratoria gehouden ter verbetering en validatie van de methode (12). De resultaten zijn vermeld in tabel 2 van het aanhangsel

1.7. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.7.1. **Voorbereidende raming van de adsorptiecoëfficiënt**

Daar de verdelingscoëfficiënt octanol/water P_{ow} (= K_{ow}) en, in zekere mate, de oplosbaarheid in water met name bij niet-geïoniseerde stoffen kunnen worden gebruikt als indicatoren van de mate van adsorptie, kunnen zij tevens worden benut voor voorbereidende bereikbepaling. Er is een aantal bruikbare correlaties gepubliceerd voor verschillende groepen chemische stoffen (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Apparatuur**

Vereist is een vloeistofchromatograaf met een pulsloze pomp en een geschikt detectieapparaat. Het gebruik van een injectieklep met inicctielus wordt aanbevolen. Er moet gebruik worden gemaakt van in de handel verkrijgbare chemisch gebonden cyaanpropylharsen op silicabasis (bv. Hypersil en Zorbax CN). Er mag een voorkolom van hetzelfde materiaal tussen het injectiesysteem en de analysekolom worden geplaatst. Kolommen van verschillende leveranciers kunnen aanzienlijk uiteenlopen qua scheidingsefficiëntie. Als richtsnoer moeten de volgende capaciteitsfactoren k' worden gehaald: log k' > 0,0 voor log K_{OK} = 3,0 en log k' > 0,4 voor log K_{oc} = 2,0 bij gebruik van methanol water 55/45 % als mobiele fase.

1.7.3. **Mobiele fasen**

Van de diverse geteste mobile rasen worden de twee volgende aanbevolen:

— methanol/water (55/45 % v/v);

— methanol/0,01 M citraatbuffer pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Er wordt gebruikgemaakt van een combinatie van methanol van HPLC-kwaliteit met gedestilleerd water of citraatbuffer voor de bereiding van het uitspoeloplosmiddel. Het mengsel wordt vóór gebruik ontgast. Er moet isocratische elutie worden toegepast. Als methanol/water-mengsels niet geschikt zijn kunnen ook andere organisch-oplosmiddel/water-mengsels worden uitgeprobeerd, zoals ethanol/water- of acetonitril/water-mengsels. Voor ioniseerbare verbindingen wordt het gebruik van een bufferoplossing aanbevolen om de pH te stabiliseren. Zoutprecipitatie en achteruitgang van de kolom, verschijnselen die zich kunnen voordoen bij sommige organische fase/buffermengsels, moeten worden voorkomen.

Er mogen geen additieven zoals ionenpaarreagentia worden gebruikt, omdat die van invloed kunnen zijn op de sorptie-eigenschappen van de stationaire fase. Dergelijke veranderingen van de stationaire fase kunnen onomkeerbaar zijn. Daarom moeten experimenten waarbij additieven worden gebruikt, uitgevoerd worden op gescheiden kolommen.

1.7.4. **Oplossingen**

De test- en referentiestoffen moeten worden opgelost in de mobiele fase.

1.8. UITVOERING VAN DE TEST

1.8.1. **Testomstandigheden**

De temperatuur tijdens de metingen moet worden geregistreerd. Temperatuurregeling van het kolomcompartiment wordt sterk aanbevolen teneinde constante omstandigheden te garanderen tijdens het ijken en ramen en het meten van de teststof.

1.8.2. **Bepaling van de dode tijd t_0**

Voor deze bepaling kunnen twee methoden worden gebruikt (zie ook punt 1.2).

1.8.2.1. *Bepaling van de dode tijd t_0 door middel van een homologe reeks*

Gebleken is dat deze procedure betrouwbare en gestandaardiseerde t_o-waarden oplevert. Zie voor nadere bijzonderheden testmethode A.8, Verdelingscoëfficiënt (n-octanol/water), HPLC-methode.

1.8.2.2. *Bepaling van de dode tijd t_0 door middel van inerte stoffen waarvan geen retentie door de kolom plaatsvindt*

Deze techniek is gebaseerd op de injectie van oplossingen van formamide, ureum of natriumnitraat. De metingen moeten ten minste in duplo worden verricht.

1.8.3. **Bepaling van de retentietijden t_R**

De referentiestoffen moeten worden gekozen zoals beschreven in punt 1.3. Ze mogen als gemengde standaard worden geïnjecteerd om hun retentietijden te bepalen, mits aangetoond is dat de retentietijd van elke referentiestandaard niet wordt beïnvloed door de aanwezigheid van de andere referentiestandaarden. Er dient regelmatig en in ieder geval tweemaal per dag te worden geijkt teneinde rekening te kunnen houden met onvoorziene veranderingen in de prestaties van de kolom. Het verdient de voorkeur de ijkinjecties uit te voeren vóór en na de injecties van de testsrof om er zeker van te zijn dat de retentietijden niet zijn gewijzigd. De teststoffen worden afzonderlijk in zo klein mogelijke hoeveelheden geïnjecteerd (om overlading van de kolom te voorkomen) en de retentietijden ervan u-orden bepaald.

▼B

Om het vertrouwen in de meting te vergroten moeten de bepalingen ten minste in duplo worden verricht. De uit afzonderlijke metingen afgeleide waarden van log K_{oc} moeten binnen een bereik van 0,25 log eenheid vallen.

1.8.4. **Evaluatie**

Uit de dode tijd t_0 en de retentietijden t_R van de gekozen referentiestoffen worden de capaciteitsfactoren k' berekend volgens vergelijking 4 (zie punt 1.2). Daarna worden de log k'-gegevens van de referentiestoffen uitgezet tegen hun in de labellen 1 en 3 van het aanhangsel vermelde log K_{oc}-waarden die zijn verkregen bij batch-evenwichtsexperimenten. Aan de hand van deze curve wordt vervolgens de log k'-waarde van een teststof gebruikt om de log K_{oc} -waarde van die stofte bepalen. Als uit de actuele resultaten blijkt dat de log K_{oc} van de teststof buiten het ijkbereik valt moet de test worden herhaald met andere, geschiktere referentiestoffen.

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

In het rapport moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

— identiteit van test- en referentiestoffen en hun zuiverheid, alsmede pK_a-waarden voorzover relevant;

— beschrijving van apparatuur en bedrijfsomstandigheden, bv. type en maat van analysekolom en voorkolom, detectieapparaat, mobiele fase (verhouding tussen bestanddelen en pH), temperatuurbereik tijdens de metingen;

— dode tijd en methode die wordt gebruikt voor de bepaling daarvan;

— in de kolom gebrachte hoeveelheden test- en referentiestoffen;

— retentietijden van referentieverbindingen die voor ijkdoeleinden worden gebruikt;

— nadere gegevens over de aangebrachte regressielijn (log k' vs. log K_{oc}) en een grafiek van die lijn;

— gemiddelde retentiegegevens en geraamde log K_{oc}-waarde van de testverbinding;

— chromatogrammen.

3. **REFERENTIES**

(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, 1 67.

(3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1039.

(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, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment.]. Environm. Sci, Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V.H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. S31-832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kordel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. 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), pp. 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, pp. 28 5-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient or, soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Aanhangsel

Tabel 1

Vergelijking van K_{oc}-waarden voor bodem en rioolslib en volgens de HPLC-screeningmethode (1) (2) berekende waarden

Stof	CAS-nr.	Log $K_{o;}$ rioolslib	Log K_{oc} HPLC	Δ	Log K_{oc} bodem	Log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	1 50-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreen	S5-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoëzure fenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	5 5-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Aceetanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	6 2-5 3-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichlooraniline	9 5-S2-9	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), blz. 121-1 28.
(2) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), blz. 107-119.

Tabel 2

Resultaten van een vergelijkende laboratoriumtest (elf laboratoria) verricht ter verbetering en validatie van de HPLC-methode (1)

Stof	CAS-nr.	Log K_{oc}	K_{oc}	Log K_{oc}
		(OESO 106)	(HPLC-methode)	
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	3 30-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	5 5-38-9	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) -*blz.* 1373-1384.

▼B

Tabel 3

Aanbevolen referentiestoffen voor de HPLC-screeningmethode op basis van bodemadsorptiegegevens

Referentiestof	CAS-nr.	Gemiddelde log K_{ow} -waarden van batchevenwicht	Aantal K_{oc}-gegevens	Log S.D.	Bron
Aceetanilide	103-S4-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-dimethylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Methylbenzamide	619-5 5-6	1,78	3	1,76	[a]
Methylbenzoaat	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-Nitrobenzamide	64 5-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofos	2401 7-47-S	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	3 30-5 5-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftaleen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Trichloorbenzeen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fenthion	5 5-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-1 1-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantreen	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen. W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemoshere 22. blz. 285-304.
[c] Door de bedrijfstak verstrekte gegevens.

▼M7

C.20. *DAPHNIA MAGNA* VOORTPLANTINGSTEST

INLEIDING

Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 211 (2012) van de OESO. Testrichtlijnen van de OESO worden periodiek in het licht van de wetenschappelijke vorderingen getoetst. Testrichtlijn 211 betreffende de voortplantingstest is voortgekomen uit testrichtlijn 202, deel II, *Daphnia* sp. voortplantingstest (1984). Er werd algemeen erkend dat gegevens van tests die zijn uitgevoerd volgens testrichtlijn 202, wisselend kunnen zijn. Dit heeft geleid tot aanzienlijke inspanningen om de oorzaken van deze variabiliteit te identificeren, teneinde een betere testmethode op te stellen. Testrichtlijn 211 is gebaseerd op de uitkomsten van deze onderzoeksactiviteiten, ringtests en valideringsstudies die zijn uitgevoerd in 1992 (1), 1994 (2) en 2008 (3).

De belangrijkste verschillen tussen de oorspronkelijke versie (TG 202, 1984) en de tweede versie (TG 211, 1998) van de testrichtlijn betreffende de voortplantingstest zijn:

— de te gebruiken soort is *Daphnia magna*;

— de test duurt 21 dagen;

— voor semistatische tests is het aantal dieren dat voor elke testconcentratie moet worden gebruikt, verlaagd van ten minste 40, bij voorkeur verdeeld in vier groepen van 10 dieren, tot ten minste 10 dieren die apart worden gehouden (hoewel voor doorstroomtests andere opzetten kunnen worden gebruikt);

— er zijn specifiekere aanbevelingen gedaan betreffende het testmedium en de voedingsomstandigheden.

— De belangrijkste verschillen tussen de tweede versie van de testrichtlijn betreffende de voortplantingstest (TG 211, 1998) en deze versie zijn:

— er is een aanhangsel 7 toegevoegd waarin de procedures worden beschreven voor de identificatie, indien nodig, van het geslacht van neonaten. Overeenkomstig eerdere versies van deze testmethode is de geslachtsverhouding een facultatief eindpunt;

— de responsvariabele aantal levende nakomelingen per overlevend moederdier is aangevuld met een extra responsvariabele voor de voortplanting van *Daphnia*, namelijk het totale aantal levende nakomelingen aan het eind van de test per *Daphnia*-moederdier aan het begin van de test, waardoor onopzettelijke en/of onbedoelde mortaliteit van moederdieren van de analyse wordt uitgesloten. Het doel van de toegevoegde responsvariabele is deze responsvariabele in overeenstemming te brengen met andere voortplantingstestmethoden met ongewervelden. Bovendien is het, wat deze responsvariabele betreft, mogelijk om in deze testmethode een bron van fouten te elimineren, namelijk het effect van onbedoelde en/of onopzettelijke mortaliteit van moederdieren, mocht deze tijdens de blootstellingsperiode optreden;

— er zijn aanvullende statistische richtsnoeren opgenomen voor de opzet van de test en voor de behandeling van de resultaten, zowel voor de ECx (bv. EC10 of EC50) als voor de NOEC/LOEC-benadering;

— er is een limiettest ingevoerd.

De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

Het doel van de test is in de eerste plaats het beoordelen van het effect van chemicaliën op het voortplantingsresultaat van *Daphnia magna*. Jonge vrouwelijke *Daphnia* (de moederdieren), die bij aanvang van de test nog geen 24 uur oud zijn, worden daartoe blootgesteld aan de teststof die aan het water is toegevoegd in een aantal uiteenlopende concentraties. De test duurt 21 dagen. Aan het eind van de test wordt het totale aantal levende nakomelingen beoordeeld. Het voortplantingsresultaat van de moederdieren kan ook op andere manieren worden uitgedrukt (bijvoorbeeld in het aantal levende nakomelingen dat per dag en per dier is voortgebracht vanaf de eerste dag dat er nakomelingen werden waargenomen), maar die moeten dan wel worden vermeld naast het totale aantal

▼M7

levende nakomelingen dat aan het eind van de test werd voortgebracht. Vanwege de specifieke opzet van de semistatische test vergeleken met andere voortplantingstestmethoden met ongewervelden, kan ook het aantal levende nakomelingen voor elk afzonderlijk moederdier worden geteld. Dit maakt het mogelijk om, anders dan bij andere voortplantingstestmethoden met ongewervelden, de nakomelingen van een moederdier dat tijdens de testperiode onopzettelijk of onbedoeld sterft, van de gegevensbeoordeling uit te sluiten. Als zich bij blootgestelde replicaties mortaliteit van moederdieren voordoet, moet daarom worden gekeken of de mortaliteit een concentratie-effectpatroon vertoont, bijvoorbeeld of een regressie van de respons uitgezet tegen de concentratie van de teststof een significant verband met een positieve helling laat zien (hiervoor kan een statistische toets zoals de trendtoets van Cochran-Armitage worden gebruikt). Indien de mortaliteit geen concentratie-effectpatroon vertoont, moeten de replicaties met mortaliteit van de moederdieren van de analyse van het testresultaat worden uitgesloten. Indien de mortaliteit wel een concentratie-effectpatroon vertoont, moet de mortaliteit van de moederdieren worden beschouwd als een effect van de teststof en mogen de replicaties niet van de analyse worden uitgesloten. Indien het moederdier tijdens de test sterft, d.w.z. ofwel onopzettelijk ten gevolge van een verkeerde behandeling of een ongeluk, ofwel onbedoeld als gevolg van een onverklaard incident dat geen verband houdt met het effect van de teststof, of indien het dier van het mannelijk geslacht blijkt te zijn, wordt de replicatie van de analyse uitgesloten (zie verder in punt 51). Het toxische effect van de teststof op het voortplantingsresultaat wordt uitgedrukt als ECx door met niet-lineaire regressie een passend model aan de gegevens te passen om de concentratie te schatten die zou leiden tot een afname van x % van het voortplantingsresultaat, of anders als de NOEC/LOEC-waarde (4). *De laagste gebruikte effectconcentratie (bv. EC_{10}) moet bij voorkeur in het bereik van de testconcentraties liggen, wat betekent dat deze waarde wordt berekend door interpolatie, en niet door extrapolatie.*

Het aantal overlevende moederdieren en de tijd die nodig was voor het voortbrengen van het eerste broedsel, moeten eveneens worden vermeld. Andere effecten van de teststof op parameters zoals de groei (bv. lengte), en de mogelijke intrinsieke snelheid van de populatietoename, kunnen ook worden onderzocht (zie punt 44).

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

De resultaten van een test voor acute toxiciteit (zie hoofdstuk C.2 van deze bijlage: *Daphnia* sp. — acute immobilisatietest) uitgevoerd met *Daphnia magna* kunnen bruikbaar zijn bij de selectie van een geschikt bereik van testconcentraties voor de voortplantingstests. De oplosbaarheid in water en de dampdruk van de teststof dienen bekend te zijn en er moet een betrouwbare analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen met een gerapporteerde recovery-capaciteit en bepaalbaarheidsgrens beschikbaar zijn.

De informatie over de teststof die nuttig kan zijn om de testomstandigheden te bepalen, omvat bijvoorbeeld de structuurformule, zuiverheid van de chemische stof, stabiliteit in licht, stabiliteit onder de testomstandigheden, pKa, P_{ow} en resultaten van een test op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (zie hoofdstuk C.4 (Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid) en hoofdstuk C.29 (Gemakkelijke biologische afbreekbaarheid — CO_2 in gesloten vaten) van deze bijlage).

GELDIGHEID VAN DE TEST

Wil de test geldig zijn, dan moet in de controlegroep(en) aan de volgende prestatiecriteria worden voldaan:

— de mortaliteit van de moederdieren (vrouwelijke *Daphnia*) mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 20 %;

— het gemiddelde aantal levende nakomelingen dat is voortgebracht per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven is, is $\geq$ 60.

Opmerking: hetzelfde geldigheidscriterium (20 %) kan ook worden gebruikt voor onopzettelijke en onbedoelde mortaliteit van moederdieren, zowel voor de controles als voor elk van de testconcentraties.

▼M7

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

Testvaten en andere apparaten die in aanraking komen met de testoplossingen, mogen alleen uit glas of een ander chemisch inert materiaal bestaan. Normaal gesproken zijn de testvaten glazen bekers.

Daarnaast zal (een deel van) de volgende apparatuur nodig zijn:

— zuurstofmeter (met micro-elektrode of andere geschikte voorzieningen voor de meting van opgeloste zuurstof in monsters met een klein volume);

— adequate apparatuur voor de temperatuurbeheersing;

— pH-meter;

— uitrusting voor de bepaling van de hardheid van water;

— uitrusting voor de bepaling van de totale organische koolstofconcentratie (TOC) van water of uitrusting voor de bepaling van het chemisch zuurstofverbruik (COD);

— adequate apparatuur voor de regeling van het lichtregime en de meting van de lichtintensiteit.

Testorganismen

De testsoort is *Daphnia magna* Strauss ([1]).

De kloon moet bij voorkeur zijn geïdentificeerd door middel van bepaling van het genotype. Uit onderzoek (1) is gebleken dat de voortplantingsprestatie van kloon A (die afkomstig is van IRCHA in Frankrijk) (5) consequent voldoet aan het geldigheidscriterium van een gemiddelde van ≥ 60 levende nakomelingen per overlevend moederdier indien gekweekt onder de in deze testmethode beschreven voorwaarden. Desalniettemin zijn andere klonen aanvaard mits de *Daphnia*-cultuur aantoonbaar voldoet aan de geldigheidscriteria voor de test.

Bij aanvang van de test mogen de dieren nog geen 24 uur oud zijn; ze mogen geen eerste nakomelingen zijn. Ze moeten afkomstig zijn van een gezonde stam (d.w.z. zonder tekenen van stress zoals hoge mortaliteit, aanwezigheid van mannelijke dieren en ephippia, vertraging bij het voortbrengen van het eerste broedsel, verkleurde dieren enz.). De stamdieren moeten onder soortgelijke kweekomstandigheden (licht, temperatuur, medium, voeding en aantal dieren per eenheid) worden gehouden als die welke van toepassing zijn tijdens de test. Indien het tijdens de test te gebruiken *Daphnia*-kweekmedium afwijkt van het medium voor de gangbare *Daphnia*-cultuur, verdient het aanbeveling een aan de test voorafgaande acclimatiseringsperiode van normaliter circa drie weken (d.w.z. één generatie aan te houden om stress bij de moederdieren te voorkomen.

Testmedium

Het verdient aanbeveling om bij deze test gebruik te maken van een volledig beschreven medium. Op die manier kan het gebruik van additieven vermeden worden (zoals zeewier, grondextract), die moeilijk te typeren zijn, en kan er beter gestandaardiseerd worden tussen laboratoria. De media Elendt M4 (6) en M7 (zie aanhangsel 2) zijn hiertoe geschikt gebleken. Desalniettemin zijn andere media (bijvoorbeeld (7) en (8)) aanvaardbaar mits de prestaties van de *Daphnia*-cultuur aantoonbaar voldoen aan de geldigheidscriteria voor de test.

([1]) Andere Daphnia-soorten zijn eveneens toegestaan, mits ze aan de toepasselijke geldigheidscriteria voldoen (het geldigheidscriterium met betrekking tot het voortplantingsresultaat bij de controlegroepen moet relevant zijn voor alle soorten). Indien andere Daphniasoorten worden gebruikt, moeten deze duidelijk worden geïdentificeerd en moet hun gebruik worden verantwoord.

▼M7

Indien gebruik wordt gemaakt van media met niet-beschreven additieven, moeten die additieven niet alleen duidelijk worden gespecificeerd, maar moeten er ook gegevens in het testverslag worden opgenomen over de samenstelling, in het bijzonder met betrekking tot het koolstofgehalte, aangezien dit een bijdrage kan leveren aan de voeding. Het verdient aanbeveling de totale organische koolstof (TOC) en/of het chemisch zuurstofverbruik (COD) van het stampreparaat van het organische additief te bepalen en een schatting te maken van de resulterende bijdrage aan TOC/COD in het testmedium. Voorts zijn de TOC-niveaus in het medium (d.w.z. vóór toevoeging van de algen) bij voorkeur lager dan 2 mg/l (9).

In geval van teststoffen met metalen moet worden onderkend dat de eigenschappen van het testmedium (bijvoorbeeld hardheid, chelaatvormend vermogen) van invloed kunnen zijn op de toxiciteit van de teststof. Een volledig beschreven medium is dan ook wenselijk. Op dit moment zijn er echter slechts twee volledig beschreven media waarvan bekend is dat ze geschikt zijn voor langetermijnkweek van *Daphnia magna*: Elendt M4 en M7. Beide media bevatten de chelaatvormer EDTA. Uit werkzaamheden is naar voren gekomen (2) dat de „klaarblijkelijke toxiciteit" van cadmium in de regel lager is wanneer de voortplantingstest wordt uitgevoerd in M4- en M7-media dan bij uitvoering in media die geen EDTA bevatten. M4 en M7 worden derhalve niet aanbevolen voor metaalhoudende teststoffen, terwijl ook het gebruik van andere media die bekende chelaatvormers bevatten, vermeden dient te worden. Het kan raadzaam zijn om voor metaalhoudende chemische stoffen een ander medium te gebruiken, zoals volgens ASTM geregenereerd hard schoon water (9), dat geen EDTA bevat. Deze combinatie van volgens ASTM geregenereerd hard schoon water en zeewierextract (10) is ook geschikt voor langetermijnkweek van *Daphnia magna* (2).

Het gehalte aan opgeloste zuurstof moet aan het begin en tijdens de test hoger zijn dan 3 mg/l. De pH moet liggen tussen 6 en 9 en normaliter mag er geen variatie van meer dan 1,5 eenheid optreden bij welke test dan ook. Een hardheid van meer dan 140 mg/l (als $CaCO_3$) wordt aanbevolen. Uit tests op dit niveau en de hierboven beschreven tests is naar voren gekomen dat de voortplantingsprestatie voldoet aan de geldigheidscriteria (11) (12).

Testoplossingen

Testoplossingen van de gekozen concentraties worden gewoonlijk bereid door verdunning van een stamoplossing. Stamoplossingen moeten, indien mogelijk zonder gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen, bij voorkeur worden bereid door mengen of schudden van de teststof in het testmedium met mechanische middelen, zoals door te schudden of te roeren of met ultrasone trillingen of andere passende methoden. Bij voorkeur worden de testsystemen vóór de introductie van de testorganismen blootgesteld aan concentraties van de teststof die in het onderzoek worden gebruikt, zolang als nodig is om het behoud van stabiele blootstellingsconcentraties aan te tonen. Indien de teststof moeilijk oplosbaar is in water, moeten de procedures worden gevolgd die zijn beschreven in de OESO-leidraad voor het omgaan met moeilijke stoffen (13). Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen moet worden vermeden, maar kan in bepaalde gevallen toch nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie voor dosering te verkrijgen.

De test moet worden uitgevoerd met zowel de testconcentraties als een verdunningswatercontrole met voldoende replicaties en, indien niet te vermijden, een oplosmiddelcontrole met voldoende replicaties. In de test mogen uitsluitend oplosmiddelen of dispergeermiddelen worden gebruikt waarvoor onderzoek heeft aangetoond dat ze geen significant effect of slechts een minimaal effect op de responsvariabele hebben. Voorbeelden van geschikte oplosmiddelen (bv. aceton, ethanol, methanol, dimethylformamide en triëthyleenglycol) en dispergeermiddelen (bv. Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % en HCO-40) worden gegeven in (13). Wanneer een oplosmiddel of dispergeermiddel wordt gebruikt, mag de uiteindelijke concentratie ervan niet groter zijn dan 0,1 ml/l (13) en moet deze

▼M7

concentratie in alle testvaten, behalve de verdunningswatercontrole, dezelfde zijn. Er moet echter al het mogelijke worden gedaan om de concentratie van het oplosmiddel zo laag mogelijk te houden.

PROCEDURE

Blootstellingsomstandigheden

Duur

De test duurt 21 dagen.

Densiteit

De moederdieren worden afzonderlijk, d.w.z. één per testvat, in de vaten ondergebracht met 50 tot 100 ml medium in elk vat (voor *Daphnia magna* kan mogelijk worden volstaan met kleinere volumes, vooral voor kleinere *Daphnia*-soorten zoals *Ceriodaphnia dubia*), tenzij het gebruik van een doorstroomsysteem noodzakelijk is voor de test.

Soms kunnen grotere volumes nodig zijn om te voldoen aan de eisen van de analytische procedure die wordt gebruikt voor de bepaling van de teststofconcentratie, hoewel het bundelen van replicatieonderzoeken voor chemische analyse ook is toegestaan. Bij gebruik van volumes van meer dan 100 ml dient de hoeveelheid voer die aan de *Daphnia* wordt gegeven, eventueel te worden verhoogd om ervoor te zorgen dat er voldoende voer aanwezig is en dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria.

Proefdieren

Bij semistatische tests ten minste tien dieren afzonderlijk gehouden bij elke testconcentratie en ten minste tien dieren afzonderlijk gehouden in de controlereeks.

Wat doorstroomtests betreft, is gebleken dat een aantal van 40, in vier groepen van tien verdeelde dieren bij elke testconcentratie geschikt is (1). Een kleiner aantal testorganismen is toegestaan; een minimum van 20 dieren per concentratie verdeeld over twee of meer replicatieonderzoeken met een gelijk aantal dieren (bijvoorbeeld vier replicatieonderzoeken met elk vijf watervlooien) wordt aanbevolen. Opgemerkt dient te worden dat het bij tests waar dieren in groepen worden gehouden, niet mogelijk is nakomelingen van de statistische analyse uit te sluiten als zich na aanvang van de voortplanting onbedoelde/onopzettelijke mortaliteit van moederdieren voordoet. In die gevallen moet het voortplantingsresultaat daarom worden uitgedrukt in het „totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat bij aanvang van de test aanwezig was”.

De behandelingen moeten alle plaatsvinden in een speciaal voor de desbetreffende behandeling bestemd testvat en de testvaten moeten daarna op willekeurige wijze worden behandeld. Het nalaten hiervan kan een vertekend beeld geven dat uitgelegd zou kunnen worden als een concentratie-effect. In het bijzonder moet hierbij gedacht worden aan de mogelijkheid dat, wanneer met experimentele units wordt omgegaan in volgorde van behandeling of concentratie, bepaalde met tijd verband houdende effecten, zoals vermoeidheid bij de uitvoerder van het experiment of andere fouten, kunnen leiden tot het vaststellen van grotere effecten bij de hogere concentraties. Bovendien zou overwogen moeten worden de test af te breken als de testresultaten beïnvloed kunnen worden door een conditie waarvan reeds sprake was bij aanvang van de test of door een omgevingsconditie, zoals de plaats in het laboratorium.

Voeding

Bij semistatische tests moet er bij voorkeur dagelijks worden gevoerd, doch in ieder geval driemaal per week (d.w.z. naar gelang van de verandering van medium). Er moet rekening worden gehouden met de mogelijke verdunning van de blootstellingsconcentraties door toevoeging van voer en dergelijke verdunning moet zo veel mogelijk worden vermeden met goed geconcentreerde algensuspensies. Indien hiervan wordt afgeweken (bijvoorbeeld bij doorstroomtests), moet dat in het testverslag worden vermeld.

Tijdens de test moet de voeding van de moederdieren bij voorkeur bestaan uit levende algencellen van ten minste een van de volgende: Chlorella sp., Pseudokirchneriella subcapitata (voorheen Selenastrum capricornutum) en Desmodesmus subspicatus (voorheen Scenedesmus subspicatus). Uitgangspunt bij de voeding moet de aan elk moederdier toegediende hoeveelheid organische koolstof (C) zijn. Uit onderzoek (14) is gebleken dat een hoeveelheid van 0,1 à 0,2 mg C/*Daphnia*/dag voor *Daphnia* magna voldoende is om een zodanig aantal levende nakomelingen te krijgen dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria voor de test. De voeding kan worden gegeven in een gelijkmatige, over de gehele

▼M7

testperiode uitgesmeerde hoeveelheid of desgewenst in een lagere hoeveelheid bij aanvang van de test, die daarna wordt opgevoerd teneinde rekening te houden met de groei van de moederdieren. Ook in dat geval moet de hoeveelheid echter altijd binnen de aanbevolen hoeveelheid van 0,1 tot 0,2 mg C/*Daphnia*/dag blijven.

Indien er gebruik moet worden gemaakt van alternatieve middelen, zoals algencelaantal of lichtextinctie, om aan de vereiste hoeveelheid voeding te komen (d.w.z. gemakshalve, aangezien de meting van het koolstofgehalte tijdrovend is), moet elk laboratorium zijn eigen nomografie opstellen waarin het alternatieve middel wordt gerelateerd aan het koolstofgehalte van de algencultuur (zie aanhangsel 3 voor suggesties inzake het opstellen van een nomografie). Nomografieën moeten ten minste eenmaal per jaar worden gecontroleerd, doch vaker als de algencultuuromstandigheden zijn gewijzigd. Gebleken is dat lichtextinctie een beter alternatief voor het koolstofgehalte is dan het celaantal (15).

Er dient een geconcentreerde algensuspensie te worden toegediend aan de *Daphnia* om de hoeveelheid algen-kweekmedium die in de testvaten wordt overgebracht, zoveel mogelijk te beperken. De algen kunnen worden geconcentreerd door middel van centrifugeren, gevolgd door hersuspensie in *Daphnia*-kweekmedium.

Licht

16 uren licht met een intensiteit van ten hoogste 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ gemeten op het wateroppervlak van het vat. Voor lichtmeetinstrumenten die in lux gekalibreerd zijn, komt een bereik van 1000 — 1500 lux voor „cool white” licht ongeveer overeen met de aanbevolen lichtintensiteit 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Temperatuur

De temperatuur van de testmedia moet liggen tussen 18-22 °C. Waar mogelijk mag de temperatuur, als dagelijks bereik, echter bij geen enkele test met meer dan 2 °C variëren binnen dit bereik (bijvoorbeeld 18-20, 19-21 of 20-22 °C). Voor de controle van de temperatuur kan het dienstig zijn een extra testvat te gebruiken.

Beluchting

De testvaten mogen niet worden belucht tijdens de test.

Testopzet

Bereikbepalingstest

Indien nodig wordt een bereikbepalingstest uitgevoerd met bijvoorbeeld vijf teststofconcentraties en twee replicaties voor elke behandeling en controle. Aanvullende informatie, uit tests met soortgelijke chemische stoffen of uit de literatuur, over acute toxiciteit voor *Daphnia* en/of andere aquatische organismen kan ook nuttig zijn om de reeks concentraties voor de bereikbepalingstest vast te stellen.

De duur van de bereikbepalingstest is 21 dagen of voldoende lang om effectniveaus op betrouwbare wijze te kunnen voorspellen. Aan het eind van de test wordt de voortplanting van de *Daphnia* beoordeeld. Het aantal moederdieren en de aanwezigheid van nakomelingen moeten worden geregistreerd.

Definitieve test

Normaal gesproken zijn er ten minste vijf testconcentraties, aan weerszijden van de effectieve concentratie (bv. EC_x), die een meetkundige reeks vormen met een rede van bij voorkeur niet hoger dan 3,2. Er moet een passend aantal replicatieonderzoeken voor elke testconcentratie worden gebruikt (zie de punten 24-25). Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet een motivering worden gegeven. Chemische stoffen mogen niet worden getest boven de grens van hun oplosbaarheid in het testmedium. Het is raadzaam om, alvorens het

▼M7

experiment uit te voeren, na te denken over het statistisch onderscheidingsvermogen van de testopzet en passende statistische methoden toe te passen (4). Bij de vaststelling van het concentratiebereik moet aandacht worden geschonken aan het volgende:

i) Indien een schatting wordt gemaakt van de EC_x betreffende effecten op de voortplanting, is het raadzaam om een dusdanig aantal concentraties te gebruiken dat de EC_x met voldoende zekerheid kan worden bepaald. De geschatte EC_x moet bij voorkeur in het bereik van de testconcentraties liggen, zodat EC_x wordt gevonden door interpolatie, en niet door extrapolatie. Voor de volgende statistische analyse is het een voordeel om meer (bijvoorbeeld 10) testconcentraties, minder replicatieonderzoeken van elke concentratie (bijvoorbeeld 5, zodat het totale aantal vaten hetzelfde blijft) en 10 controles te hebben.

ii) Bij het schatten van de LOEC en/of NOEC, moet de laagste testconcentratie zodanig laag zijn dat het voortplantingsresultaat bij die concentratie niet significant lager is dan in de controle. Als dat niet het geval is, moet de test worden herhaald met een lagere laagste concentratie.

iii) Bij het schatten van de LOEC en/of NOEC, moet de hoogste testconcentratie zodanig hoog zijn dat het voortplantingsresultaat bij die concentratie significant lager is dan in de controle. Als dat niet het geval is, moet de test worden herhaald met een hogere hoogste concentratie, tenzij in de eerste test de maximaal vereiste testconcentratie voor het testen op chronische effecten (d.w.z. 10 mg/l) werd gebruikt als hoogste testconcentratie.

Als bij de hoogste concentratie in de bereikbepalingstest (bv. bij 10 mg/l) geen effecten worden waargenomen, of wanneer op grond van het ontbreken van toxiciteit voor andere organismen en/of een lage/geen opname wordt gedacht dat de teststof zeer waarschijnlijk een geringe/geen toxiciteit heeft, kan de voortplantingstest worden uitgevoerd als een limiettest, waarbij bijvoorbeeld 10 mg/l als testconcentratie en de controle worden gebruikt. Er moeten tien replicatieonderzoeken worden gebruikt voor zowel de behandelings- als de controlegroepen. Wanneer in een doorstroomsysteem mogelijk een limiettest moet worden uitgevoerd, kan worden volstaan met minder replicatieonderzoeken. Een limiettest biedt de mogelijkheid om aan te tonen dat er bij de limietconcentratie geen statistisch significant effect is, maar als er effecten worden waargenomen, is normaal gesproken een volledige test vereist.

Controles

Ter aanvulling op de testreeks moet één testmediumcontrolereeks en, indien relevant, één controlereeks met het oplosmiddel of het dispergeermiddel worden uitgevoerd. Indien gebruikt moet de oplosmiddel- of dispergeermiddelconcentratie dezelfde zijn als in de vaten met de teststof. Het juiste aantal replicatieonderzoeken moet worden verricht (zie de punten 23-24).

Bij een goed uitgevoerde test moet de coëfficiënt van de variatie rond het gemiddelde aantal levende nakomelingen per moederdier in de controlegroep(en) in de regel $\leq$ 25 % zijn; dit moet worden vermeld voor elke testopzet waarbij gebruik wordt gemaakt van afzonderlijk gehouden dieren.

Verversing van het testmedium

De frequentie waarmee het medium wordt ververst, hangt af van de stabiliteit van de teststof, maar moet ten minste driemaal per week zijn. Indien uit voorafgaande stabiliteitstests (zie punt 7) blijkt dat de teststofconcentratie niet stabiel is (d.w.z. buiten het bereik van 80 tot 120 % van de nominale concentratie of dalend tot onder 80 % van de gemeten beginconcentratie) gedurende de maximale verversingsperiode (d.w.z. drie dagen), moet worden overwogen het medium vaker te verversen of gebruik te maken van een doorstroomtest.

▼M7

Wanneer het medium wordt ververst in semistatische tests, wordt een tweede reeks testvaten bereid waarin de moederdieren worden overgebracht door middel van bijvoorbeeld een glazen pipet met een geschikte diameter. De hoeveelheid met de *Daphnia* overgebracht medium moet zo klein mogelijk zijn.

Observaties

De resultaten van de observaties gedurende de test moeten worden vermeld op informatiebladen (zie de voorbeelden in de aanhangsels 4 en 5). Indien er nog andere metingen gedaan moeten worden (zie punt 44), zijn er mogelijk meer observaties nodig.

Nakomelingen

De door elk moederdier voortgebrachte nakomelingen moeten bij voorkeur dagelijks worden verwijderd en geteld vanaf het moment dat het eerste broedsel verschijnt, teneinde te voorkomen dat ze voer opeten dat voor het moederdier is bestemd. Hoewel in het kader van deze testmethode alleen het aantal levende nakomelingen moet worden geteld, moet ook de aanwezigheid van niet-uitgekomen eitjes of dode nakomelingen worden vermeld.

Mortaliteit

De mortaliteit onder de moederdieren moet bij voorkeur dagelijks worden geregistreerd of ten minste even vaak als de nakomelingen worden geteld.

Andere parameters

Hoewel deze testmethode voornamelijk bedoeld is voor de beoordeling van de effecten op het voortplantingsresultaat, kunnen er mogelijk ook andere effecten in zodanige mate worden gekwantificeerd dat statistische analyse mogelijk is. Het voortplantingsresultaat per overlevend moederdier, d.w.z. het aantal levende nakomelingen voorgebracht tijdens de testperiode per overlevend moederdier, kan worden geregistreerd. Dit kan worden vergeleken met de belangrijkste responsvariabele (voortplantingsresultaat per moederdier aan het begin van de test dat tijdens de test niet onbedoeld of onopzettelijk stierf). Als zich bij blootgestelde replicaties mortaliteit van moederdieren voordoet, moet worden gekeken of de mortaliteit een concentratie-effectpatroon vertoont, bijvoorbeeld of een regressie van de respons uitgezet tegen de concentratie van de teststof een significant verband met een positieve helling laat zien (hiervoor kan een statistische toets zoals de trendtoets van Cochran-Armitage worden gebruikt). Indien de mortaliteit geen concentratie-effectpatroon vertoont, moeten de replicaties met mortaliteit van de moederdieren van de analyse van het testresultaat worden uitgesloten. Indien de mortaliteit wel een concentratie-effectpatroon vertoont, moet de mortaliteit van de moederdieren worden beschouwd als een effect van de teststof en mogen de replicaties niet van de analyse van het testresultaat worden uitgesloten. Groeimetingen zijn zeer wenselijk aangezien zij informatie verschaffen over mogelijke subletale effecten, welke gegevens soms bruikbaarder zijn dan voortplantingsmetingen alleen; de meting van de lengte van de moederdieren (d.w.z. de lichaamslengte met uitzondering van het anale uiteinde) aan het eind van de test wordt aanbevolen. Andere parameters die kunnen worden gemeten of berekend zijn de tijd die nodig is om het eerste broedsel (en de daaropvolgende broedsels) voort te brengen, aantal en omvang van de broedsels per dier, aantal niet-uitgekomen eitjes, aanwezigheid van mannelijke neonaten (OESO, 2008) of ephippia en mogelijk de intrinsieke groeisnelheid van de populatie (zie aanhangsel 1 voor definities en aanhangsel 7 voor de bepaling van het geslacht van neonaten).

Frequentie van analytische bepalingen en metingen

De zuurstofconcentratie, temperatuur, hardheid en pH-waarden moeten ten minste eenmaal per week worden gemeten, in verse en oude media, in de controle(s) en in de hoogste teststofconcentratie.

Tijdens de test worden de concentraties van de teststof regelmatig bepaald.

Bij semistatische tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting binnen ± 20 % van de nominale waarde zal blijven (d.w.z. binnen het bereik van 80 tot 120 %, zie de punten 6, 7 en 39), verdient het aanbeveling de hoogste en laagste testconcentraties in ieder geval te analyseren bij de verse bereiding ervan

▼M7

alsmede eenmaal bij verversing in de eerste week van de test (d.w.z. analyses moeten worden verricht op een monster van een en dezelfde oplossing — bij verse bereiding en bij verversing). Daarna moeten deze bepalingen in ieder geval wekelijks worden herhaald.

Bij tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting niet binnen ± 20 % van de nominale waarde zal blijven, moeten alle testconcentraties zowel bij de verse bereiding als bij verversing worden geanalyseerd. Bij tests echter waarbij de gemeten beginconcentratie van de teststof weliswaar niet binnen ± 20 % van de nominale waarde ligt, maar wel naar tevredenheid kan worden aangetoond dat de beginconcentraties herhaalbaar en stabiel zijn (d.w.z. binnen het bereik van 80 tot 120 % van de beginconcentraties), kunnen de chemische bepalingen in de weken 2 en 3 van de test worden beperkt tot de hoogste en laagste testconcentraties. In alle gevallen hoeft de bepaling van teststofconcentraties vóór de verversing slechts op één replicatieonderzoekvat bij elke testconcentratie te worden uitgevoerd.

Bij doorstroomtests is een gelijksoortige monstermethode van toepassing als bij semistatische tests (met dien verstande dat de meting van oplossingen hier niet van toepassing is). Desalniettemin kan het raadzaam zijn meer monsters te nemen in de eerste week (bijvoorbeeld via drie reeksen metingen) om te bewerkstelligen dat de testconcentraties stabiel blijven. Bij dit soort testen moet de doorstromingssnelheid van het oplosmiddel en de teststof dagelijks worden gecontroleerd.

Als er voldoende aanwijzingen zijn dat de concentratie van de te testen stof gedurende de gehele test en naar tevredenheid binnen ± 20 % van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, mogen de resultaten worden gebaseerd op nominale of gemeten beginwaarden. Indien de afwijking van de nominale of gemeten beginconcentratie groter is dan ± 20 %, moeten de resultaten worden uitgedrukt in tijdgewogen gemiddelde (zie leidraad voor de berekening in aanhangsel 6).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

Deze test is bedoeld om het effect van de teststof op het voortplantingsresultaat te bepalen. Het totale aantal levende nakomelingen per moederdier moet per testvat worden berekend (d.w.z. via replicatieonderzoek). Daarnaast kan het voortplantingsresultaat worden berekend op basis van het aantal levende nakomelingen per overlevend moederdier. De responsvariabele die ecologisch het relevantst is, is echter het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat niet onopzettelijk ([1]) of onbedoeld ([2]) sterft tijdens de test. Als het moederdier onopzettelijk of onbedoeld sterft tijdens de test, of als het blijkt te gaan om een mannelijk dier, wordt het replicatieonderzoek niet meegenomen in de analyse. De analyse zal in dat geval worden gebaseerd op een lager aantal replicatieonderzoeken. Als zich bij blootgestelde replicaties mortaliteit van moederdieren voordoet, moet worden gekeken of de mortaliteit een concentratie-effectpatroon vertoont, bijvoorbeeld of een regressie van de respons uitgezet tegen de concentratie van de teststof een significant verband met een positieve helling laat zien (hiervoor kan een statistische toets zoals de trendtoets van Cochran-Armitage worden gebruikt). Indien de mortaliteit geen concentratie-effectpatroon vertoont, moeten de replicaties met mortaliteit van de moederdieren van de analyse van het testresultaat worden uitgesloten. Indien de mortaliteit wel een concentratie-effectpatroon vertoont, moet de mortaliteit van de moederdieren worden beschouwd als een effect van de teststof en mogen de replicaties niet van de analyse van het testresultaat worden uitgesloten.

Samengevat, wanneer de LOEC en NOEC of EC_x worden gebruikt om de effecten uit te drukken, verdient het aanbeveling het effect op de voortplanting te berekenen door de hierboven genoemde responsvariabelen beide te gebruiken, d.w.z.

([1]) Onopzettelijke mortaliteit: niet met een chemische stof samenhangende mortaliteit veroorzaakt door een accidentele gebeurtenis (d.w.z. een bekende oorzaak).

([2]) Onbedoelde mortaliteit: niet met een chemische stof samenhangende mortaliteit met onbekende oorzaak.

▼M7

— als het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat niet onopzettelijk of onbedoeld sterft tijdens de test, en

— als het aantal levende nakomelingen per overlevend moederdier,

en dan als eindresultaat de laagste waarde van de NOEC en LOEC of EC_x te gebruiken die met gebruik van een van deze twee responsvariabelen is berekend.

Alvorens de statistische analyse uit te voeren, verdient het aanbeveling een gegevenstransformatie te overwegen indien dit nodig is om te voldoen aan de eisen van een specifieke statistische toets, bijvoorbeeld ANOVA-procedures, vergelijking van de behandelingen met de controle door een t-toets van Student, Dunnett-toets, Williams-toets of stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere-Terpstra. Als verdelingsvrije alternatieven kunnen een toets van Dunn of Mann-Whitney-toets worden overwogen. 95 %-betrouwbaarheidsintervallen worden berekend voor afzonderlijke behandelingsgemiddelden.

Het aantal overlevende moederdieren in de onbehandelde controles is een geldigheidscriterium en moet worden gedocumenteerd en gerapporteerd. Ook alle andere schadelijke effecten, zoals afwijkend gedrag en toxicologisch significante bevindingen, moeten in het eindverslag worden vermeld.

ECx

ECx-waarden en de bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen worden berekend met een geschikte statistische methode (bv. logistische functie of Weibull-functie, getrimde Spearman-Karber-methode of eenvoudige interpolatie). Voor de berekening van de EC10, EC50 of een andere ECx wordt regressieanalyse uitgevoerd met de volledige gegevensreeks.

NOEC/LOEC

Indien het doel van een statistische analyse is de NOEC/LOEC te bepalen, moeten passende statistische methoden worden gebruikt conform document 54 van de OESO, „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (4). Negatieve effecten van de teststof, in vergelijking met de controle, worden in het algemeen onderzocht met behulp van eenzijdige hypothesetoetsing met $p \leq 0{,}05$.

Een normale verdeling van de gegevens en homogeniteit van de variantie kunnen met een passende statistische toets worden getoetst, bijvoorbeeld respectievelijk met de toets van Shapiro-Wilk en de Levene-toets ($p \leq 0{,}05$). Er kunnen een éénwegs variantieanalyse en vervolgens toetsen voor meervoudige vergelijkingen worden uitgevoerd. Toetsen voor meervoudige vergelijkingen (bv. Dunnett-toets) of stap-omlaag-trendtoetsen (bv. Williams-toets of stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere-Terpstra) kunnen worden gebruikt om na te gaan of er significante verschillen ($p \leq 0{,}05$) zijn tussen de controles en de verschillende concentraties van de teststof (selectie van de aanbevolen toets overeenkomstig document 54 van de OESO (4)). Anders kunnen verdelingsvrije toetsen (bv. Bonferroni-toets volgens Holm of de Jonckheere-Terpstra-trendtoets) worden gebruikt om de NOEC en LOEC te bepalen.

Limiettest

Als een limiettest (vergelijking van de controle en slechts één behandeling) is uitgevoerd en er is voldaan aan de voorwaarden van parametrische toetsprocedures (normaliteit, homogeniteit), kunnen metrische responsen worden geëvalueerd met de t-toets van Student. Als niet aan die voorwaarden wordt voldaan, kan een t-toets voor ongelijke varianties (zoals de Welch-toets) of een verdelingsvrije toets, zoals de Mann-Whitney-toets, worden gebruikt.

Om significante verschillen tussen de controles (controle en oplosmiddelcontrole of dispergeermiddelcontrole) vast te stellen, kunnen de replicaties van de beide controles worden getoetst als beschreven voor de limiettest. Als uit deze toetsen geen significante verschillen naar voren komen, mogen alle replicaties van de controle en oplosmiddelcontrole worden gepoold. Anders dienen alle behandelingen te worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole.

▼M7

Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische kenmerken en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, waaronder de zuiverheid.

Proefdiersoort:

— de kloon (ongeacht of die genetisch getypeerd is), leverancier of bron (voor zover bekend) en de toegepaste cultuuromstandigheden. Als gebruik wordt gemaakt van een andere soort dan *Daphnia magna*, moet dit worden gerapporteerd en beargumenteerd.

Testomstandigheden:

— toegepaste testprocedure (bijvoorbeeld semistatisch of doorstroom, volume, hoeveelheid *Daphnia* per liter);

— fotoperiode en lichtintensiteit;

— testopzet (bijvoorbeeld aantal replicatieonderzoeken, aantal moederdieren per replicatieonderzoek);

— bijzonderheden over het gebruikte kweekmedium;

— voorzover gebruikt, toevoegingen van organisch materiaal, met inbegrip van de samenstelling, bron, bereidingsmethode, TOC/COD van stamoplossingen, schatting van de resulterende TOC/COD in het testmedium;

— gedetailleerde informatie over voeding, waaronder de hoeveelheid (in mg C/*Daphnia*/dag) en het schema (bijvoorbeeld soort voer, met inbegrip van de specifieke naam (soort) wat de algen betreft en, voorzover bekend, de stam en de kweekomstandigheden);

— bereidingsmethode van stamoplossingen en frequentie van de verversing (indien gebruikt moeten het oplosmiddel en het dispergeermiddel alsmede de concentratie ervan worden vermeld).

Resultaten:

— resultaten van eventuele voorbereidende onderzoeken naar de stabiliteit van de teststof;

— de nominale testconcentraties en de resultaten van alle analyses ter bepaling van de concentratie van de teststof in de testvaten (zie voorbeeld informatiebladen in aanhangsel 5); de herstelcapaciteit van de methode en de bepaalbaarheidsgrens moeten ook worden gerapporteerd;

— waterkwaliteit in de testvaten (d.w.z. pH, temperatuur en opgeloste-zuurstofconcentratie, en TOC en/of COD en hardheid waar van toepassing) (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 4);

— het volledige verslag van de voortbrenging van levende nakomelingen tijdens de test per moederdier (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 4);

— het sterftecijfer onder de moederdieren en de dag(en) waarop de sterfte plaatsvond (zie voorbeeld informatieblad in aanhangsel 4);

— de variatiecoëfficiënt van het voortplantingsresultaat in de controlegroep (gebaseerd op het totale aantal levende nakomelingen per moederdier dat aan het eind van de test nog in leven was);

— een grafische voorstelling van het totale aantal levende nakomelingen per moederdier voor elk replicatieonderzoek, exclusief de moederdieren die onopzettelijk of onbedoeld zijn gestorven tijdens de test, afgezet tegen de concentratie van de teststof;

▼M7

— indien van toepassing, een grafische voorstelling van het totale aantal levende nakomelingen per overlevend moederdier voor elk replicatieonderzoek afgezet tegen de concentratie van de teststof;

— voor zover van toepassing, de Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) voor de voortplanting, inclusief een beschrijving van de toegepaste statistische procedures en een indicatie van de omvang van het effect dat zou kunnen worden waargenomen (hiertoe zou vóór het begin van het experiment een analyse van het onderscheidend vermogen kunnen worden uitgevoerd), alsmede de No Observed Effect Concentration (NOEC) voor de voortplanting; informatie over de responsvariabele die is gebruikt voor het berekenen van de LOEC- en NOEC-waarde (hetzij als totaal aantal levende nakomelingen per moederdier dat niet onopzettelijk of onbedoeld is gestorven tijdens de test, hetzij als het totale aantal levende nakomelingen per overlevend moederdier), voor zover van toepassing, de LOEC of NOEC betreffende de mortaliteit van de moederdieren moeten ook worden vermeld;

— voor zover van toepassing, de EC_x betreffende de voortplanting en betrouwbaarheidsintervallen (bv. 90 % of 95 %) en een grafiek van het voor de berekening daarvan gehanteerde model, de helling van de concentratie-responscurve en de standaardafwijking daarvan;

— andere waargenomen biologische effecten of metingen: vermelding van eventuele andere biologische effecten die werden waargenomen of gemeten (bijvoorbeeld groei van moederdieren), met inbegrip van eventuele passende onderbouwing;

— een toelichting op eventuele afwijkingen van de testmethode.

LITERATUUR

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, VK, 20-21 maart 1993.

(2) OESO (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. OESO, Parijs.

(3) OESO (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. OESO, Parijs.

(4) OESO (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. OESO, Parijs.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Strauss. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47:775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.

(13) OESO (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr. 23. OESO, Parijs.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Voor de toepassing van deze testmethode wordt verstaan onder:

Aantoonbaarheidsgrens: de laagste concentratie die wel kan worden gedetecteerd doch niet gekwantificeerd.

Bepaalbaarheidsgrens: de laagste concentratie die kwantitatief meetbaar is.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Ecx: de concentratie van de in water opgeloste teststof die resulteert in een x %-vermindering van de voortplanting van *Daphnia* binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

Intrinsieke groeisnelheid van de populatie: een maat voor de groei van de populatie waarbij wordt uitgegaan van het voortplantingsresultaat en de leeftijdspecifieke mortaliteit (1) (2) (3). Bij stabiele populaties is die snelheid nul. Bij toenemende populaties is zij positief en bij afnemende populaties negatief. De laatstgenoemde populaties zijn uiteraard niet levensvatbaar en zullen uiteindelijk uitsterven.

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) (concentratie waarbij het laagste effect wordt waargenomen): de laagste testconcentratie van de stof waarbij een effect is waargenomen dat statistisch significant is voor de voortplanting en de mortaliteit van moederdieren (bij $p < 0,05$) in vergelijking met de controle, binnen een aangegeven blootstellingsperiode. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd.

Mortaliteit: een dier wordt geregistreerd als gestorven als het immobiel is, d.w.z. als het niet tot zwemmen in staat is of als er geen beweging van aanhangsels of het postabdomen wordt waargenomen binnen 15 seconden na zachtjes bewegen van het testvat. (Gebruik van een andere definitie moet met bronvermelding worden vermeld.)

Moederdieren: de vrouwelijke *Daphnia* die aanwezig zijn bij aanvang van de test en voorwerp zijn van de studie naar het voortplantingsresultaat.

Nakomelingen: de jonge *Daphnia* die tijdens de test worden voortgebracht door de moederdieren.

No Observed Effect Concentration (NOEC) (concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen): de testconcentratie direct onder de LOEC, die in vergelijking met de controle geen statistisch significant effect heeft ($p < 0,05$) binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

Onbedoelde mortaliteit: niet met een chemische stof samenhangende mortaliteit met onbekende oorzaak.

Onopzettelijke mortaliteit: niet met een chemische stof samenhangende mortaliteit veroorzaakt door een accidentele gebeurtenis (d.w.z. een bekende oorzaak).

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Voortplantingsresultaat: het aantal levende nakomelingen dat in de testperiode door moederdieren wordt voortgebracht.

Literatuur

(1) Wilson, E.O. and 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, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Aanhangsel 2

BEREIDING VAN VOLLEDIG BESCHREVEN MEDIA ELENDT M7 EN M4

Acclimatisering aan Elendt M7- en Elendt M4-media

Sommige laboratoria hebben problemen ondervonden bij het rechtstreeks overbrengen van *Daphnia* in M4- (1) en M7-media. Toch is er enig succes geboekt met geleidelijke acclimatisering, d.w.z. overgang van het eigen medium naar 30 % Elendt, vervolgens naar 60 % Elendt en tot slot naar 100 % Elendt. De vereiste acclimatiseringsperiode kan soms oplopen tot een hele maand.

Bereiding

Spoorelementen

Afzonderlijke stamoplossingen (I) van individuele spoorelementen worden eerst bereid in water met een geschikte zuiverheid, d.w.z. gedeïoniseerd, gedistilleerd of omgekeerde osmose. Uit deze verschillende stamoplossingen (I) wordt een enkelvoudige stamoplossing (II) bereid, die alle spoorelementen bevat (gecombineerde oplossing), te weten:

Stamoplossingen I (enkelvoudige stof)	Aan water toegevoegde hoeveelheid	Concentratie (in relatie tot medium M4)	Ter bereiding van de gecombineerde stamoplossing II de volgende hoeveelheid stamoplossing I aan water toevoegen	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000-voudig	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-voudig	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-voudig	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-voudig	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-voudig	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-voudig	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-voudig	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-voudig	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-voudig	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-voudig	1,0	1,0
KI	65	20 000-voudig	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-voudig	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-voudig	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-voudig	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-voudig	—	—
Zowel de Na_2EDTA- als de $FeSO_4$-oplossing wordt enkelvoudig bereid, samengebracht en onmiddellijk met een autoclaaf gesteriliseerd. Hiermee wordt verkregen:				
Fe-EDTA-oplossing		1 000-voudig	20,0	5,0

▼**M7**

M4- en M7-media

M4- en M7-media worden als volgt bereid met behulp van stamoplossing II, macronutriënten en vitaminen:

	Aan water toegevoegde hoeveelheid	Concentratie (in relatie tot medium M4)	Toegevoegde hoeveelheid stamoplossing ter bereiding van medium	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Stamoplossing II (gecombineerde spoorelementen)		20-voudig	50	50
Macronutriëntstamoplossingen (één stof)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-voudig	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-voudig	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-voudig	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-voudig	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-voudig	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-voudig	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-voudig	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-voudig	0,1	0,1
Gecombineerde vitaminestamoplossing	—	10 000-voudig	0,1	0,1

De gecombineerde vitaminestamoplossing wordt bereid door toevoeging van 3 vitaminen aan 1 liter water, zoals hieronder weergegeven:

	mg/l			
Thiaminehydrochloride	750	10 000-voudig		
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000-voudig		
Biotine	7,5	10 000-voudig		

De gecombineerde vitaminestamoplossing wordt in bevroren toestand bewaard in kleine fracties. De vitaminen worden kort vóór gebruik aan de media toegevoegd.

N.B: Voeg, ter voorkoming van zoutneerslag bij de bereiding van de volledige media, de fracties van de stamoplossingen toe aan circa 500 — 800 ml gedeïoniseerd water en vul daarna aan tot 1 liter.

N.N.B. Zie voor de eerste publicatie betreffende het M4-medium Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

Aanhangsel 3

TOTALE ORGANISCHE KOOLSTOF (TOC) ANALYSE EN OPSTELLING VAN EEN NOMOGRAFIE VOOR TOC-GEHALTE VAN ALGENVOEDING

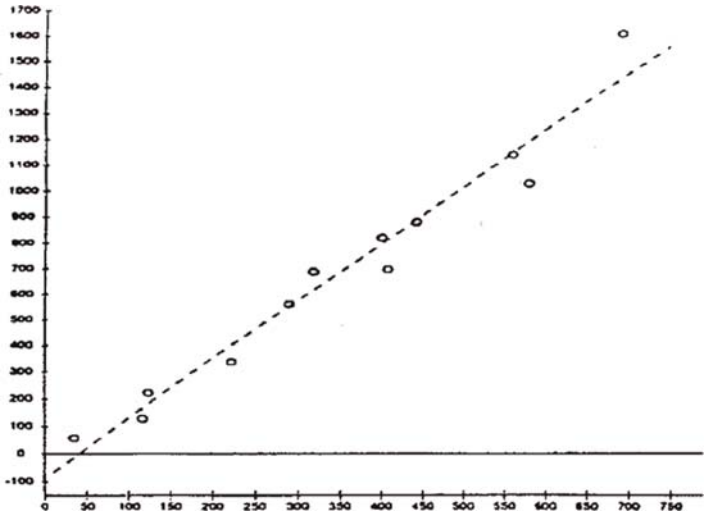
Normaal gesproken wordt het koolstofgehalte van de algenvoeding niet rechtstreeks gemeten, maar afgeleid uit correlaties (d.w.z. nomografieën) met alternatieve middelen zoals algencelaantal of lichtextinctie.

De TOC moet worden gemeten via hogetemperatuuroxidatie en niet met methoden op basis van UV of persulfaat. (Zie voor advies: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB.)

Voor het opstellen van nomografieën moeten algen middels centrifugeren worden gescheiden van het groeimedium, gevolgd door hersuspensie in gedistilleerd water. De surrogaatparameter en de TOC-concentratie moet in elk monster driemaal worden gemeten. Blanco's van gedistilleerd water moeten worden geanalyseerd; de TOC-concentratie moet worden afgeleid uit die van het algenmonster.

De nomografieën moeten lineair zijn over het vereiste koolstofconcentratiebereik. Voorbeelden zijn hieronder weergegeven.

NB: Deze grafieken mogen niet worden gebruikt voor conversiedoeleinden; het is van wezenlijk belang dat laboratoria hun eigen nomografieën opstellen.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

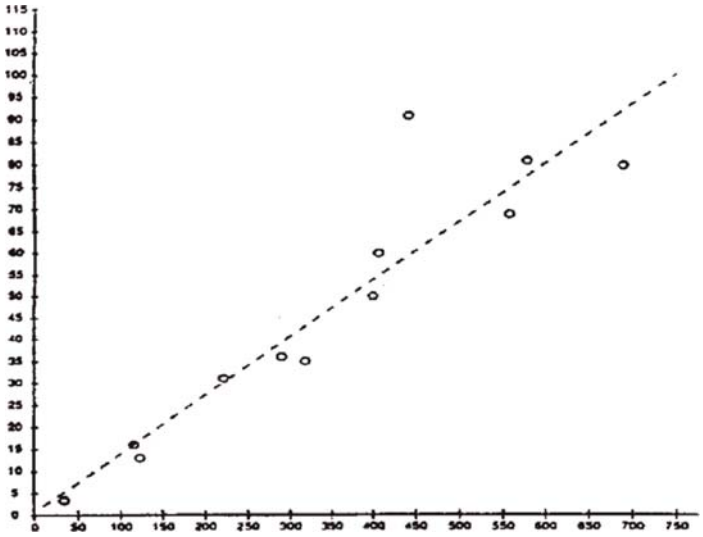
Regressie van mg/l drooggewicht op mg C/1. Gegevens van geconcentreerde suspensies van semicontinue batch-gekweekte cellen, gehersuspendeerd in gedistilleerd water.

x-as: mg C/1 geconcentreerde algenvoeding

y-as: mg/1 drooggewicht van geconcentreerde algenvoeding

Correlatiecoëfficiënt -0,980

▼**M7**



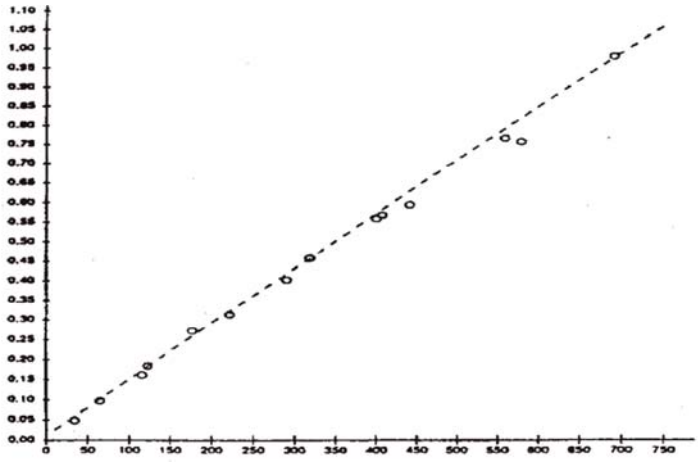
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regressie van celaantal op mg C/1. Gegevens van geconcentreerde suspensies van semicontinue batch-gekweekte cellen, gehersuspendeerd in gedistilleerd water.

x-as: mg C/1 geconcentreerde algenvoeding

y-as: Aantal cellen/1 geconcentreerde algenvoeding

Correlatiecoëfficiënt -0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regressie van exctinctie op mg C/1 (1 cm padlengte). Gegevens van geconcentreerde suspensies van semicontinue batch-gekweekte cellen, gehersuspendeerd in gedistilleerd water.

x-as: mg C/1 geconcentreerde algenvoeding

y-as: Extinctie bij 440 nm van een 1/10 verdunning van geconcentreerde algenvoeding

Correlatiecoëfficiënt – 0,998

▼M7

Aanhangsel 4

VOORBEELD INFORMATIEBLAD VOOR REGISTRATIE VAN MEDIUMVERVERSING, FYSISCH-CHEMISCHE CONTROLEGEGEVENS, VOEDING, *DAPHNIA*-VOORTPLANTING EN MORTALITEIT MOEDERDIEREN

Experiment nr:	Begindatum:						Kloon:			Medium:				Type voeding:				Teststof:					Nominale concentratie:	
Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Mediumverversing (aanstrepen)																								
pH (*)																							nieuw	
																							oud	
O_2 (mg/l) (*)																							nieuw	
																							oud	
Temp. (°C) (*)																							nieuw	
																							oud	
Voeding gegeven (aanstrepen)																								
Aantal levende nakomelingen (**)																								Totaal
Vat 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 1442

▼M7

Experiment nr:	Begindatum:						Kloon:			Medium:				Type voeding:				Teststof:					Nominale concentratie:	
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																								
																							Totaal	
Cumulatieve mortaliteit moederdieren (***)																								

(*) Aangeven welk vat voor het experiment werd gebruikt.
(**) Niet-uitgekomen eitjes aangeven als „AB” in het desbetreffende vakje.
(***) Eventuele mortaliteit van moederdieren aangeven als „M” in het desbetreffende vakje.

▼M7

Aanhangsel 5

VOORBEELD INFORMATIEBLAD VOOR REGISTRATIE VAN RESULTATEN CHEMISCHE ANALYSE

a) **Gemeten concentraties**

Nominale concentratie	Monster week 1		Monster week 2		Monster week 3	
	Vers	Oud	Vers	Oud	Vers	Oud

b) **Gemeten concentraties als percentage van nominale concentratie**

Nominale concentratie	Monster week 1		Monster week 2		Monster week 3	
	Vers	Oud	Vers	Oud	Vers	Oud

▼M7

Aanhangsel 6

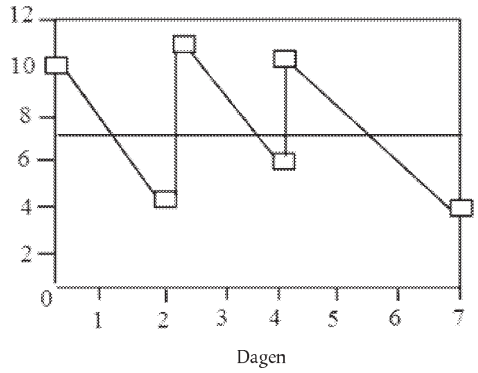
BEREKENING TIJDGEWOGEN GEMIDDELDE

Tijdgewogen gemiddelde

Daar de concentratie van de teststof in de periode tussen de mediumverversingen kan afnemen, moet goed worden bekeken welke concentratie moet worden gekozen als representatief voor het concentratiebereik dat wordt ondergaan door de *Daphnia*-moederdieren. Deze keuze moet gebaseerd zijn op biologische én statistische overwegingen. Als bijvoorbeeld wordt aangenomen dat de voortplanting vóór alles wordt beïnvloed door de piekconcentratie, moet de maximumconcentratie worden gebruikt. Wanneer men er daarentegen van uitgaat dat het geaccumuleerde of langeretermijneffect van de toxische stof belangrijker is, is een gemiddelde concentratie relevanter. In dat geval is de tijdgewogen gemiddelde concentratie geschikt, aangezien daarbij rekening wordt gehouden met de variatie van de momentane concentratie over een bepaalde tijdsperiode.

Figuur 1:

Voorbeeld van tijdgewogen gemiddelde



Figuur 1 laat een voorbeeld zien van een (vereenvoudigde) test over zeven dagen met mediumverversing op dag 0, 2 en 4.

— De dunne zigzaglijn geeft de concentratie op enig tijdstip weer. Als vooronderstelling geldt dat de concentratie daalt volgens een exponentieel achteruitgangsproces.

— De zes vierkantjes geven de waargenomen concentraties weer zoals gemeten aan het begin en het einde van elke verversingsperiode.

— De dikke, ononderbroken lijn geeft het tijdgewogen gemiddelde weer.

Het tijdgewogen gemiddelde wordt zo berekend dat het oppervlak onder dat gemiddelde gelijk is aan het oppervlak onder de concentratiekromme. Zie onderstaande tabel 1 voor de berekening van dit voorbeeld.

Tabel 1

Berekening van het tijdgewogen gemiddelde

Verversing Aant.	Dagen	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Oppervlak
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

Verversing Aant.	Dagen	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Oppervlak
Totaal dagen:	7				Totaal oppervlak:	50,092
					Tijdgewogen gemiddelde:	7,156

Dagen: het aantal dagen in de verversingsperiode.

Conc 0: de gemeten concentratie aan het begin van elke verversingsperiode.

Conc 1: de gemeten concentratie aan het einde van elke verversingsperiode.

Ln(Conc 0): de natuurlijke logaritme van Conc 0.

Ln(Conc 1): de natuurlijke logaritme van Conc 1.

Oppervlak: het oppervlak onder de exponentiële kromme voor elke verversingsperiode. Het wordt berekend aan de hand van de volgende formule:

$$Oppervlak = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times dag$$

Het tijdgewogen gemiddelde is het" Totaal oppervlak „gedeeld door het" Totaal dagen„.

Voor de toepasbaarheid op de *Daphnia*-voortplantingstest moet de tabel uiteraard worden uitgebreid en betrekking hebben op een periode van 21 dagen.

Het is duidelijk dat niet bevestigd kan worden dat het achteruitgangsproces inderdaad exponentieel is als de waarnemingen alleen plaatsvinden aan het begin en einde van elke verversingsperiode. Een andere kromme zou resulteren in een andere berekening van het" Oppervlak„. Hoe dan ook, het is alleszins plausibel uit te gaan van een exponentieel achteruitgangsproces en de weergegeven kromme is waarschijnlijk het beste alternatief bij gebrek aan andere gegevens.

Toch is de nodige voorzichtigheid geboden als geen enkele chemische stof wordt aangetroffen bij de chemische analyse aan het eind van de verversingsperiode. Als niet ingeschat kan worden hoe snel de chemische stof uit de oplossing verdwenen is, kan er ook geen realistisch oppervlak onder de kromme worden vastgesteld, en dus ook geen aannemelijk tijdgewogen gemiddelde.

▼M7

Aanhangsel 7

LEIDRAAD VOOR DE BEPALING VAN HET GESLACHT VAN NEONATEN

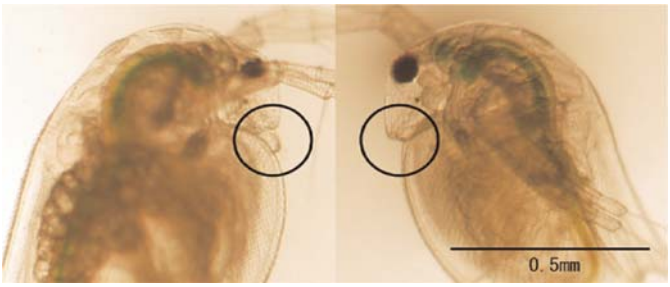
Onder veranderende omgevingscondities, zoals een korter wordende fotoperiode, temperatuur, afnemende voedselconcentratie en toenemende populatiedichtheid, kunnen neonaten van het mannelijk geslacht worden voortgebracht (Hobaek en Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). Het voortbrengen van mannetjes is ook een bekende respons op groeiregulatoren van bepaalde insecten (Oda *et al*., 2005). Onder omstandigheden waarin chemische stressoren een afname van het aantal reproductieve nakomelingen van de parthenogenetische vrouwtjes veroorzaken, wordt een groter aantal mannetjes verwacht (OESO, 2008). Op basis van de beschikbare informatie kan niet worden voorspeld of de geslachtsverhouding of het voortplantingseindpunt het gevoeligst is; er zijn echter aanwijzingen (zie „Validation report" van de OESO, deel 1) dat de toename in het aantal mannetjes mogelijk minder gevoelig is dan de afname van het aantal nakomelingen. Aangezien het primaire doel van de testmethode is het aantal voortgebrachte nakomelingen te beoordelen, is observatie van de verschijning van mannetjes facultatief. Indien dit facultatieve eindpunt in een studie wordt beoordeeld, moet een aanvullend geldigheidscriterium voor de test van niet meer dan 5 % mannetjes in de controles worden gehanteerd.

De meest praktische en gemakkelijkste manier om het geslacht van *Daphnia* te bepalen is aan de hand van hun fenotypische kenmerken, aangezien mannetjes en vrouwtjes genetisch identiek zijn en hun geslacht door het milieu wordt bepaald. Mannetjes en vrouwtjes verschillen van elkaar in de lengte en morfologie van de eerste antenne, die bij mannetjes langer is dan bij vrouwtjes (figuur 1). Dit verschil is al direct na de geboorte zichtbaar, hoewel zich tijdens de groei van de dieren nog andere secundaire geslachtskenmerken ontwikkelen (zie bijvoorbeeld figuur 2 in Olmstead en LeBlanc, 2000).

Om het morfologisch geslacht waar te nemen, moeten de neonaten per proefdier met een pipet worden overgebracht in een petrischaal met testmedium. De hoeveelheid medium wordt zo klein mogelijk gehouden om beweging van de dieren tegen te gaan. De observatie van de eerste antenne kan geschieden onder een stereomicroscoop (× 10-60).

Figuur 1

Mannetje (links) en vrouwtje (rechts) van *D. magna* van 24 uur oud. Mannetjes onderscheiden zich van vrouwtjes door de lengte en morfologie van hun eerste antenne, zoals is te zien in de cirkels (Tatarazako *et al*., 2004).



REFERENTIES

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼M7

OESO, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, nr. 88. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, Parijs.

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. MICRO-ORGANISMEN IN DE BODEM: BEPALING VAN DE OMZETTING VAN STIKSTOF

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 216 (2000) van de OESO.

1.1. INLEIDING

In deze testmethode wordt een laboratoriumtest beschreven om te onderzoeken welke effecten chemische stoffen na één blootstelling op lange termijn hebben op de omzetting van stikstof door micro-organismen in de bodem. De test is in eerste instantie gebaseerd op aanbevelingen van de Organisatie voor de bescherming van planten in Europa en het Middellandse Zeegebied (1). Er is echter ook rekening gehouden met andere richtsnoeren, bijvoorbeeld van de Biologische Bundesanstalt in Duitsland (2), het Environmental Protection Agency in de VS (3) de SETAC (4) en de Internationale Organisatie voor Normalisatie (5). Tijdens een workshop van de OESO over de selectie van bodem/sediment in Belgirate in Italië in 1995 (6) is overeenstemming bereikt over het aantal en de aard van de in deze test te gebruiken bodemmonsters. De aanbevelingen voor het verzamelen, behandelen en bewaren van de bodemmonsters zijn gebaseerd op ISO-richtsnoeren (7) en aanbevelingen van de workshop in Belgirate. Bij de beoordeling en evaluatie van toxische kenmerken van teststoffen kan het nodig zijn de effecten op de microbiële activiteit van de bodem te bepalen, bijvoorbeeld wanneer er gegevens over de potentiële neveneffecten van gewasbeschermingsmiddelen op de microflora van de bodem nodig zijn of wanneer wordt verwacht dat de micro-organismen in de bodem aan andere chemische stoffen dan gewasbeschermingsmiddelen worden blootgesteld. De bepaling van de omzetting van stikstof wordt uitgevoerd om de effecten van deze chemische stoffen op de microflora van de bodem te bepalen. Als er landbouwchemicaliën (b.v. gewasbeschermingsmiddelen, kunstmest of bosbouwchemicaliën) worden getest, worden zowel de bepaling van de omzetting van stikstof als de bepaling van de omzetting van koolstof uitgevoerd. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, volstaat de bepaling van de omzetting van stikstof. Als de EC_{50} bij de bepaling van de omzetting van stikstof voor dergelijke stoffen echter binnen het bereik valt van de waarde die voor in de handel verkrijgbare nitrificatieremmers (zoals nitrapyrin) wordt gevonden, kan een bepaling van de omzetting van koolstof worden uitgevoerd om nadere informatie te verkrijgen.

De bodem bestaat uit levende en niet-levende componenten die complexe en heterogene mengsels kunnen vormen. Micro-organismen spelen een belangrijke rol bij de afbraak en omzetting van organisch materiaal in vruchtbare bodem en veel soorten dragen bij tot verschillende aspecten van de vruchtbaarheid van de bodem. Een verstoring van deze biochemische processen op lange termijn kan mogelijkerwijs de cycli van nutriënten verstoren en verandering brengen in de vruchtbaarheid van de bodem. Omzetting van koolstof en stikstof vindt in elke vruchtbare bodem plaats. Hoewel de voor deze processen verantwoordelijke microbiële levensgemeenschappen van bodem tot bodem verschillen, zijn de omzettingsroutes in grote lijnen gelijk.

De hier beschreven testmethode is bedoeld om te detecteren welke schadelijke effecten een stof op lange termijn op het omzettingsproces van stikstof in een aërobe bodem aan het oppervlak kan hebben. Met de testmethode kunnen ook de effecten van stoffen op de omzetting van koolstof door de microflora in de bodem worden bepaald. De vorming van nitraat vindt plaats na het verbreken van de koolstof/stikstof-binding. Als er in de behandelde en de controlebodem een even hoge nitraatproductie wordt gemeten, is het daarom zeer waarschijnlijk dat de belangrijkste afbraakroutes voor koolstof intact zijn en functioneren. Het voor de test gekozen substraat (verpoederd luzememeel) heeft een gunstige koolstof/stikstof-verhouding (meestal tussen 12/1 en 16/1). Daardoor is er tijdens de test een geringer koolstoftekort en kunnen microbiële levensgemeenschappen, als ze door een chemische stof worden aangetast, zich binnen 100 dagen weer herstellen.

▼B

Deze testmethode is ontwikkeld uit tests die in eerste instantie bedoeld waren voor stoffen waarvoor kan worden geraamd welke hoeveelheid de bodem bereikt. Dit geldt bijvoorbeeld voor gewasbeschermingsmiddelen die in bekende hoeveelheden op het veld worden gebracht. Voor landbouwchemicaliën is het voldoende twee doses te testen die relevant zijn voor de opgebrachte hoeveelheid die wordt verwacht of geraamd. Landbouwchemicaliën kunnen als werkzame stof of als geformuleerd product worden getest. De test kan echter ook voor andere stoffen worden gebruikt. Door zowel de op de bodem gebrachte hoeveelheid teststof als de manier waarop de gegevens worden geëvalueerd, te veranderen, kan de test ook worden gebruikt voor chemische stoffen waarvoor niet bekend is hoeveel er naar verwachting in de bodem terecht zal komen. Daarom worden voor andere stoffen dan landbouwchemicaliën de effecten van een reeks concentraties op de omzetting van stikstof bepaald. De gegevens uit deze tests worden gebruikt om een dosis/respons-curve samen te stellen en EC_x-waarden te berekenen, waarbij x het procentuele effect aangeeft.

1.2. DEFINITIES

Omzetting van stikstof: de uiteindelijke afbraak van stikstofhoudend organisch materiaal door micro-organismen via ammonificatie en nitrificatie tot het anorganische eindproduct nitraat.

EC_x (effectieve concentratie): de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van stikstof in nitraat met x procent.

EC_{50} (mediaan van de effectieve concentratie): de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van stikstof in nitraat met 50 procent (50 %).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Gezeefde bodem wordt verbeterd met verpoederd plantenmeel en hetzij behandeld met de teststof, hetzij niet behandeld (controle). Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt aanbevolen minimaal twee concentraties te testen die moeten worden gekozen op grond van de hoogste concentratie die op het veld wordt verwacht. Na 0, 7, 14 en 28 dagen incubatie worden monsters van de behandelde en de controlebodem geëxtraheerd met een geschikt oplosmiddel en wordt de hoeveelheid nitraat in de extracten bepaald. De nitraatvorming in de behandelde monsters wordt vergeleken met de controlemonsters en de procentuele afwijking van de behandelde ten opzichte van de controlemonsters wordt berekend. Alle tests duren ten minste 28 dagen. Als op dag 28 het verschil tussen de behandelde en de controlebodem 25 % of groter is, worden de metingen voortgezet tot maximaal 100 dagen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de teststof in een reeks concentraties aan de bodemmonsters toegevoegd en wordt na 28 dagen incubatie de hoeveelheid nitraat in de behandelde en de controlemonsters bepaald. De resultaten van tests met verschillende concentraties worden aan regressieanalyse onderworpen en de EC_x-waarden (d.w.z. de EC_{50}, de EC_{25} en/of de EC_{10}) worden berekend. Zie ook de definities.

1.5. GELDIGHEID VAN DE TEST

Bij landbouwchemicaliën wordt de evaluatie van de testresultaten gebaseerd op betrekkelijk kleine verschillen (gemiddeld ± 25 %) tussen de nitraatconcentratie in de behandelde en de controlemonsters en grote verschillen in de controles kunnen dan ook tot onjuiste resultaten leiden. Het verschil tussen replicaat-controlemonsters moet derhalve kleiner zijn dan ± 15 %.

▼B

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. **Apparatuur**

Er worden testbakken van chemisch inert materiaal gebruikt. Het volume moet geschikt zijn voor de procedure die voor de incubatie van de bodem wordt gebruikt, d.w.z. incubatie in één keer of als een reeks afzonderlijke bodemmonsters (zie punt 1.7.1.2). Het waterverlies moet tot een minimum worden beperkt maar gasuitwisseling moet tijdens de test mogelijk zijn (de testbakken kunnen bijvoorbeeld met geperforeerde polyetheenfolie worden afgedekt). Wanneer vluchtige stoffen worden getest, moeten er afsluitbare gasdichte bakken worden gebruikt. Deze moeten zo groot zijn dat het bodemmonster ongeveer een kwart van hun volume beslaat.

Er wordt standaardlaboratoriumapparatuur gebruikt, waaronder:

— een schudapparaat: een mechanische schudmachine of gelijkwaardige apparatuur;

— een centrifuge (3 000 g) of filtreerapparaat (met nitraatvrij filtreerpapier);

— een instrument voor nitraatanalyse met een afdoende gevoeligheid en reproduceerbaarheid.

1.6.2. **Selectie en aantal bodemsoorten**

Er wordt één bodemsoort gebruikt. De aanbevolen kenmerken van de bodem zijn:

— zandgehalte: minimaal 50 % en maximaal 75 %;

— pH: 5,5-7,5;

— organisch koolstofgehalte: 0,5-1,5 %;

— de microbiële biomassa moet worden gemeten (8)(9) en het koolstofgehalte daarvan moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn.

In de meeste gevallen levert een bodem met deze kenmerken de ongunstigste situatie op, aangezien de adsorptie van de teststof minimaal is en de beschikbaarheid voor de flora maximaal. Een test met andere bodemsoorten is dan ook meestal niet nodig. In bepaalde gevallen, bijvoorbeeld wanneer de teststof naar verwachting vooral bij bepaalde bodemsoorten zoals zure bosgrond zal worden gebruikt of bij elektrostatisch geladen chemische stoffen, kan het echter nodig zijn nog een andere bodemsoort te gebruiken.

▼B

1.6.3. **Verzameling en opslag van de bodemmonsters**

1.6.3.1. *Verzameling*

Er moet gedetailleerde informatie beschikbaar zijn over de geschiedenis van de locatie waar de testbodem wordt verzameld, zoals de exacte ligging, de vegetatie, de data van behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met organische en anorganische mest, toevoegingen van biologisch materiaal en onopzettelijke verontreinigingen. De voor de verzameling van de bodem gekozen locatie moet op lange termijn kunnen worden gebruikt. Permanente weidegrond en velden met eenjarige graangewassen (behalve maïs) of dicht ingezaaide groenbemestingsgewassen zijn geschikt. De gekozen monsternemingsplaats mag gedurende ten minste één jaar vóór de monsterneming niet met gewasbeschermingsmiddelen zijn behandeld. Ook mag er gedurende ten minste zes maanden geen organische mest zijn opgebracht. Het gebruik van anorganische mest is alleen aanvaardbaar wanneer dit in overeenstemming met de eisen van het gewas is en er mogen gedurende ten minste drie maanden na de opbrenging van de mest geen monsters worden genomen. Het gebruik van grond die is behandeld met meststoffen waarvan bekend is dat ze biocide-effecten hebben (b.v. calciumcyaanamide) moet worden vermeden.

Gedurende of vlak na lange perioden (meer dan 30 dagen) van droogte of doordrenking van de bodem mogen er geen monsters worden genomen. Bij een omgeploegde bodem moeten de monsters van een diepte van 0 tot 20 cm worden genomen. Bij grasland (weidegrond) of andere bodemsoorten waar gedurende lange perioden (ten minste één teeltseizoen) niet geploegd wordt, kan de maximale monsterdiepte iets groter dan 20 cm (b.v. maximaal 25 cm) zijn.

De bakken waarin en de temperatuur waarbij de bodemmonsters worden vervoerd, moeten zodanig zijn dat de oorspronkelijke eigenschappen van de bodem niet significant veranderen.

1.6.3.2. *Opslag*

Het gebruik van grond die net van het veld komt, verdient de voorkeur. Als opslag in het laboratorium niet kan worden vermeden, kan de grond gedurende maximaal drie maanden in het donker bij 4±2 ^{o}C worden bewaard. Tijdens de opslag van grond moet er voor aërobe omstandigheden worden gezorgd. Als de grond wordt verzameld in gebieden waar deze gedurende ten minste drie maanden per jaar bevriest, is opslag gedurende zes maanden bij - 18 ^{o}C tot - 22 ^{o}C mogelijk. Vóór elk experiment wordt de microbiële biomassa van opgeslagen grond gemeten; het koolstofgehalte van de biomassa moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn (zie punt 1.6.2).

1.6.4. **Behandeling en voorbereiding van de grond voor de test**

1.6.4.1. *Pre-incubatie*

Als de grond opgeslagen was (zie punt 1.6.3.2), wordt pre-incubatie gedurende 2 tot 28 dagen aanbevolen. De temperatuur en het vochtgehalte van de bodem tijdens de pre-incubatie moeten vergelijkbaar zijn met die tijdens de test (zie de punten 1.6.4.2 en 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Fysisch-chemische kenmerken*

De grond wordt met de hand ontdaan van grote voorwerpen (stenen, delen van planten enz.) en zonder overmatig drogen vochtig gezeefd tot een deeltjesgrootte van maximaal 2 mm. Het vochtgehalte van het bodemmonster moet met gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden aangepast tot 40-60 % van het maximale watergehalte.

1.6.4.3. *Verbetering met organisch substraat*

De bodem wordt verbeterd met een geschikt organisch substraat, zoals verpoederd luzerne/grasmeel (hoofdbestanddeel *Medicago sativa)* met een C/N-verhouding tussen 12/1 en 16/1. De aanbevolen luzerne/bodem-verhouding is 5 gram luzerne per kg bodem (drooggewicht).

1.6.5. **Voorbehandeling van de teststof voordat deze op de bodem wordt gebracht**

De teststof wordt normaal gesproken met behulp van een draagstof opgebracht. Dit kan water zijn (voor in water oplosbare stoffen) of een inerte vaste stof zoals fijn kwartszand (deeltjesgrootte 0,1-0,5 mm). Andere vloeibare draagstoffen dan water (b.v. organische oplosmiddelen zoals aceton of chloroform) moeten worden vermeden omdat deze de microflora kunnen aantasten. Als zand als draagstof wordt gebruikt, kan deze worden gecoat met de in een geschikt oplosmiddel opgeloste of gesuspendeerde teststof. In dat geval moet het oplosmiddel vóór het mengen met de bodem door verdamping worden verwijderd. Voor een optimale verdeling van de teststof in de bodem wordt een verhouding van 10 g zand per kg grond (drooggewicht) aanbevolen. De controlemonsters worden behandeld met uitsluitend een even grote hoeveelheid water en/of kwartszand.

Bij het testen van vluchtige stoffen moeten verliezen tijdens de behandeling zoveel mogelijk worden voorkomen en moet er naar een homogene verdeling in de bodem worden gestreefd (de teststof kan bijvoorbeeld op verschillende plaatsen in de bodem worden geïnjecteerd).

1.6.6. **Testconcentraties**

Als er landbouwchemicaliën worden getest, moeten er ten minste twee concentraties worden gebruikt. De laagste concentratie moet ten minste overeenkomen met de maximale hoeveelheid die naar verwachting in de praktijk in de bodem terecht zal komen, terwijl de hoogste concentratie een veelvoud van de laagste concentratie moet zijn. Bij de berekening van de concentratie van de aan de bodem toegevoegde teststof wordt uitgegaan van een uniforme vermenging in de bodem tot een diepte van 5 cm en een dichtheid van de droge grond van 1,5. Voor landbouwchemicaliën die rechtstreeks op de bodem worden gebracht en voor chemische stoffen waarvoor de hoeveelheid die op de bodem terechtkomt voorspelbaar is, worden als testconcentratie de maximale PEC (predicted environmental concentration) en het vijfvoud van deze concentratie aanbevolen. Stoffen die naar verwachting meer dan één keer per seizoen op de bodem worden gebracht, moeten worden getest bij concentraties die worden berekend door de PEC te vermenigvuldigen met het aantal keren dat dit naar verwachting maximaal gebeurt. De hoogste geteste concentratie mag echter niet hoger zijn dan tien keer de maximale per keer opgebrachte hoeveelheid. Als andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt een meetkundige reeks van ten minste vijf concentraties gebruikt. De geteste concentraties moeten het interval bestrijken dat voor de bepaling van de EC_x-waarden nodig is.

▼B

1.7. UITVOERING VAN DE TEST

1.7.1. **Blootstellingsomstandigheden**

1.7.1.1. *Behandeling en controle*

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in drie even zware porties verdeeld. Twee porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof (controle). Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt minimaal een bepaling in triplo aanbevolen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in zes even zware porties verdeeld. Vijf porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof. Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt een bepaling in triplo aanbevolen. Er moet worden gezorgd voor een homogene verdeling van de teststof in de behandelde bodemmonsters. Bij het mengen moeten comprimering en kluitvorming van de grond worden voorkomen.

1.7.1.2. *Incubatie van de bodemmonsters*

Incubatie van de bodemmonsters kan op twee manieren gebeuren: als één monster voor elke behandelde en onbehandelde bodem of als een reeks aparte even grote submonsters voor elke behandelde en onbehandelde bodem. Wanneer vluchtige stoffen worden getest, mag de test echter uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd. Wanneer de grond als één monster wordt geïncubeerd, worden grote hoeveelheden van elke behandelde en onbehandelde bodem geïncubeerd en worden tijdens de test waar nodig submonsters voor analyse genomen. De hoeveelheid die aanvankelijk voor elke behandelde en onbehandelde bodem wordt geïncubeerd, is afhankelijk van de grootte van de submonsters, het aantal replicaatbepalingen dat voor de analyse wordt gebruikt en het verwachte maximale aantal monsternemingstijdstippen. Grond die als één monster wordt geïncubeerd, moet vóór het nemen van submonsters grondig worden gemengd. Wanneer de bodem als een reeks aparte bodemmonsters wordt geïncubeerd, wordt elke portie behandelde en onbehandelde grond in het vereiste aantal submonsters verdeeld, die worden gebruikt wanneer ze nodig zijn. Wanneer bij een experiment meer dan twee monstememingstijdstippen kunnen worden verwacht, moeten er voldoende submonsters voor alle replicaatbepalingen en alle monsternemingstijdstippen worden gemaakt. Ten minste drie replicaatmonsters van de testbodem worden onder aërobe omstandigheden geïncubeerd (zie punt 1.7.1.1). Tijdens alle tests moeten er geschikte bakken worden gebruikt met voldoende ruimte boven de grond om te voorkomen dat er anaërobe omstandigheden ontstaan. Wanneer er vluchtige stoffen worden getest, mag de test uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd.

1.7.1.3. *Testomstandigheden en duur van de test*

De test wordt in het donker bij kamertemperatuur (20±2 °C) uitgevoerd. Het vochtgehalte van de bodemmonsters moet gedurende de test op 40-60 % van het maximale watergehalte van de bodem worden gehouden (zie punt 1.6.4.2) met een bereik van ±5 %. Indien nodig kan gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden toegevoegd.

De minimale duur van een test is 28 dagen. Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de nitraatvorming in behandelde en controlemonsters vergeleken. Als op dag 28 het verschil groter dan 25 % is, wordt de test voortgezet tot het verschil 25 % of minder is maar maximaal gedurende 100 dagen. Voor andere stoffen dan landbouwchemicaliën wordt de test na 28 dagen beëindigd. Op dag 28 wordt de hoeveelheid nitraat in de behandelde en de controlemonsters bepaald en worden de EC_x-waarden berekend.

▼B

1.7.2. **Monsterneming en analyse van de grond**

1.7.2.1. *Schema voor de monsterneming*

Als er landbouwchemicaliën worden getest, worden de bodemmonsters op de dagen 0, 7, 14 en 28 op nitraat geanalyseerd. Als er een langere test nodig is, wordt na dag 28 om de 14 dagen een analyse uitgevoerd.

Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, worden er ten minste vijf testconcentraties gebruikt en worden de bodemmonsters aan het begin (dag 0) en aan het eind van de blootstellingsperiode (dag 28) op nitraat geanalyseerd. Als dit nodig wordt geacht, kan er bijvoorbeeld op dag 7 een tussentijdse meting worden gedaan. De op dag 28 verkregen gegevens worden gebruikt om de EC_x-waarde voor de chemische stof te bepalen. Als dat gewenst is, kunnen de gegevens van de controlemonsters op dag 0 worden gebruikt om de oorspronkelijke hoeveelheid nitraat in de bodem te bepalen.

1.7.2.2. *Analyse van de bodemmonsters*

Op elk monsternemingstijdstip wordt in elk replicaatmonster (behandeld en controle) de gevormde hoeveelheid nitraat bepaald. Het nitraat wordt uit de bodem geëxtraheerd door de monsters met een geschikte extractievloeistof, bijvoorbeeld een 0,1 M kaliumchlorideoplossing, te schudden. Een hoeveelheid van 5 ml KCl-oplossing per gram grond (drooggewicht) wordt aanbevolen. Om de extractie te optimaliseren, mogen de bakken met grond en extractievloeistof ten hoogste halfvol zijn. De mengsels worden gedurende 60 minuten bij 150 rpm geschud. De mengsels worden gecentrifugeerd of gefiltreerd en de vloeistoffase wordt op nitraat geanalyseerd. Deeltjesvrije vloeibare extracten kunnen vóór analyse maximaal zes maanden bij - 20±5 ^{o}C worden bewaard.

2. **GEGEVENS**

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Als de test met landbouwchemicaliën wordt uitgevoerd, wordt de gevormde hoeveelheid nitraat in elk replicaat-bodemmonster geregistreerd en worden de gemiddelde waarden van alle replicaatbepalingen in tabelvorm vermeld. De omzetting van stikstof wordt met adequate en algemeen erkende statistische methoden (b.v. een F-test, niveau met 5 % significantie) bepaald. De gevormde hoeveelheid nitraat wordt uitgedrukt in mg nitraat/kg drooggewicht bodem/dag. De nitraatvorming bij elke behandelde bodem wordt vergeleken met de controle en de procentuele afwijking van de controle wordt berekend.

Als de test met andere stoffen dan landbouwchemicaliën wordt uitgevoerd, wordt de gevormde hoeveelheid nitraat in elk replicaat-bodemmonster bepaald en wordt er een dosis/respons-curve samengesteld om de EC_X-waarden te bepalen. De hoeveelheid nitraat (in mg nitraat/kg drooggewicht bodem) die na 28 dagen in de behandelde monsters wordt gevonden, wordt vergeleken met de controle. Uit deze gegevens wordt de procentuele remming voor elke testconcentratie berekend. Deze percentages worden uitgezet tegen de concentratie en met behulp van statistische procedures worden de EC_x-waarden berekend. Met behulp van standaardprocedures worden ook de betrouwbaarheidsgrenzen ($p = 0,95$) voor de berekende EC_X bepaald (10)(ll)(12).

Teststoffen die grote hoeveelheden stikstof bevatten, kunnen bijdragen tot de tijdens de test gevormde hoeveelheid nitraat. Als deze stoffen bij een hoge concentratie worden getest (b.v. stoffen waarvan wordt aangenomen dat ze herhaaldelijk worden opgebracht), moeten er afdoende controles in de test worden opgenomen (d.w.z. bodem met teststof maar zonder plantenmeel). Bij de berekening van de EC_X moet dan rekening worden gehouden met de gegevens van deze controles.

▼B

2.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Wanneer de resultaten van tests met landbouwchemicaliën worden geëvalueerd en het verschil in de nitraatvorming tussen de laagste concentratie (d.w.z. de maximale verwachte concentratie) en de controle op enig monsternemingstijdstip na dag 28 niet groter dan 25 % is, kan worden geconcludeerd dat het product op lange termijn geen invloed op de omzetting van stikstof in de bodem heeft. Wanneer de resultaten van tests met andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden geëvalueerd, worden de EC_{50}, de EC_{25} en/of de EC_{10} gebruikt.

3. **RAPPORTAGE**

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Een volledige specificatie van de gebruikte bodem met vermelding van o.a.:

— de geografische kenmerken van de locatie (lengte en breedte);

— informatie over het verleden van de locatie (d.w.z. vegetatie, behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met meststoffen, onopzettelijke verontreinigingen enz.);

— het gebruikspatroon (d.w.z. landbouwgrond, bos enz.);

— de monsternemingsdiepte (in cm);

— het gehalte aan zand/slib/klei (in % drooggewicht);

— de pH (in water);

— het gehalte aan organische koolstof (in % drooggewicht);

— het stikstofgehalte (in % drooggewicht);

— de aanvankelijke nitraatconcentratie (in mg nitraat/kg drooggewicht);

— de kation-uitwisselingscapaciteit (in mmol/kg);

— de microbiële biomassa in percentage totale organische koolstof;

— de referentie van de voor de bepaling van elke parameter gebruikte methode;

— alle informatie over de verzameling en opslag van de bodemmonsters;

— een gedetailleerde beschrijving van de eventuele pre-incubatie van de grond.

De teststof:

— de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;

— de chemische identificatiegegevens, indien relevant, met inbegrip van de structuurformule, de zuiverheid (d.w.z. het percentage werkzaam bestanddeel voor gewasbeschermingsmiddelen) en het stikstofgehalte.

Het substraat:

— de herkomst van het substraat;

— de samenstelling (d.w.z. luzernemeel, luzerne/grasmeel);

— koolstof- en stikstofgehalte (in % drooggewicht);

— maaswijdte van de zeef (in mm).

▼B

De testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over de verbetering van de bodem met organisch substraat;

— het aantal concentraties van de teststof en, indien van toepassing, een motivering voor de keuze van de concentraties;

— gedetailleerde gegevens over de manier waarop de teststof op de bodem wordt gebracht;

— de incubatietemperatuur;

— het vochtgehalte van de bodem aan het begin van en tijdens de test;

— de gebruikte incubatiemethode (d.w.z. in één portie of als een reeks aparte submonsters);

— het aantal replicaatbepalingen;

— de monsternemingstijdstippen;

— de voor de extractie van nitraat uit de bodem gebruikte methode.

De resultaten:

— de voor de nitraatanalyse gebruikte analyseprocedure en -apparatuur;

— de resultaten van de nitraatanalyse, met vermelding van de afzonderlijke en gemiddelde waarden, in tabelvorm;

— de verschillen tussen de replicaatbepalingen bij de behandelde en de controlemonsters;

— een verklaring voor correcties in de berekeningen, indien van toepassing;

— het procentuele verschil in de nitraatvorming op elk monsternemingstijdstip of, indien van toepassing, de EC_{50}-waarde met het 95 %-betrouwbaarheidsinterval, andere EC_x-waarden (d.w.z. EC_{25} of EC_{10}) met betrouwbaarheidsintervallen en een grafische voorstelling van de dosis/respons- curve;

— de statistische behandeling van de resultaten;

— alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4. **REFERENTIES**

(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 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee 1SO/TC 190/SC 4: Soil Quality — Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MICRO-ORGANISMEN IN DE BODEM: BEPALING VAN DE OMZETTING VAN KOOLSTOF

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 217 (2000) van de OESO.

1.1 INLEIDING

In deze testmethode wordt een laboratoriumtest beschreven om te onderzoeken welke effecten gewasbeschermingsmiddelen en wellicht andere chemische stoffen na één blootstelling op lange termijn kunnen hebben op de omzetting van koolstof door micro-organismen in de bodem. De test is in eerste instantie gebaseerd op aanbevelingen van de Organisatie voor de bescherming van planten in Europa en het Middellandse-Zeegebied (1). Er is echter ook rekening gehouden met andere richtsnoeren, bijvoorbeeld van de Biologische Bundesanstalt in Duitsland (2), het Environmental Protection Agency in de VS (3) en de SET AC (4). Tijdens een workshop van de OESO over de selectie van bodem/sediment in Belgirate in Italië in 1995 (5) is overeenstemming bereikt over het aantal en de aard van de in deze test te gebruiken bodemmonsters. De aanbevelingen voor het verzamelen, behandelen en bewaren van de bodemmonsters zijn gebaseerd op ISO-richtsnoeren (6) en aanbevelingen van de workshop in Belgirate.

Bij de beoordeling en evaluatie van toxische kenmerken van teststoffen kan het nodig zijn de effecten op de microbiële activiteit van de bodem te bepalen, bijvoorbeeld wanneer er gegevens over de potentiële neveneffecten van gewasbeschermingsmiddelen op de microflora van de bodem nodig zijn of wanneer wordt verwacht dat de micro-organismen in de bodem aan andere chemische stoffen dan gewasbeschermingsmiddelen worden blootgesteld. De bepaling van de omzetting van koolstof wordt uitgevoerd om de effecten van deze chemische stoffen op de microflora van de bodem te bepalen. Als er landbouwchemicaliën (b.v. gewasbeschermingsmiddelen, kunstmest of bosbouwchemicaliën) worden getest, worden zowel de bepaling van de omzetting van koolstof als de bepaling van de omzetting van stikstof uitgevoerd. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, volstaat de bepaling van de omzetting van stikstof. Als de EC_{50} bij de bepaling van de omzetting van stikstof voor dergelijke stoffen echter binnen het bereik valt van de waarde die voor in de handel verkrijgbare nitrificatieremmers (zoals nitrapyrin) wordt gevonden, kan een bepaling van de omzetting van koolstof worden uitgevoerd om nadere informatie te verkrijgen.

De bodem bestaat uit levende en niet-levende componenten die complexe en heterogene mengsels kunnen vormen. Micro-organismen spelen een belangrijke rol bij de afbraak en omzetting van organisch materiaal in vruchtbare bodem en veel soorten dragen bij tot verschillende aspecten van de vruchtbaarheid van de bodem. Een verstoring van deze biochemische processen op lange termijn kan mogelijkerwijs de cycli van nutriënten verstoren en verandering brengen in de vruchtbaarheid van de bodem. Omzetting van koolstof en stikstof vindt in elke vruchtbare bodem plaats. Hoewel de voor deze processen verantwoordelijke microbiële levensgemeenschappen van bodem tot bodem verschillen, zijn de omzettingsroutes in grote lijnen gelijk.

▼B

Deze testmethode is bedoeld om te detecteren welke schadelijke effecten een stof op lange termijn op het omzettingsproces van koolstof in aërobe bodem aan het oppervlak kan hebben. De test is gevoelig voor veranderingen in de grootte en activiteit van de microbiële levensgemeenschappen die verantwoordelijk zijn voor de omzetting van koolstof, aangezien deze gemeenschappen daarbij zowel chemische stress als een koolstoftekort ondervinden. Er wordt een zandige bodem met weinig organisch materiaal gebruikt. Deze bodem wordt met de teststof behandeld en geïncubeerd onder omstandigheden die een snel microbieel metabolisme mogelijk maken. Onder deze omstandigheden raken de bronnen van gemakkelijk beschikbare koolstof in de bodem snel uitgeput. Dit leidt tot een koolstoftekort waardoor microbiële cellen enerzijds afsterven en anderzijds aangezet worden tot latentie en/of sporenvorming. Als de test meer dan 28 dagen duurt, kan de som van deze reacties in controles (onbehandelde bodem) worden gemeten als een geleidelijk verlies van metabool actieve microbiële biomassa (7). Als de biomassa in bodem met koolstof-stress onder de testomstandigheden door de aanwezigheid van een chemische stof wordt aangetast, komt deze wellicht niet op hetzelfde niveau terug als in de controles. Dit betekent dat een verstoring door de teststof, ongeacht op welk moment tijdens de test dit gebeurt, vaak tot het einde van de test aanhoudt.

Deze testmethode is ontwikkeld uit tests die in eerste instantie bedoeld waren voor stoffen waarvoor kan worden geraamd welke hoeveelheid de bodem bereikt. Dit geldt bijvoorbeeld voor gewasbeschermingsmiddelen die in bekende hoeveelheden op het veld worden gebracht. Voor landbouwchemicaliën is het voldoende twee doses te testen die relevant zijn voor de opgebrachte hoeveelheid die wordt verwacht of geraamd. Landbouwchemicaliën kunnen als werkzame stof of als geformuleerd product worden getest. Het gebruik van de test blijft echter niet beperkt tot stoffen met een voorspelbare milieuconcentratie. Door zowel de op de bodem gebrachte hoeveelheid teststof als de manier waarop de gegevens worden geëvalueerd, te veranderen, kan de test ook worden gebruikt voor chemische stoffen waarvoor niet bekend is hoeveel er naar verwachting in de bodem terecht zal komen. Daarom worden voor andere stoffen dan landbouwchemicaliën de effecten van een reeks concentraties op de omzetting van koolstof bepaald. De gegevens uit deze tests worden gebruikt om een dosis/respons-curve samen te stellen en EC_x-waarden te berekenen, waarbij x het procentuele effect aangeeft.

1.2 DEFINITIES

Omzetting van koolstof: de afbraak van organisch materiaal door micro-organismen tot het anorganische eindproduct kooldioxide.

EC_x (effectieve concentratie): de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van koolstof in kooldioxide met x procent.

EC_{50} (mediaan van de effectieve concentratie): de concentratie van de teststof in de bodem die leidt tot een remming van de omzetting van koolstof in kooldioxide met 50 procent.

1.3 REFERENTIESTOFFEN

Geen.

▼B

1.4 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Gezeefde bodem wordt hetzij behandeld met de teststof, hetzij niet behandeld (controle). Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt aanbevolen minimaal twee concentraties te testen die moeten worden gekozen op grond van de hoogste concentratie die op het veld wordt verwacht. Na 0, 7, 14 en 28 dagen incubatie worden monsters van de behandelde en de controlebodem met glucose gemengd en wordt de door glucose geïnduceerde ademhaling gedurende twaalf uur gemeten. De ademhaling wordt uitgedrukt in vrijgekomen kooldioxide (in mg kooldioxide/kg droge bodem/uur) of verbruikte zuurstof (in mg zuurstof/kg bodem/uur). De gemiddelde ademhaling in de behandelde bodemmonsters wordt vergeleken met de controlemonsters en de procentuele afwijking van de behandelde ten opzichte van de controlemonsters wordt berekend. Alle tests duren ten minste 28 dagen. Als op dag 28 het verschil tussen de behandelde en de controlebodem 25 % of groter is, worden de metingen om de veertien dagen voortgezet tot maximaal 100 dagen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de teststof in een reeks concentraties aan de bodemmonsters toegevoegd en wordt na 28 dagen de door glucose geïnduceerde ademhaling (d.w.z. de gemiddelde hoeveelheid gevormd kooldioxide of verbruikte zuurstof). De resultaten van tests met een reeks concentraties worden aan regressieanalyse onderworpen en de EC_x-waarden (d.w.z. de EC_{50}, de EC_{25} en/of de EC_{10}) worden berekend. Zie ook de definities.

1.5 GELDIGHEID VAN DE TEST

Bij landbouwchemicaliën wordt de evaluatie van de testresultaten gebaseerd op betrekkelijk kleine verschillen (gemiddeld ± 25 %) tussen het vrijgekomen kooldioxide of de verbruikte zuurstof in (of door) de behandelde en de controlemonsters en grote verschillen in de controles kunnen dan ook tot onjuiste resultaten leiden. Het verschil tussen replicaat-controlemonsters moet derhalve kleiner zijn dan ± 15 %.

1.6 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1 **Apparatuur**

Er worden testbakken van chemisch inert materiaal gebruikt. Het volume moet geschikt zijn voor de procedure die voor de incubatie van de bodem wordt gebruikt, d.w.z. incubatie in één keer of als een reeks afzonderlijke bodemmonsters (zie punt 1.7.1.2). Het waterverlies moet tot een minimum worden beperkt maar gasuitwisseling moet tijdens de test mogelijk zijn (de testbakken kunnen bijvoorbeeld met geperforeerde polyetheenfolie worden afgedekt). Wanneer vluchtige stoffen worden getest, moeten er afsluitbare gasdichte bakken worden gebruikt. Deze moeten zo groot zijn dat het bodemmonster ongeveer een kwart van hun volume beslaat.

Voor de bepaling van de door glucose geïnduceerde ademhaling zijn incubatiesystemen en instrumenten voor de meting van het gevormde kooldioxide of de verbruikte zuurstof nodig. Voor voorbeelden van dergelijke systemen en instrumenten wordt naar de literatuur verwezen (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Selectie en aantal bodemsoorten**

Er wordt één bodemsoort gebruikt. De aanbevolen kenmerken van de bodem zijn:

— zandgehalte: minimaal 50 % en maximaal 75 %;

▼B

— pH: 5,5-7,5;

— organisch koolstofgehalte: 0,5-1,5 %;

— de microbiële biomassa moet worden gemeten (12)(13) en het koolstofgehalte daarvan moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn.

In de meeste gevallen levert een bodem met deze kenmerken de ongunstigste situatie op, aangezien de adsorptie van de teststof tot een minimum wordt beperkt en de beschikbaarheid van de stof voor de flora maximaal is. Een test met andere bodemsoorten is dan ook meestal niet nodig. In bepaalde gevallen, bijvoorbeeld wanneer de teststof naar verwachting vooral bij bepaalde bodemsoorten zoals zure bosgrond zal worden gebruikt of bij elektrostatisch geladen chemische stoffen, kan het echter nodig zijn een andere bodemsoort te gebruiken.

1.6.3 **Verzameling en opslag van de bodemmonsters**

1.6.3.1 *Verzameling*

Er moet gedetailleerde informatie beschikbaar zijn over de geschiedenis van de locatie waar de testbodem wordt verzameld, zoals de exacte ligging, de vegetatie, de data van behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met organische en anorganische mest, toevoegingen van biologisch materiaal en onopzettelijke verontreinigingen. De voor de verzameling van de bodem gekozen locatie moet op lange termijn kunnen worden gebruikt. Permanente weidegrond en velden met eenjarige graangewassen (behalve maïs) of dicht ingezaaide groenbemestingsgewassen zijn geschikt. De gekozen monstememingsplaats mag gedurende ten minste één jaar vóór de monsterneming niet met gewasbeschermingsmiddelen zijn behandeld. Ook mag er gedurende ten minste zes maanden geen organische mest zijn opgebracht. Het gebruik van anorganische mest is alleen aanvaardbaar wanneer dit in overeenstemming met de eisen van het gewas is en er mogen gedurende ten minste drie maanden na de opbrenging van de mest geen monsters worden genomen. Het gebruik van grond die is behandeld met meststoffen waarvan bekend is dat ze biocide-effecten hebben (b.v. calciumcyaanamide) moet worden vermeden.

Gedurende of vlak na lange perioden (meer dan 30 dagen) van droogte of doordrenking van de bodem mogen er geen monsters worden genomen. Bij een omgeploegde bodem moeten de monsters van een diepte van 0 tot 20 cm worden genomen. Bij grasland (weidegrond) of andere bodemsoorten waar gedurende lange perioden (ten minste één teeltseizoen) niet geploegd wordt, kan de maximale monsterdiepte iets groter dan 20 cm (b.v. maximaal 25 cm) zijn. De bakken waarin en de temperatuur waarbij de bodemmonsters worden vervoerd, moeten zodanig zijn dat de oorspronkelijke eigenschappen van de bodem niet significant veranderen.

1.63.2 *Opslag*

Het gebruik van grond die net van het veld komt, verdient de voorkeur. Als opslag in het laboratorium niet kan worden vermeden, kan de grond gedurende maximaal drie maanden in het donker bij 4 ± 2 ^{o}C worden bewaard. Tijdens de opslag van grond moet er voor aërobe omstandigheden worden gezorgd. Als de grond wordt verzameld in gebieden waar deze gedurende ten minste drie maanden per jaar bevriest, is opslag gedurende zes maanden bij - 18 ^{o}C mogelijk. Vóór elk experiment wordt de microbiële biomassa van opgeslagen grond gemeten; het koolstofgehalte van de biomassa moet minimaal 1 % van het totale organische koolstofgehalte van de bodem zijn (zie punt 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Behandeling en voorbereiding van de grond voor de test**

1.6.4.1 *Pre-incubatie*

Als de grond opgeslagen was (zie de punten 1.6.4.2 en 1.7.1.3), wordt pre-incubatie gedurende 2 tot 28 dagen aanbevolen. De temperatuur en het vochtgehalte van de bodem tijdens de pre-incubatie moeten vergelijkbaar zijn met die tijdens de test (zie de punten 1.6.4.2 en 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Fysisch-chemische kenmerken*

De grond wordt met de hand ontdaan van grote voorwerpen (stenen, delen van planten enz.) en zonder overmatig drogen vochtig gezeefd tot een deeltjesgrootte van maximaal 2 mm. Het vochtgehalte van het bodemmonster moet met gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden aangepast tot 40-60 % van het maximale watergehalte.

1.6.5 **Voorbehandeling van de teststof voordat deze op de bodem wordt gebracht**

De teststof wordt normaal gesproken met behulp van een draagstof opgebracht. Dit kan water zijn (voor in water oplosbare stoffen) of een inerte vaste stof zoals fijn kwartszand (deeltjesgrootte 0,1-0,5 mm). Andere vloeibare draagstoffen dan water (b.v. organische oplosmiddelen zoals aceton of chloroform) moeten worden vermeden omdat deze de microflora kunnen aantasten. Als zand als draagstof wordt gebruikt, kan deze worden gecoat met de in een geschikt oplosmiddel opgeloste of gesuspendeerde teststof. In dat geval moet het oplosmiddel vóór het mengen met de bodem door verdamping worden verwijderd. Voor een optimale verdeling van de teststof in de bodem wordt een verhouding van 10 g zand per kg grond (droogge-wicht) aanbevolen. De controlemonsters worden behandeld met uitsluitend dezelfde hoeveelheid water en/of kwartszand.

Bij het testen van vluchtige stoffen moeten verliezen tijdens de behandeling worden voorkomen en moet er naar een homogene verdeling in de bodem worden gestreefd (de teststof kan bijvoorbeeld op verschillende plaatsen in de bodem worden geïnjecteerd).

1.6.6 **Testconcentraties**

Als er gewasbeschermingsmiddelen of andere chemische stoffen met een voorspelbare milieuconcentratie worden getest, moeten er ten minste twee concentraties worden gebruikt. De laagste concentratie moet ten minste overeenkomen met de maximale hoeveelheid die naar verwachting in de praktijk in de bodem terecht zal komen, terwijl de hoogste concentratie een veelvoud van de laagste concentratie moet zijn. Bij de berekening van de concentratie van de aan de bodem toegevoegde teststof wordt uitgegaan van een uniforme vermenging in de bodem tot een diepte van 5 cm en een dichtheid van de droge grond van 1,5. Voor landbouwchemicaliën die rechtstreeks op de bodem worden gebracht en voor chemische stoffen waarvoor de hoeveelheid die in de bodem terechtkomt voorspelbaar is, worden als testconcentratie de voorspelbare milieuconcentratie (PEC — predictable environmental concentration) en het vijfvoud van deze concentratie aanbevolen. Stoffen die naar verwachting meer dan een keer per seizoen op de bodem worden gebracht, moeten worden getest bij concentraties die worden berekend door de PEC te vermenigvuldigen met het aantal keren dat dit naar verwachting maximaal gebeurt. De hoogste geteste concentratie mag echter niet hoger zijn dan tien keer de maximale per keer opgebrachte hoeveelheid.

Als andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt een meetkundige reeks van ten minste vijf concentraties gebruikt. De geteste concentraties moeten het interval bestrijken dat voor de bepaling van de EC_x-waarden nodig is.

▼B

1.7 UITVOERING VAN DE TEST

1.7.1 **Hlootstellingsomstandigheden**

1.7.1.1 *Behandeling en controle*

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in drie even zware porties verdeeld. Twee porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof (controle). Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt minimaal een bepaling in triplo aanbevolen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de grond in zes even zware porties verdeeld. Vijf porties worden gemengd met de draagstof die de teststof bevat en de andere portie met de draagstof zonder teststof. Voor zowel de behandelde als de controlegrond wordt een bepaling in triplo aanbevolen. Er moet worden gezorgd voor een homogene verdeling van de teststof in de behandelde bodemmonsters. Bij het mengen moeten comprimering en kluitvorming van de grond worden voorkomen.

1.7.1.2 *Incubatie van de bodemmonsters*

Incubatie van de bodemmonsters kan op twee manieren gebeuren: als één monster voor elke behandelde en onbehandelde bodem of als een reeks aparte even grote submonsters voor elke behandelde en onbehandelde bodem. Wanneer vluchtige stoffen worden getest, mag de test echter uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd. Wanneer de grond als één monster wordt geïncubeerd, worden grote hoeveelheden van elke behandelde en onbehandelde bodem geïncubeerd en worden tijdens de test waar nodig submonsters voor analyse genomen. De hoeveelheid die aanvankelijk voor elke behandelde en onbehandelde bodem wordt geïncubeerd, is afhankelijk van de grootte van de submonsters, het aantal replicaatbepalingen dat voor de analyse wordt gebruikt en het verwachte maximale aantal monsternemingstijdstippen. Grond die als één monster wordt geïncubeerd, moet vóór het nemen van submonsters grondig worden gemengd. Wanneer de bodem als een reeks aparte bodemmonsters wordt geïncubeerd, wordt elke portie behandelde en onbehandelde grond in het vereiste aantal submonsters verdeeld, die worden gebruikt wanneer ze nodig zijn. Wanneer bij een experiment meer dan twee monstememingstijdstippen kunnen worden verwacht, moeten er voldoende submonsters voor alle replicaatbepalingen en alle monsternemingstijdstippen worden gemaakt. Ten minste drie replicaatmonsters van de testbodem worden onder aërobe omstandigheden geïncubeerd (zie punt 1.7.1.1). Tijdens alle tests moeten er geschikte bakken worden gebruikt met voldoende ruimte boven de grond om te voorkomen dat er anaërobe omstandigheden ontstaan. Wanneer er vluchtige stoffen worden getest, mag de test uitsluitend met een reeks aparte submonsters worden uitgevoerd.

1.7.1.3 *Testomstandigheden en duur van de test*

De test wordt in het donker bij kamertemperatuur (20 ± 2 °C) uitgevoerd. Het vochtgehalte van de bodemmonsters moet gedurende de test op 40-60 % van het maximale watergehalte van de bodem worden gehouden (zie punt 1.6.4.2) met een bereik van ± 5 %. Indien nodig kan gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden toegevoegd.

De minimale duur van een test is 28 dagen. Als er landbouwchemicaliën worden getest, worden de hoeveelheden vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in de behandelde en de controlemonsters vergeleken. Als op dag 28 het verschil groter dan 25 % is, wordt de test voortgezet tot het verschil 25 % of minder is maar maximaal gedurende 100 dagen. Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, wordt de test na 28 dagen beëindigd. Op dag 28 worden de hoeveelheden vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in de behandelde en de controlemonsters bepaald en worden de EC_x-waarden berekend.

▼B

1.7.2 **Monsterneming en analyse van de grond**

1.7.2.1 *Schema voor de monsterneming*

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de door glucose geïnduceerde ademhaling van de bodemmonsters op de dagen 0, 7, 14 en 28 bepaald. Als er een langere test nodig is, wordt na dag 28 om de 14 dagen een analyse uitgevoerd.

Als er andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden getest, worden er ten minste vijf testconcentraties gebruikt en wordt de door glucose geïnduceerde ademhaling van de bodemmonsters aan het begin (dag 0) en aan het eind van de blootstellingsperiode (dag 28) bepaald. Als dit nodig wordt geacht, kan er bijvoorbeeld op dag 7 een tussentijdse meting worden gedaan. De op dag 28 verkregen gegevens worden gebruikt om de EC_x-waarde voor de chemische stof te bepalen. Als dat gewenst is, kunnen de gegevens van de controlemonsters op dag 0 worden gebruikt om de oorspronkelijke hoeveelheid metabool actieve microbiële biomassa in de bodem te bepalen (12).

1.7.2.2 *Meling van de door glucose geïnduceerde ademhaling*

Op elk monsternemingstijdstip wordt in elk replicaatmonster (behandeld en controle) de door glucose geïnduceerde ademhaling bepaald. De bodemmonsters worden gemengd met een zodanige hoeveelheid glucose dat er onmiddellijk een maximale ademhalingsreactie optreedt. De hoeveelheid glucose die bij een bepaalde bodem nodig is om een maximale ademhalingsreactie te veroorzaken, kan bij een vooronderzoek met een reeks glucoseconcentraties worden bepaald (14). Voor een zandige bodem met 0,5-1,5 % organische koolstof is 2 000 tot 4 000 mg glucose per kg drooggewicht bodem echter meestal voldoende. De glucose kan met schoon kwartszand (10 g zand/kg drooggewicht bodem) tot poeder worden vermalen en homogeen met de bodem worden vermengd.

De met glucose verrijkte bodemmonsters worden geïncubeerd in geschikte apparatuur om de ademhaling continu, om het uur of om de twee uur bij 20 ± 2 °C te meten (zie punt 1.6.1). Het vrijgekomen kooldioxide of de verbruikte zuurstof wordt gedurende twaalf uur gemeten en de metingen dienen zo spoedig mogelijk te beginnen, d.w.z. binnen 1 tot 2 uur na de toevoeging van de glucose. De totale hoeveelheid gedurende de twaalf uur vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof wordt gemeten en de gemiddelde ademhaling wordt bepaald.

2. **GEGEVENS**

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Als er landbouwchemicaliën worden getest, wordt de hoeveelheid vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in elk replicaat-bodemmonster geregistreerd en worden de gemiddelde waarden van alle replicaatbepalingen in tabelvorm vermeld. De resultaten worden met adequate en algemeen erkende statistische methoden (b.v. een F-test, niveau met 5 % significantie) geëvalueerd. De door glucose geïnduceerde ademhaling wordt uitgedrukt in mg kooldioxide/kg drooggewicht bodem/uur of mg zuurstof/kg drooggewicht bodem/uur. De gemiddelde vorming van kooldioxide of het gemiddelde verbruik van zuurstof bij elke behandelde bodem wordt vergeleken met de controle en de procentuele afwijking van de controle wordt berekend.

▼B

Als de test met andere stoffen dan landbouwchemicaliën wordt uitgevoerd, wordt de hoeveelheid vrijgekomen kooldioxide of verbruikte zuurstof in elk replicaat-bodemmonster bepaald en wordt er een dosis/respons-curve samengesteld om de EC_x-waarden te bepalen. De door glucose geïnduceerde ademhaling (d.w.z. mg kooldioxide/kg drooggewicht bodem/uur of mg zuurstof/kg drooggewicht bodem/uur) die na 28 dagen in de behandelde monsters wordt bepaald, wordt vergeleken met de controle. Uit deze gegevens wordt de procentuele remming voor elke testconcentratie berekend. Deze percentages worden uitgezet tegen de concentratie en met behulp van statistische procedures worden de EC_x-waarden berekend. Met behulp van standaardprocedures worden ook de betrouwbaarheidsgrenzen ($p = 0,95$) voor de berekende EC_x bepaald (15)(16)(17).

2.2 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Wanneer de resultaten van tests met landbouwchemicaliën worden geëvalueerd en het verschil in de ademhaling tussen de laagste concentratie (d.w.z. de maximale verwachte concentratie) en de controle op enig monsternemingstijdstip na dag 28 niet groter dan 25 % is, kan worden geconcludeerd dat het product op lange termijn geen invloed op de omzetting van koolstof in de bodem heeft. Wanneer de resultaten van tests met andere stoffen dan landbouwchemicaliën worden geëvalueerd, worden de EC_{50}, de EC_{25} en/of de EC_{10} gebruikt.

3. **RAPPORTAGE**

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Een volledige specificatie van de gebruikte bodem met vermelding van o.a.:

— de geografische kenmerken van de locatie (lengte en breedte);

— informatie over het verleden van de locatie (d.w.z. vegetatie, behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandelingen met meststoffen, onopzettelijke verontreinigingen enz.);

— het gebruikspatroon (d.w.z. landbouwgrond, bos enz.);

— de monsternemingsdiepte (in cm);

— het gehalte aan zand/slib/klei (in % drooggewicht);

— de pH (in water);

— het gehalte aan organische koolstof (in % drooggewicht);

— het stikstofgehalte (in % drooggewicht);

— de kation-uitwisselingscapaciteit (in mmol/kg);

— de oorspronkelijke microbiële biomassa in percentage totale organische koolstof;

— de referentie van de voor de bepaling van elke parameter gebruikte methode;

— alle informatie over de verzameling en opslag van de bodemmonsters;

— een gedetailleerde beschrijving van de eventuele pre-incubatie van de grond.

▼B

De teststof:

— de fysische aard en indien relevant de fysisch-chemische eigenschappen;

— de chemische identificatiegegevens, indien relevant, met inbegrip van de structuurformule, de zuiverheid (d.w.z. het percentage werkzaam bestanddeel voor gewasbeschermingsmiddelen) en het stikstofgehalte.

De testomstandigheden:

— gedetailleerde gegevens over de verbetering van de bodem met organisch substraat;

— het aantal concentraties van de teststof en, indien van toepassing, een motivering voor de keuze van de concentraties;

— gedetailleerde gegevens over de manier waarop de teststof op de bodem wordt gebracht;

— de incubatietemperatuur;

— het vochtgehalte van de bodem aan het begin van en tijdens de test;

— de gebruikte incubatiemethode (d.w.z. in één portie of als een reeks aparte submonsters);

— het aantal replicaatbepalingen;

— de monsternemingstijdstippen.

De resultaten:

— de voor de meting van de ademhaling gebruikte methode en apparatuur;

— de hoeveelheden kooldioxide of zuurstof, met vermelding van de afzonderlijke en gemiddelde waarden, in tabelvorm;

— de verschillen tussen de replicaatbepalingen bij de behandelde en de controlemonsters:

— een verklaring voor correcties in de berekeningen, indien van toepassing;

— het procentuele verschil in de door glucose geïnduceerde ademhaling op elk monsternemingstijdstip of, indien van toepassing, de EC_{50} met het 95 %-betrouwbaarheidsinterval, andere EC_x-waarden (d.w.z. EC_{25} of EC_{10}) met betrouwbaarheidsintervallen en een grafische voorstelling van de dosis/respons-curve;

— de statistische behandeling van de resultaten, indien van toepassing;

— alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4. **REFERENTIES**

(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 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N^{o} 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation- extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. AEROBE EN ANAEROBE OMZETTING IN DE BODEM

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 307 (2002) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Deze testmethode is gebaseerd op bestaande richtsnoeren (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). De hier beschreven methode is bedoeld om de aërobe en anaërobe omzetting van chemische stoffen in de bodem te evalueren. De experimenten zijn bedoeld om te bepalen i) wat de omzettingssnelheid van de teststof is en ii) wat de aard en de vormings- en afbraaksnelheid is van omzettingsproducten waaraan planten en bodemorganismen kunnen worden blootgesteld. Dergelijke onderzoeken zijn nodig voor chemische stoffen die rechtstreeks op de bodem worden gebracht of waarvan het aannemelijk is dat ze in het bodemmilieu terecht zullen komen. De resultaten van dit laboratoriumonderzoek kunnen ook worden gebruikt voor de ontwikkeling van monsternemings- en analyseprotocollen voor verwant veldonderzoek.

Aëroob en anaëroob onderzoek met één bodemtype is meestal voldoende voor de evaluatie van omzettingsroutes (8)(10)(ll). De omzettingssnelheid moet daarnaast in ten minste drie bodemtypes worden bepaald (8)(10).

In Belgirate (Italië) is in 1995 een OESO-workshop over bodem- en sedimentselectie gehouden (10), waar met name overeenstemming is bereikt over het aantal bodemtypes dat voor deze test moet worden gebruikt. De geteste bodemtypes moeten representatief zijn voor de milieusituatie op de plaats waar de stoffen worden gebruikt of vrijkomen. Zo moeten chemische stoffen die in een subtropisch of tropisch klimaat vrijkomen, met Ferrasols of Nitosols (FAO-systeem) worden getest. De workshop heeft op basis van de ISO-richtsnoeren (15) ook aanbevelingen gedaan voor het verzamelen, behandelen en bewaren van bodemmonsters. Het gebruik van paddy(rijst)-bodem komt in deze methode ook aan de orde.

1.2 DEFINITIES

Teststof: een stof, hetzij de oorspronkelijke verbinding, hetzij relevante omzettingsproducten.

Omzettingsproducten: alle stoffen die ontstaan bij biotische of abiotische omzettingsreacties van de teststof, met inbegrip van CO_2 en producten in gebonden residuen.

Gebonden residuen: verbindingen in de bodem, in planten of in dieren die na extractie in de vorm van de oorspronkelijke verbinding of de metabolieten/omzettingsproducten daarvan in de matrix achterblijven. De extractiemethode mag de verbindingen zelf of de structuur van de matrix niet significant wijzigen. De aard van de binding kan gedeeltelijk worden opgehelderd door extractiemethoden die de matrix wijzigen of door verfijnde analysetechnieken. Tot op heden zijn op deze manier bijvoorbeeld covalente, ionische en sorptiebindingen en insluitingen gesignaleerd. In het algemeen heeft de vorming van gebonden residuen tot gevolg dat de biologische toegankelijkheid en de biologische beschikbaarheid significant afnemen (12) [gewijzigd overgenomen uit IUPAC 1984 (13)].

Aërobe omzetting: reacties die in aanwezigheid van moleculaire zuurstof verlopen (14).

▼B

Anaërobe omzetting: reacties die bij uitsluiting van moleculaire zuurstof verlopen (14).

Bodem: een mengsel van anorganische en organische chemische bestanddelen, in het laatste geval bestaande uit verbindingen met een hoog koolstof- en stikstofgehalte en een hoog molecuulgewicht, dat kleine (meestal micro-)organismen bevat. Bodem kan in twee toestanden worden verwerkt:

(a) onverstoord, zoals in de loop der tijd ontwikkeld, met kenmerkende lagen van verschillende bodemtypes;

(b) verstoord, zoals meestal aangetroffen in bouwland of wanneer bij deze test gebruikte monsters door graven worden genomen (14).

Mineralisatie: de volledige afbraak van een organische verbinding tot CO_2 en H_2O onder aërobe omstandigheden en CH_4, CO_2 en H_2O onder anaërobe omstandigheden. In de context van de/e testmethode betekent mineralisatie, wanneer met ^{14}C gelabelde verbindingen worden gebruikt, een volledige afbraak waarbij een gelabeld koolstofatoom wordt geoxideerd en een equivalente hoeveelheid $^{14}CO_2$ vrijkomt (14).

Halveringstijd ($t_{0,5}$): de tijd die nodig is om 50 % van een hoeveelheid teststof om te zetten, wanneer de omzetting kan worden beschreven door kinetiek van de eerste orde; deze is onafhankelijk van de concentratie.

DT_{50} (Disappearance Time 50): de tijd waarin de concentratie van de teststof met 50 % daalt; deze verschilt van de halveringstijd $t_{0,5}$ wanneer de omzetting niet volgens kinetiek van de eerste orde plaatsvindt.

DT_{75} (Disappearance Time 75): de tijd waarin de concentratie van de teststof met 75 % daalt.

DT_{90} (Disappearance Time 90): de tijd waarin de concentratie van de teststof met 90 % daalt.

1.3 REFERENT1ESTOFFEN

Voor de karakterisering en/of identificatie van omzettingsproducten met behulp van spectroscopische en chromatografische methoden moeten reterentiestoffen worden gebruikt.

1.4 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De methode kan worden gebruikt voor alle chemische stoffen (al dan niet radioactief gelabeld) waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid en gevoeligheid beschikbaar is. Enigszins vluchtige, niet-vluchtige, in water oplosbare en niet in water oplosbare stoffen kunnen worden getest. De test mag niet worden gebruikt voor chemische stoffen met een grote vluchtigheid vanuit de bodem (b.v. fumigatiemiddelen of organische oplosmiddelen) die onder de experimentele omstandigheden tijdens deze test uit de bodem verdwijnen.

▼B

1.5 INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

Voor de meting van de omzettingssnelheid kan een al dan niet gelabelde teststof worden gebruikt. Voor de bestudering van de omzettingsroute en voor de bepaling van een massabalans is gelabeld materiaal nodig. Labeling met ^{14}C wordt aanbevolen, maar ook het gebruik van andere isotopen zoals ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H of ^{32}P kan nuttig zijn. Het label moet zo veel mogelijk in het meest stabiele gedeelte van het molecuul worden aangebracht ([1]). De zuiverheid van de teststof moet ten minste 95 % zijn.

Vóór de uitvoering van een test om de aërobe en anaërobe omzetting in de bodem te bepalen moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn:

(a) de oplosbaarheid in water (methode A.6);

(b) de oplosbaarheid in organische oplosmiddelen;

(c) de dampspanning (methode A.4) en de constante van de wet van Henry;

(d) de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water (methode A.8);

(e) de chemische stabiliteit in het donker (hydrolyse) (methode C.7);

(f) de pK_a als een molecuul protonering of deprotonering kan ondergaan [OESO-richtsnoer 112] (16).

Ook informatie over de toxiciteit van de teststof voor micro-organismen in de bodem kan nuttig zijn [testmethoden C.21 en C.22] (16).

Er moeten analysemethoden (met inbegrip van methoden voor extractie en clean-up) beschikbaar zijn voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingsproducten daarvan.

1.6 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De bodemmonsters worden met de teststof behandeld en worden onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden (bij constante temperatuur en met een constant vochtgehalte van de bodem) in het donker geïncubeerd in kolven van het biometer-type of in doorstroomsystemen. Nadat voldoende tijd is verstreken, worden de bodemmonsters geëxtraheerd en op de oorspronkelijke stof en de omzettingsproducten daarvan geanalyseerd. Ook vluchtige producten worden met geschikte absorptie-apparatuur opgevangen om te worden geanalyseerd. Door met ^{14}C gelabeld materiaal te gebruiken kunnen de verschillende mineralisatiesnelheden worden gemeten door het ontstane $^{14}CO_2$ weg te vangen en kan de massabalans, met inbegrip van de vorming van aan de bodem gebonden residuen, worden bepaald.

1.7 KWALITEITSCRITERIA

1.7.1 **Recovery**

Door onmiddellijk na de toevoeging van de teststof bodemmonsters ten minste in duplo te extraheren en te analyseren wordt een eerste indicatie verkregen van de herhaalbaarheid van de analysemethode en de uniformiteit van de procedure voor het opbrengen van de teststof. In latere fasen van de experimenten wordt de recovery bepaald aan de hand van de respectieve massabalansen. Voor gelabelde stoffen moet de recovery tussen 90 % en 110 % liggen (8) en voor ongelabelde stoffen tussen 70 % en 110 % (3).

([1]) Als de teststof bijvoorbeeld één ring bevat, moet deze ring worden gelabeld; als de teststof twee of meer ringen bevat, kan er apart onderzoek nodig zijn om te bekijken wat er met elke gelabelde ring gebeurt en om bruikbare informatie over de vorming van omzettingsproducten te verkrijgen.

▼B

1.7.2 **Herhaalbaarheid en gevoeligheid van de analysemethode**

De herhaalbaarheid van de analysemethode (exclusief de efficiëntie van de extractie in het begin) voor de kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingsproducten kan worden gecontroleerd door één extract van een bodemmonster, dat lang genoeg is geïncubeerd voor de vorming van om/ettingsproducten, in duplo te analyseren.

De aantoonbaarheidsgrens van de analysemethode voor de teststof en voor de omzettingsproducten mag niet hoger zijn dan 0,01 $mg.kg^{-1}$ bodem (als teststof) of, indien dit lager is, 1 % van de opgebrachte dosis. De bepaalbaarheidsgrens moet ook worden gespecificeerd.

1.7.3 **Nauwkeurigheid van de omzettingsgegevens**

Een regressieanalyse van de concentratie van de teststof als functie van de tijd levert de vereiste informatie op over de betrouwbaarheid van de omzettingscurve en maakt het mogelijk de betrouwbaarheidsgrenzen te berekenen voor de halveringstijd (bij kinetiek van de pseudo-eerste orde) of de DT_{50} en, indien van toepassing, de DT_{75} en de DT_{90}.

1.8 BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.8.1 **Apparatuur en chemicaliën**

Incubatiesystemen bestaan in de vorm van statische gesloten systemen of geschikte doorstroomsystemen (7)(17). In de figuren 1 en 2 worden voorbeelden gegeven van respectievelijk een geschikt doorstroomapparaat voor bodemincubatie en een kolf van het biometertype. Beiden soorten incubatiesystemen hebben hun voordelen en beperkingen (7)(17).

Er is standaard-laboratoriumapparatuur nodig, met name:

— analyse-instrumenten voor bijvoorbeeld GLC, HPLC en TLC, met inbegrip van de nodige detectiesystemen voor de analyse van al dan niet radioactief gelabelde stoffen, of voor de inverse isotoopverdunningsmethode;

— instrumenten voor identificatie (b.v. MS, GC-MS, HPLC-MS of NMR);

— een vloeistofscintillatieteller;

— een oxidator voor de verbranding van radioactief materiaal;

— een centrifuge;

— extractieapparatuur (b.v. centrifugebuizen voor koude extractie en een Soxhlet-apparaat voor continue extractie met reflux);

— instrumenten voor de concentratie van oplossingen en extracten (b.v. een rotatieverdamper);

— een waterbad;

— een mechanisch mengapparaat (b.v. een kneedmachine of een roermotor).

▼B

De volgende chemicaliën worden onder andere gebruikt:

— NaOH p.a., 2 $mol.dm^{-3}$, of een andere geschikte base (b.v. KOH of ethanolamine);

— H_2SO_4 p.a., 0,05 $mol.dm^{-3}$;

— ethyleenglycol p.a.;

— vast absorptiemateriaal zoals natronkalk en polyurethaanproppen:

— organische oplosmiddelen p.a., zoals aceton of methanol;

— scintillatievloeistof.

1.8.2 **Het opbrengen van de teststof**

Om de teststof aan de bodem toe te voegen en daarin te verdelen kan deze worden opgelost in water (gedeïoniseerd of gedestilleerd) of indien nodig in minimale hoeveelheden aceton of andere organische oplosmiddelen (6) waarin de teststof voldoende oplosbaar en stabiel is. Het gekozen oplosmiddel mag in de gebruikte hoeveelheid echter geen significante invloed op de microbiële activiteit van de bodem hebben (zie de punten 1.5 en 1.9.2-1.9.3). Het gebruik van oplosmiddelen die de microbiële activiteit remmen, zoals chloroform, dichloormethaan en andere gehalogeneerde oplosmiddelen, moet worden vermeden.

De teststof kan ook als vaste stof worden toegevoegd, bijvoorbeeld gemengd met kwartszand (6) of een klein submonster van de testbodem dat aan de lucht gedroogd en gesteriliseerd is. Als de teststof met behulp van een oplosmiddel wordt toegevoegd, moet het oplosmiddel eerst verdampen voordat het submonster met de teststof aan het oorspronkelijke niet-steriele bodemmonster wordt toegevoegd.

Bij algemene chemische stoffen, die voornamelijk via zuiveringsslib/gebruik in de landbouw in de bodem terechtkomen, moet de teststof eerst aan het slib worden toegevoegd, dat dan vervolgens in het bodemmonster wordt gebracht (zie de punten 1.9.2 en 1.9.3).

Het gebruik van geformuleerde producten wordt in de regel niet aanbevolen. Bijvoorbeeld bij slecht oplosbare teststoffen kan het gebruik van geformuleerd materiaal echter een geschikt alternatief zijn.

1.8.3 **Bodem**

1.8.3.1 *Selectie van de bodem*

Om de omzettingsroute te bepalen kan een representatief bodemtype worden gebruikt: zandig leem, siltig leem, leem of lemig zand [volgens de FAO- en USDA-indeling (18)] met een pH van 5,5-8,0, een organisch koolstofgehalte van 0,5-2,5 % en een microbiële biomassa van ten minste 1 % van het totale organische koolstofgehalte wordt aanbevolen (10).

Voor het onderzoek naar de omzettingssnelheid moeten ten minste drie aanvullende bodemtypes worden gebruikt die een scala van relevante bodemtypes vormen. Het organisch koolstofgehalte, de pH, het kleigehalte en de microbiële biomassa van de bodemtypes moeten uiteenlopen (10).

▼B

Van alle bodemtypes moeten in elk geval de textuur (% zand, % silt en % klei) [volgens de FAO- en USDA-indeling (18)|, de pH, de kation-uitwisselingscapaciteit, het organisch koolstofgehalte, de dichtheid van de droge grond, de waterretentie-kenmerken ([1]) en de microbiële biomassa (uitsluitend voor aëroob onderzoek) worden bepaald. Aanvullende informatie over de eigenschappen van de bodem kan nuttig zijn bij de interpretatie van de resultaten. Voor de bepaling van de bodemkenmerken kunnen de in de referenties (19)(20)(21)(22)(23) aanbevolen methoden worden gebruikt. De microbiële biomassa dient met de SIR-methode (substraat-geïnduceerde ademhaling) (25)(26) of met andere methoden (20) te worden bepaald.

1.8.3.2 *Verzameling, behandeling en opslag van de bodemmonsters*

Er moet gedetailleerde informatie beschikbaar zijn over de geschiedenis van de locatie waar de testbodem wordt verzameld, zoals de exacte ligging, de vegetatie, behandelingen met chemische stoffen, behandelingen met organische en anorganische mest, toevoegingen van biologisch materiaal of andere verontreinigingen. Als de bodem in de loop van de voorgaande vier jaar met de teststof of structureel analoge verbindingen daarvan is behandeld, mag deze niet voor het omzettingsonderzoek worden gebruikt (10)(15).

De grond moet vers van het veld (van de A-horizont of de toplaag van 20 cm) worden verzameld met een bodemwatergehalte dat zeven gemakkelijker maakt. Voor andere bodem dan paddy-velden moet monsterneming niet gedurende of vlak na lange perioden (>30 dagen) van droogte, vorst of overstroming gebeuren (14). De monsters moeten zodanig worden vervoerd dat veranderingen in het bodemwatergehalte tot een minimum worden beperkt, en zo veel mogelijk in het donker worden bewaard op een plaats waar er lucht bij kan komen. Een losjes dichtgeknoopte polyetheen zak is hier in het algemeen geschikt voor.

De grond moet zo spoedig mogelijk na monsterneming worden verwerkt. Vegetatie, groot formaat bodemfauna en stenen moeten worden verwijderd voordat de grond door een zeef van 2 mm wordt gezeefd om kleine stenen en resten van planten en dieren te verwijderen. Voordat de grond wordt gezeefd, mag deze niet te veel worden gedroogd en platgedrukt (15).

Wanneer het in de winter moeilijk is om in het veld monsters te nemen (bevroren bodem of een laag sneeuw), kunnen deze worden genomen van een partij grond die in een kas, bedekt door vegetatie (bijvoorbeeld gras of een gras/klaver-mengsel), wordt bewaard. Er is een duidelijke voorkeur voor onderzoek met vers van het veld gehaalde grond, maar als de verzamelde en bewerkte grond vóór het begin van het onderzoek moet worden opgeslagen, moeten de omstandigheden adequaat zijn en mag dit slechts een beperkte tijd gebeuren (4 ± 2 °C gedurende maximaal drie maanden) om de microbiële activiteit op peil te houden ([2]). Voor gedetailleerde instructies voor de verzameling, behandeling en opslag van grond die voor biotransformatie-experimenten moet worden gebruikt, wordt verwezen naar (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) De waterretentiekenmerken van een bodemtype kunnen worden gemeten als de veldcapaciteit, het waterhoudend vermogen of de waterspanning (pF). Zie bijlage I voor een uitleg. In het testverslag moet worden vermeld of de waterretentiekenmerken en de dichtheid van de droge grond in onverstoorde of verstoorde (bewerkte) veldmonsters zijn bepaald.

([2]) Recente onderzoekresultaten wijzen erop dat ook grond uit gematigde zones zonder een significant verlies van microbiële activiteit gedurende meer dan drie maanden bij - 20 °C kan worden bewaard (28)(29).

▼B

Voordat de bewerkte grond voor de test wordt gebruikt, wordt deze gepre-incubeerd om ontkieming en de verwijdering van zaden mogelijk te maken en om het evenwicht van het microbiële metabolisme na de overgang van de monsternemings- en opslagomstandigheden naar de incubatie-omstandigheden te herstellen. Een pre-incubatieperiode van 2 tot 28 dagen met bij benadering de temperatuur en de vochtomstandigheden van de echte test volstaat in het algemeen (15). De opslag en de pre-incubatie mogen samen niet langer dan drie maanden duren.

1.9 UITVOERING VAN DE TEST

1.9.1 **Testomstandigheden**

1.9.1.1 *Testtemperatuur*

Gedurende de hele testperiode moet de grond in het donker worden geïncubeerd bij een constante temperatuur die representatief is voor de klimaatomstandigheden waar de teststof zal worden gebruikt of zal vrijkomen. Voor alle teststoffen die in een gematigd klimaat in de bodem terecht kunnen komen, wordt een temperatuur van 20 ± 2 °C aanbevolen. De temperatuur moet worden gemonitord.

Voor chemische stoffen die in een kouder klimaat worden gebruikt of vrijkomen (bijvoorbeeld in noordelijke landen of in de herfst of de winter), moeten daarnaast ook bodemmonsters bij een lagere temperatuur (bijvoorbeeld 10 ± 2 °C) worden geïncubeerd.

1.9.1.2 *Vochtgehalte*

Voor omzettingsproeven onder aërobe omstandigheden moet het vochtgehalte van de bodem ([1]) op een pF tussen 2,0 en 2,5 worden gebracht en gehouden (3). Het vochtgehalte van de bodem wordt uitgedrukt als massa water per massa droge grond en moet periodiek worden gecontroleerd (bijvoorbeeld om de twee weken) door de incubatiekolven te wegen en waterverliezen moeten worden gecompenseerd door water toe te voegen (bij voorkeur steriel gefilterd kraanwater). Er moet op worden gelet dat bij het toevoegen van vocht (eventuele) verliezen van de teststof en/of omzettingsproducten door vervluchtiging en/of afbraak onder invloed van licht worden voorkomen of tot een minimum worden beperkt.

Voor omzettingsproeven onder anaërobe of paddy-omstandigheden wordt de grond onder water gezet om deze met water te verzadigen.

1.9.1.3 *Aërobe incubatie-omstandigheden*

In de doorstroomsystemen worden de omstandigheden aëroob gehouden door periodiek met bevochtigde lucht te spoelen of daar continu mee te ventileren. In de biometerkolven vindt de uitwisseling van lucht door diffusie plaats.

1.9.1.4 *Steriele aërobe omstandigheden*

Om informatie te krijgen over de relevantie van de abiotische omzetting van een teststof kunnen bodemmonsters worden gesteriliseerd (zie de referenties 16 en 29 voor sterilisatiemethoden), behandeld met steriele teststof (bijvoorbeeld door de oplossing via een steriele filter toe te voegen) en belucht met bevochtigde steriele lucht zoals beschreven onder punt 1.9.1.3. Voor paddy-bodem moeten grond en water worden gesteriliseerd en moet de incubatie volgens punt 1.9.1.6 worden uitgevoerd.

([1]) De grond mag niet te nat en niet te droog zijn om een afdoende beluchting en voeding van de microflora in de bodem te waarborgen. Als vochtgehalte voor een optimale microbiële groei wordt een waterhoudend vermogen (WHV) van 40-60 % en een waterspanning van 0,1-0,33 bar aanbevolen (6). Dit laatste interval komt overeen met een pF van 2,0-2,5. In bijlage 2 wordt voor verschillende bodemtypes het karakteristieke vochtgehalte vermeld.

▼B

1.9.1.5 *Anaërobe incubatie-omslandigheden*

Om anaërobe omstandigheden te krijgen en te houden wordt de met de teststof behandelde grond gedurende 30 dagen of, indien dit korter is, één halveringstijd of DT_{50}, onder aërobe omstandigheden geïncubeerd en vervolgens met water doordrenkt (waterlaag van 1-3 cm) en wordt het incubatiesysteem met een inert gas (bijvoorbeeld stikstof of argon) doorgespoeld ([1]). Het testsysteem moet mogelijkheden bieden voor de meting van bijvoorbeeld de pH, de zuurstofconcentratie en de redoxpotentiaal en apparatuur bevatten voor het wegvangen van vluchtige producten. Het systeem van het biometer-type moet gesloten zijn om te voorkomen dat door diffusie lucht binnendringt.

1.9.1.6 *Paddy-incubatieomstandigheden*

Om de omzetting in paddy-rijstbodem te onderzoeken wordt de bodem onder water gezet met een waterlaag van ongeveer 1-5 cm en wordt de teststof aan de waterfase toegevoegd (9). Een bodemdiepte van ten minste 5 cm wordt aanbevolen. Het systeem wordt net als onder aërobe omstandigheden met lucht geventileerd. De pH, de zuurstofconcentratie en de redoxpotentiaal van de waterlaag worden gemonitord en gerapporteerd. Voordat de omzettingsproef wordt begonnen, is een pre-incubatieperiode van minimaal twee weken nodig (zie punt 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Duur van de test*

Het onderzoek naar snelheid en route mag normaal gesproken niet langer duren dan 120 dagen ([2]) (3)(6)(8), omdat daarna in een kunstmatig laboratoriumsysteem, dat van natuurlijke aanvulling afgesloten is, in de loop der tijd een daling van de microbiële activiteit van de bodem kan worden verwacht. Wanneer dit nodig is om de afbraak van de teststof en de vorming en afbraak van belangrijke omzettingsproducten te karakteriseren, kan het onderzoek gedurende langere tijd (bijvoorbeeld 6 of 12 maanden) worden voortgezet (8). Voor langere incubatieperioden moet in het testverslag een motivering worden gegeven en in dat geval moet gedurende en aan het eind van deze perioden de biomassa worden gemeten.

1.9.2 **Uitvoering van de test**

In elke incubatiekolf (zie de figuren 1 en 2 in bijlage 3) wordt ongeveer 50 tot 200 g grond (drooggewicht) gebracht, die volgens een van de onder punt 1.8.2 beschreven methoden met de teststof wordt behandeld. Wanneer er voor de toevoeging van de teststof organische oplosmiddelen worden gebruikt, moeten deze door verdamping uit de grond worden verwijderd. Vervolgens wordt de grond met een spatel en/of door de kolf te schudden grondig gemengd. Als het onderzoek onder paddy-omstandigheden wordt uitgevoerd, worden de grond en het water na de toevoeging van de teststof grondig gemengd. Kleine porties (bijvoorbeeld 1 g) van de behandelde grond worden op de teststof geanalyseerd om te controleren of deze uniform verdeeld is. Alternatieve methoden komen later aan de orde.

([1]) Aan het bodemoppervlak en zelfs daaronder heersen meestal aërobe omstandigheden, zoals is gebleken uit een onderzoekproject in opdracht van de 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. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 augustus 1992, Sigtuna, Zweden|. Anaërobe omstandigheden komen slechts sporadisch voor wanneer de bodem na zware regenval doordrenkt is of wanneer in rijstvelden paddy-omstandigheden heersen.

([2]) Aëroob onderzoek kan al lang vóór de 120 dagen worden beëindigd, mits de uiteindelijke omzettingsroute en de uiteindelijke mineralisatie op dat moment duidelijk bereikt zijn. Beëindiging van de test is mogelijk na 120 dagen of wanneer ten minste 90 % van de teststof is omgezet, maar alleen als ten minste 5 % CO_2 is gevormd.

▼B

De toegevoegde hoeveelheid moet overeenkomen met de grootste hoeveelheid van een gewasbeschermingsmiddel die in de gebruiksaanwijzing voor opbrenging wordt aanbevolen en een uniforme vermenging tot een adequate diepte op het veld (bijvoorbeeld de bovenste laag van 10 cm van de bodem ([1]). Voor chemische stoffen die bijvoorbeeld op het blad of zonder vermenging op de bodem worden opgebracht, moet bij de berekening van de hoeveelheid die aan elke kolf moet worden toegevoegd, worden uitgegaan van een diepte van 2,5 cm. Voor chemische stoffen die met de grond worden vermengd, is de adequate diepte de in de gebruiksaanwijzing vermelde vermengingsdiepte. Voor algemene chemische stoffen wordt de opgebrachte hoeveelheid bepaald op basis van de meest relevante aanvoerroute; als bijvoorbeeld zuiveringsslib de belangrijkste route voor de toevoer naar de bodem is, moet de chemische stof aan het slib worden toegevoegd in een concentratie die overeenkomt met de verwachte concentratie in het slib en moet de hoeveelheid aan de grond toegevoegd slib overeenkomen met de normale hoeveelheid op landbouwgrond gebruikt slib. Als deze concentratie niet hoog genoeg is om belangrijke omzettingsproducten te bepalen, kan incubatie van aparte bodemmonsters met grotere hoeveelheden nuttig zijn, maar te grote hoeveelheden die de microbiële functies van de bodem beïnvloeden, moeten worden vermeden (zie de punten 1.5 en 1.8.2).

Ook kan een grotere hoeveelheid (d.w.z. 1 tot 2 kg) grond met de teststof worden behandeld, zorgvuldig in een geschikt mengapparaat worden gemengd en vervolgens in kleine porties van 50 tot 200 g in de incubatiekolven worden overgebracht (bijvoorbeeld met behulp van monsterverdelers). Kleine porties (bijvoorbeeld 1 g) van de behandelde grond worden op de teststof geanalyseerd om te controleren of deze uniform verdeeld is. Een dergelijk procedure verdient de voorkeur aangezien daarmee een uniformere verdeling van de teststof in de bodem mogelijk is.

Ook onbehandelde bodemmonsters worden onder dezelfde (aërobe) omstandigheden als de met de teststof behandelde monsters geïncubeerd. Deze monsters worden gebruikt voor de meting van de biomassa gedurende en aan het eind van het onderzoek.

Wanneer de teststof voor de toevoeging aan de bodem in een of meer organische oplosmiddelen wordt opgelost, worden met de/elfde hoeveelheid oplosmiddel(en) behandelde bodemmonsters worden onder dezelfde (aërobe) omstandigheden als de met de teststof behandelde monsters geïncubeerd. Deze monsters worden gebruikt voor de meting van de biomassa aan het begin, gedurende en aan het eind van het onderzoek om na te gaan welke effecten de organische oplosmiddelen op de microbiële biomassa hebben.

De kolven met de behandelde bodemmonsters worden aan het in figuur 1 beschreven doorstroomsysteem bevestigd of met de in figuur 2 afgebeelde absorptiekolom afgesloten (zie bijlage 3).

([1]) De aanvankelijke concentratie op basis van het oppervlak wordt als volgt berekend:

$$C_{bodem}[mg/kg_{bodem}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{bodem}/m^3]}$$

C_{bodem} = aanvankelijke concentratie in de bodem [mg-kg^{-1}].

A = opgebrachte hoeveelheid [kg.ha^{-1}]; l = dikte van de bodemlaag [m]; d = dichtheid van de droge bodem [kg.m^{-3}].

Als vuistregel geldt dat een opgebrachte hoeveelheid van 1 kg.ha^{-1} tot een bodemconcentratie van ongeveer 1 mg.kg^{-1} in een laag van 10 cm leidt (uitgaande van een dichtheid van de droge bodem van 1 g cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Monsterneming en meting**

Op geschikte tijdstippen worden incubatiekolven in duplo verwijderd en worden de bodemmonsters met geschikte oplosmiddelen met een verschillende polariteit geëxtraheerd en op de teststof en/of omzettingsproducten geanalyseerd. In een goed opgezet onderzoek zijn er voldoende kolven om op elk monsternemingstijdstip twee kolven te kunnen gebruiken. Ook de absorptieoplossingen of het vaste absorptiemateriaal worden op verschillende tijdstippen (gedurende de eerste maand om de 7 dagen en daarna om de 17 dagen) gedurende en aan het eind van de incubatie van elk bodemmonster verwijderd en op vluchtige producten geanalyseerd. Naast een bodemmonster dat direct na de toevoeging wordt genomen (dag 0), worden nog ten minste 5 andere monstememingspunten gekozen. De tijdstippen worden zodanig gekozen dat het verloop van de afbraak van de teststof en van de vorming en afbraak van de omzettingsproducten kan worden bepaald (bijvoorbeeld na 0, 1, 3 en 7 dagen, na 2 en 3 weken, na 1, 2 en 3 maanden enz.).

Wanneer een met C gelabelde teststof wordt gebruikt, wordt de niet-extraheerbare radioactiviteit door verbranding kwantitatief bepaald en wordt er voor elk monsternemingstijdstip een massabalans bepaald.

Bij anaërobe en paddy-incubatie worden de bodem- en de waterfase gezamenlijk op de teststof en de omzettingsproducten geanalyseerd of vóór extractie en analyse door filtratie of centrifugeren gescheiden.

1.9.4 **Facultatieve tests**

Aërobe niet-steriele proeven bij andere temperaturen en vochtgehaltes van de bodem kunnen nuttig zijn om de invloed van de temperatuur en het vochtgehalte van de bodem op de omzettingssnelheid van een teststof en/of de omzettingsproducten daarvan in de bodem te bepalen.

Met behulp van bijvoorbeeld superkritische vloeistofextractie kan worden getracht de niet-extraheerbare radioactiviteit nader te karakteriseren.

2. **GEGEVENS**

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Voor elk monsternemingstijdstip wordt de hoeveelheid teststof, omzettingsproducten, vluchtige stoffen (uitsluitend in %) en niet-extraheerbaar materiaal als percentage van de oorspronkelijk toegevoegde concentratie en eventueel als $mg.kg^{-1}$ bodem (op basis van het drooggewicht) vermeld. Voor elk monsternemingstijdstip dient er een massabalans te worden gegeven als percentage van de oorspronkelijk toegevoegde concentratie. Door in een grafiek de concentratie van de teststof uit te zetten tegen de tijd kan de halveringstijd of de DT_{50} worden bepaald. Belangrijke omzettingsproducten moeten worden geïdentificeerd en ook hun concentratie moet tegen de tijd worden uitgezet om hun vormings- en afbraaksnelheid aan te geven. Een belangrijk omzettingsproduct is een product dat op enig moment tijdens het onderzoek in een grotere hoeveelheid dan 10 % van de toegevoegde dosis aanwezig is.

De weggevangen vluchtige producten geven een indicatie van het vervluchtigingsvermogen van een teststof en de omzettingsproducten daarvan vanuit de bodem.

▼B

Er moet een nauwkeuriger bepaling van de halveringstijd of de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} worden verkregen door de nodige kinetische modelberekeningen uit te voeren. Naast de halveringstijd en de DT_{50} wordt er ook een beschrijving van het gebruikte model gegeven met vermelding van de orde van de kinetiek en de determinatiecoëfficiënt (r). Kinetiek van de eerste orde krijgt de voorkeur, tenzij $r < 0{,}7$. Eventueel moeten de berekeningen ook worden toegepast op de belangrijke omzettingsproducten. Voorbeelden van geschikte modellen worden beschreven in de referenties 31 tot en met 35.

Wanneer onderzoek bij verschillende temperaturen wordt uitgevoerd, wordt de omzettingssnelheid binnen het experimentele temperatuurtraject als functie van de temperatuur beschreven met behulp van de vergelijking van Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ of } \ln k = 1nA - \frac{B}{T}.$$

waarbij ln A en B regressiecontanten zijn van respectievelijk het intercept en de helling van een best passende rechte die voortkomt uit een lineaire regressie van ln k tegen l/T, k de snelheidsconstantie bij temperatuur T is en T de temperatuur in Kelvin is. Er moet goed worden gelet op het beperkte temperatuurtraject waarop de vergelijking van Arrhenius geldig is wanneer de omzetting door de microbiële activiteit wordt bepaald.

2.2 EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Hoewel het onderzoek in een kunstmatig laboratoriumsysteem wordt uitgevoerd, kan aan de hand van de resultaten een raming worden gemaakt van de omzettingssnelheid van de teststof en de vormings- en afbraaksnelheid van de omzettingsproducten onder veldomstandigheden (36)(37).

Een onderzoek naar de omzettingsroute van een teststof levert informatie op over de manier waarop de structuur van de gebruikte stof in de bodem onder invloed van chemische en microbiële reacties verandert.

3. **RAPPORTACE**

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

De teststof:

— de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule (waarin de plaats van het label wordt aangegeven als radioactief gelabeld materiaal wordt gebruikt) en relevante fysisch-chemische eigenschappen (zie punt 1.5);

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof;

— de radiochemische zuiverheid van een radioactief gelabelde stof en de specifieke activiteit (indien van toepassing).

Referentiestoffen:

— de chemische naam en de structuur van referentiestoffen die voor de karakterisering en/of de identificatie van omzettingsproducten worden gebruikt.

De gebruikte bodem:

— gegevens over de plaats waar de monsters zijn verzameld;

— de datum van monsterneming en de gevolgde procedure;

▼B

— eigenschappen van de bodem zoals de pH, het organische koolstofgehalte, de textuur (% zand, % silt, % klei), de kation-uitwisselingscapaciteit, de dichtheid van de droge bodem, de waterretentie-kenmerken en de microbiële biomassa;

— de periode gedurende welke en de omstandigheden waaronder de monsters zijn opgeslagen (als ze zijn opgeslagen).

De testomstandigheden:

— de data waarop het onderzoek is uitgevoerd;

— de gebruikte hoeveelheid teststof;

— de gebruikte oplosmiddelen en de manier waarop de teststof is opgebracht;

— het gewicht van de oorspronkelijk behandelde bodem waaruit op elk analysetijdstip een monster is genomen;

— een beschrijving van het gebruikte incubatiesysteem;

— de stroomsnelheid van de lucht (alleen voor doorstroomsystemen);

— de temperatuur van de proefopstelling;

— het vochtgehalte van de bodem tijdens de incubatie:

— de microbiële biomassa aan het begin, gedurende en aan het eind van het aërobe onderzoek;

— de pH, de zuurstofconcentratie en de redoxpotentiaal aan het begin, gedurende en aan het eind van het anaërobe en paddy-onderzoek;

— de extractiemethode(n);

— de methoden voor de kwalitatieve en kwantitatieve analyse van de teststof en de belangrijke omzettingsproducten in de bodem en het absorptiemateriaal;

— het aantal replicaat-bepalingen en het aantal controlebepalingen.

De resultaten:

— de resultaten van de bepaling van de microbiële activiteit;

— de herhaalbaarheid en gevoeligheid van de gebruikte analysemethoden;

— de recovery (onder punt 1.7.1 wordt vermeld welke percentages voor een geldig onderzoek gehaald moeten worden);

— tabellen met de resultaten, uitgedrukt als percentage van de gebruikte aanvankelijke dosis en eventueel in $mg.kg^{-1}$ bodem (drooggewicht);

— de massabalans gedurende en aan het eind van het onderzoek;

— de karakterisering van de niet-extraheerbare (gebonden) radioactiviteit of residuen in de bodem;

— een kwantificering van het vrijgekomen CO_2 en andere vluchtige verbindingen;

— curves waarin voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingsproducten de bodemconcentratie tegen de tijd wordt uitgezet;

— de halveringstijd of de DT_{50}, DT_{75} en DT_{90} voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingsproducten, met vermelding van de betrouwbaarheidsgrenzen;

▼B

— een raming van de abiotische afbraaksnelheid onder steriele omstandigheden;

— een evaluatie van de omzettingskinetiek voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingsproducten;

— de voorgestelde omzettingsroutes, indien van toepassing;

— een bespreking en interpretatie van de resultaten;

— de onbewerkte gegevens (d.w.z. voorbeelden van chromatogrammen en van berekeningen van de omzettingssnelheid en de middelen die voor de identificatie van de omzettingsproducten zijn gebruikt).

4. **REFERENTIES**

(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) Europese Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex 11, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate- induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio- transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16' Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135- 172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

Bijlage 1

WATERDRUK, VELDCAPACITEIT (VC) EN WATERHOUDEND VERMOGEN (WHV) [1]

Hoogte van de waterkolom [cm]	pF [a]	bar [b]	Opmerkingen
10^7	7	10^4	Droge bodem
$1{,}6.10^4$	4,2	16	Verwelkingspunt
10^4	4	10	
10^3	3	1	
6.10^2	2,8	0,6	
$3{,}3.10^2$	2,5	0,33 [c]	Bereik van de veldcapaciteit [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHV (bij benadering)
1	0	0,001	Met water verzadigde bodem

[a] pF = log hoogte waterkolom in cm.
[b] 1 bar= 10^5Pa.
[c] Komt overeen met een watergehalte van ongeveer 10 % in zand, 35 % in leem en 45 % in klei.
[d] De veldcapaciteit is niet constant maar varieert van bodemtype tot bodemtype tussen pF 1,5 en 2,5.

De waterdruk wordt als hoogte van de waterkolom in cm of in bar gemeten. Vanwege het grote bereik van de zuigspanning wordt eenvoudigheidshalve de pF-waarde gebruikt, de logaritme van de hoogte van de waterkolom in cm.

De veldcapacileil wordt gedefinieerd als de hoeveelheid water die door een natuurlijke bodem twee dagen na een langdurige regenperiode of afdoende irrigatie tegen de zwaartekracht in kan worden vastgehouden. Deze grootheid wordt in situ op het veld in onverstoorde grond bepaald. De meting is dus niet van toepassing op laboratorium-bodemmonsters die wel verstoord zijn. De in verstoorde grond bepaalde VC-waarde kan een sterke systematische variatie vertonen.

Het waterhoudend vermogen (WHV) wordt in het laboratorium met verstoorde en onverstoorde grond bepaald door een bodemkolom via capillair transport met water te verzadigen. Het WHV is vooral voor verstoorde grond nuttig en kan wel 30 % hoger liggen dan de veldcapaciteit (1). Het WHV is experimenteel ook gemakkelijker te bepalen dan een betrouwbare VC-waarde.

Noten

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Bijlage 2

VOCHTGEHALTE VAN DE BODEM (in g water per 100 g droge grond) VAN VERSCHILLENDE BODEMSOORTEN UIT VERSCHILLENDE LANDEN

Bodemtype	Land	Vochtgehalte van de bodem bij		
		WHV (1)	pF= 1,8	pF = 2,5
Zand	Duitsland	28,7	8,8	3,9
Lemig zand	Duitsland	50,4	17,9	12,1
Lemig zand	Zwitserland	44,0	35,3	9,2
Siltig leem	Zwitserland	72,8	56,6	28,4
Kleileem	Brazilië	69,7	38,4	27,3
Kleileem	Japan	74,4	57,8	31,4
Zandig leem	Japan	82,4	59,2	36,0
Siltig leem	VS	47,2	33,2	18,8
Zandig leem	VS	40,4	25,2	13,3

(1) Waterhoudend vermogen

▼B

Bijlage 3

Figuur 1

Voorbeeld van een doorstroomapparaat voor de bestudering van de omzetting van chemische stoffen in de bodem [1] [2]

1: naaldventiel

2: gaswasfles met water

3: ultramembraan (alleen voor steriele omstandigheden), poriegrootte 0,2 µm

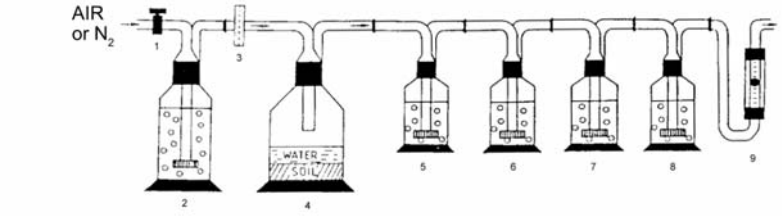
4: bodemmetabolisme-kolf (alleen voor anaerobe en paddy-omstandigheden met waterlaag)

5: ethyleenglycol-val voor organische vluchtige stoffen

6: zwavelzuur-val voor alkalische vluchtige stoffen

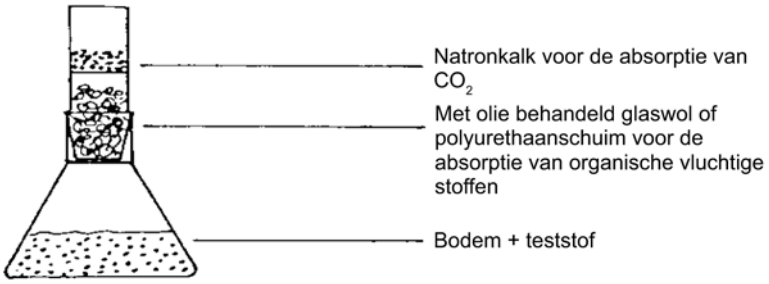
7, 8: natriumhydroxide-val voor CO_2 en andere zure vluchtige stoffen

9: stromingsmeter.



Figuur 2

Voorbeeld van een kolf van het biometer-type voor de bestudering van de omzetting van chemische stoffen in de bodem [3]



[1] Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.),

[2] Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

[3] Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. AËROBE EN ANAËROBE OMZETTING IN AQUA TISCHE SEDIMENTSYSTEMEN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 308 (2002) van de OESO.

1.1 INLEIDING

Chemische stoffen kunnen bijvoorbeeld rechtstreeks, door overwaaien bij het spuiten, door afspoeling, door drainage, door afvalverwijdering, in industrieel, huishoudelijk of agrarisch afvalwater of door depositie uit de lucht in ondiepe of diepe oppervlaktewateren terechtkomen. In deze testmethode wordt een laboratoriumprocedure beschreven voor de bepaling van de aërobe en anaërobe omzetting van organische stoffen in aquatische sedimentsystemen. De methode is gebaseerd op bestaande richtsnoeren (1)(2)(3)(4)(5)(6). In Belgirate (Italië) is in 1995 een OESO-workshop over bodem- en sedimentselectie gehouden (7), waar met name overeenstemming is bereikt over het aantal sedimenttypes dat voor de/e test moet worden gebruikt. De workshop heeft op basis van de ISO-richtsnoeren (8) ook aanbevelingen gedaan voor het verzamelen, behandelen en bewaren van sedimentmonsters. Dergelijke onderzoeken zijn nodig voor chemische stoffen die direct aan water worden toegevoegd of waarvan het aannemelijk is dat ze via bovengenoemde routes in het aquatisch milieu terecht zullen komen.

De omstandigheden in natuurlijke aquatische sedimentsystemen zijn in de bovenstaande waterfase vaak aëroob. De bovenste laag van het sediment kan aëroob of anaëroob zijn, terwijl het diepere sediment meestal anaëroob is. Om al deze mogelijkheden te omvatten worden in dit document zowel aërobe als anaërobe tests beschreven. Bij de aërobe test wordt een aërobe waterkolom boven een aërobe sedimentlaag met daaronder een anaërobe gradiënt gesimuleerd. Bij de anaërobe test wordt een volledig anaëroob water/sedimentsysteem gesimuleerd. Als de omstandigheden erop wijzen dat er significant van deze aanbevelingen moet worden afgeweken, bijvoorbeeld door een intacte sedimentkern te gebruiken of sediment dat aan de teststof blootgesteld kan zijn, zijn daarvoor andere methoden beschikbaar (9).

1.2 DEFINITIES

In alle gevallen moeten eenheden van het Internationale Eenhedenstelsel (SI) worden gebruikt.

Teststof: een stof, hetzij de oorspronkelijke verbinding, hetzij relevante omzettingsproducten.

Omzettingsproducten: alle stoffen die ontstaan bij biotische en abiotische omzettingsreacties van de teststof, met inbegrip van CO_2 en gebonden residuen.

Gebonden residuen: verbindingen in de bodem, in planten of in dieren die na extractie in de vorm van de oorspronkelijke verbinding of de metabolieten daarvan in de matrix achterblijven. De extractiemethode mag de verbindingen zelf of de structuur van de matrix niet significant wijzigen. De aard van de binding kan gedeeltelijk worden opgehelderd door extractiemethoden die de matrix wijzigen of door verfijnde analysetechnieken. Tot op heden zijn op deze manier bijvoorbeeld covalente, ionische en sorptiebindingen en insluitingen gesignaleerd. In het algemeen heeft de vorming van gebonden residuen tot gevolg dat de biologische toegankelijkheid en de biologische beschikbaarheid significant afnemen (10) [gewijzigd overgenomen uit IUPAC 1984 (11)].

▼B

Aërobe omzetting (oxiderend): reacties die in aanwezigheid van moleculaire zuurstof verlopen (12).

Anaërobe omzetting (reducerend): reacties die bij uitsluiting van moleculaire zuurstof verlopen (12).

Natuurlijk water: oppervlaktewater dat uit bijvoorbeeld een meer of een rivier wordt verkregen.

Sediment: een mengsel van anorganische en organische chemische bestanddelen, in het laatste geval bestaande uit verbindingen met een hoog koolstof- en stikstofgehalte en een hoog molecuulgewicht. Het wordt afgezet door natuurlijk water en vormt een grensvlak met dat water.

Mineralisatie: de volledige afbraak van een organische verbinding tot CO_2 en H_2O onder aërobe omstandigheden en CH_4, CO_2 en H_2O onder anaërobe omstandigheden. In de context van de/e testmethode betekent mineralisatie, wanneer radioactief gelabelde verbindingen worden gebruikt, een volledige afbraak van een molecuul waarbij een gelabeld koolstofatoom volledig wordt geoxideerd of gereduceerd en een equivalente hoeveelheid respectievelijk CO_2 of CH_4 vrijkomt.

Halveringstijd ($t_{0,5}$): de tijd die nodig is om 50 % van een hoeveelheid teststof om te zetten, wanneer de omzetting kan worden beschreven door kinetiek van de eerste orde; deze is onafhankelijk van de aanvankelijke concentratie.

DT_{50} (Disappearance Time 50): de tijd waarin de aanvankelijke concentratie van de teststof met 50 % daalt.

DT_{75} (Disappearance Time 75): de tijd waarin de aanvankelijke concentratie van de teststof met 75 % daalt.

DT_{90} (Disappearance Time 90): de tijd waarin de aanvankelijke concentratie van de teststof met 90 % daalt.

1.3 REFERENTIESTOFFEN

Voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van omzettingsproducten met behulp van spectroscopische en chromatografische methoden moeten referentiestoffen worden gebruikt.

1.4 INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

Voor de meting van de omzettingssnelheid kan een al dan niet met een isotoop gelabelde teststof worden gebruikt, hoewel de voorkeur wordt gegeven aan gelabeld materiaal. Voor de bestudering van de omzettingsroute en voor de bepaling van een massabalans is gelabeld materiaal nodig. Labeling met C wordt aanbevolen, maar ook het gebruik van andere isotopen zoals ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H of ^{32}P kan nuttig zijn. Het label moet zo veel mogelijk in het meest stabiele gedeelte van het molecuul worden aangebracht ([1]). De chemische en/of radiochemische zuiverheid van de teststof moet ten minste 95 % zijn.

Vóór de uitvoering van een test moet de volgende informatie over de teststof beschikbaar zijn:

(a) de oplosbaarheid in water (methode A.6);

(b) de oplosbaarheid in organische oplosmiddelen;

(c) de dampspanning (methode A.4) en de constante van de wet van Henry;

([1]) Als de teststof bijvoorbeeld één ring bevat, moet deze ring worden gelabeld; als de teststof twee of meer ringen bevat, kan er apart onderzoek nodig zijn om te bekijken wat er met elke gelabelde ring gebeurt en om bruikbare informatie over de vorming van omzettingsproducten te verkrijgen.

▼B

(d) de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water (methode A.8);

(e) de adsorptiecoëfficiënt (K_d, K_f of K_{oc}) (Methode C.18);

(f) de hydrolyse (methode C.7);

(g) de dissociatieconstante (pK_a) [OESO-richtsnoer 112] (13);

(h) de chemische structuur van de teststof en eventueel de plaats van het (de) isotopenlabel(s).

NB: De temperatuur waarbij deze metingen zijn uitgevoerd, moet worden gerapporteerd.

Ook informatie over de toxiciteit van de teststof voor micro-organismen, over de gemakkelijke en/of intrinsieke biologische atbreekbaarheid en over de aërobe en anaërobe omzetting in de bodem kan nuttig zijn.

Er moeten analysemethoden (met inbegrip van methoden voor extractie en clean-up) beschikbaar zijn voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingsproducten daarvan in water en in sediment (zie punt 1.7.2).

1.5 PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Bij deze testmethode worden een aëroob en een anaëroob aquatisch sedimentsysteem gebruikt (zie bijlage 1) dat het mogelijk maakt:

(i) de omzettingssnelheid van de teststof in een water/sedimentsysteem te meten;

(ii) de omzettingssnelheid van de teststof in het sediment te meten;

(iii) de mineralisatiesnelheid van de teststof en/of de omzettingsproducten daarvan te meten (wanneer een met C gelabelde teststof wordt gebruikt);

(iv) de omzettingsproducten in de water- en de sedimentfase kwalitatief en kwantitatief te bepalen en een massabalans op te stellen (wanneer een gelabelde teststof wordt gebruikt);

(v) de verdeling van de teststof en de omzettingsproducten daarvan over de twee fasen gedurende een incubatieperiode in het donker (om bijvoorbeeld algenbloei te voorkomen) bij constante temperatuur te meten. Wanneer dit met het oog op de gegevens verantwoord is, worden de halveringstijd, de DT_{50}, de DT_{75} en de DT_{90} bepaald, maar deze mogen niet veel verder dan de duur van het experiment worden geëxtrapoleerd (zie punt 1.2)

Voor zowel de aërobe als de anaërobe test moeten ten minste twee sedimenten met het bijbehorende water worden gebruikt (7). Er kunnen echter gevallen zijn waarin er meer dan twee aquatische sedimenten moeten worden gebruikt, bijvoorbeeld wanneer het gaat om een chemische stof die zowel in zoet water als in het mariene milieu kan voorkomen.

▼B

1.6 TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

De methode kan in het algemeen worden gebruikt voor alle chemische stoffen (al dan niet gelabeld) waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid en gevoeligheid beschikbaar is. Enigszins vluchtige, niet-vluchtige, in water oplosbare en slecht in water oplosbare stoffen kunnen worden getest. De test mag niet worden gebruikt voor chemische stoffen met een grote vluchtigheid vanuit water (b.v. fumigatiemiddelen of organische oplosmiddelen) die daardoor onder de experimentele omstandigheden tijdens deze test uit het water en/of het sediment verdwijnen.

De methode is tot op heden toegepast op het onderzoek van de omzetting van chemische stoffen in zoet water en sedimenten daarvan, maar kan in beginsel ook voor estuariene/mariene systemen worden gebruikt. Zij is niet geschikt voor een simulatie van de omstandigheden in stromend water (zoals rivieren) of in open zee.

1.7 KWALITEITSCRITERIA

1.7.1 **Recovery**

Door onmiddellijk na de toevoeging van de teststof water- en sedimentmonsters ten minste in duplo te extraheren en te analyseren wordt een eerste indicatie verkregen van de herhaalbaarheid van de analysemethode en de uniformiteit van de procedure voor het toevoegen van de teststof. In latere fasen van de experimenten wordt de recovery bepaald aan de hand van de respectieve massabalansen (wanneer gelabeld materiaal wordt gebruikt). Voor gelabelde stoffen moet de recovery tussen 90 % en 110 % liggen (6) en voor ongelabelde stoffen tussen 70 % en 110 %.

1.7.2 **Herhaalbaarheid en gevoeligheid van de analysemethode**

De herhaalbaarheid van de analysemethode (exclusief de efficiëntie van de extractie in het begin) voor de kwantitatieve bepaling van de teststof en de omzettingsproducten kan worden gecontroleerd door één extract van een water- of sedimentmonster, dat lang genoeg is geïncubeerd voor de vorming van omzettingsproducten, in duplo te analyseren.

De aantoonbaarheidsgrens van de analysemethode voor de teststof en voor de omzettingsproducten mag niet hoger zijn dan 0,01 $mg.kg^{-1}$ water of sediment (als teststof) of, indien dit lager is, 1 % van de aanvankelijk aan een testsysteem toegevoegde hoeveelheid. De bepaalbaarheidsgrens moet ook worden gespecificeerd.

1.7.3 **Nauwkeurigheid van de omzettingsgegevens**

Een regressieanalyse van de concentratie van de teststof als functie van de tijd levert de vereiste informatie op over de nauwkeurigheid van de omzettingscurve en maakt het mogelijk de betrouwbaarheidsgrenzen te berekenen voor de halveringstijd (bij kinetiek van de pseudo-eerste orde) of de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90}.

1.8 BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1.8.1 **Testsysteem en apparatuur**

Het onderzoek moet in glazen houders (bijvoorbeeld flessen of centrifugebuizen) worden uitgevoerd, tenzij informatie vooraf (zoals de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water of sorptiegegevens) erop wijst dat de teststof zich aan glas kan hechten; in dat geval moet wellicht worden overwogen een ander materiaal (zoals Teflon) te gebruiken. Wanneer bekend is dat de teststof zich aan glas hecht, kan dit probleem met behulp van een of meer van de volgende methoden worden beperkt:

▼B

— de massa van de aan het glas gesorbeerde teststof en omzettingsproducten bepalen;

— al het glaswerk aan het eind van de test met oplosmiddel spoelen:

— geformuleerde producten gebruiken (zie ook punt 1.9.2);

— een grotere hoeveelheid co-oplosmiddel gebruiken om de teststof aan het systeem toe te voegen; als een co-oplosmiddel wordt gebruikt, mag dit geen solvolyse van de teststof veroorzaken.

In de bijlagen 2 en 3 worden voorbeelden gegeven van karakteristieke testapparaten, namelijk respectievelijk een doorstroomsysteem en een systeem van het biometer-type (14). In referentie (15) worden andere geschikte incubatiesystemen beschreven. De experimentele apparatuur moet de uitwisseling van lucht of stikstof en het wegvangen van vluchtige producten mogelijk maken. De afmetingen van de apparatuur moeten zodanig zijn dat aan de eisen van de test wordt voldaan (zie punt 1.9.1). Ventilatie kan gebeuren door zachtjes doorborrelen of door lucht of stikstof over het wateroppervlak te leiden. In het laatste geval kan het nuttig zijn het water van boven zachtjes te roeren om de zuurstof of stikstof beter in het water te verdelen. Er mag geen CO_2-vrije lucht worden gebruikt omdat daardoor de pH van het water kan stijgen. Verstoring van het sediment is in elk geval onwenselijk en moet zo veel mogelijk worden voorkomen. Enigszins vluchtige chemische stoffen moeten in een systeem van het biometer-type bij licht roeren van het wateroppervlak worden getest. Er kunnen ook gesloten systemen met lucht of stikstof boven de vloeistof en interne flacons voor het wegvangen van vluchtige producten worden gebruikt (16). Bij de aërobe test is een periodieke verversing van het gas boven de vloeistof nodig om het zuurstofverbruik door de biomassa te compenseren.

Voor het wegvangen van vluchtige omzettingsproducten kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt: kaliumhydroxide- of natriumhydroxide-oplossingen van 1 $mol.dm^{-3}$ voor kooldioxide ([1]) en ethyleenglycol, ethanolamine of 2 % paraffine in xyleen voor organische verbindingen. Vluchtige stoffen die onder anaërobe omstandigheden ontstaan, zoals methaan, kunnen bijvoorbeeld met een moleculaire zeef worden opgevangen. Deze vluchtige stoffen kunnen bijvoorbeeld tot CO_2 worden verbrand door het gas bij een temperatuur van 900 ^oC door een met CuO gevulde kwartsbuis te leiden en het gevormde CO_2 in een alkalische absorptieoplossing weg te vangen (17).

Er is laboratoriumapparatuur voor de chemische analyse van de teststof en de omzettingsproducten nodig (gaschromatografie (GLC), hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC), dunnelaagchromatografie (TLC), massaspectroscopie (MS), gaschromatograt'ie-massaspectrometrie (GC/MS), vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC/MS), kernspinresonantie (NMR) enz.) met inbegrip van detectiesystemen voor al dan niet radioactief gelabelde chemische stoffen. Wanneer radioactief gelabeld materiaal wordt gebruikt, zijn ook een vloeistofscintillatieteller en een verbrandingsoxidator (voor de verbranding van sedimentmonsters vóór de analyse van de radioactiviteit) nodig.

Daarnaast zijn eventueel ook andere standaard-laboratoriumapparatuur voor fysisch-chemische en biologische bepalingen (zie tabel 1 onder punt 1.8.2.2), glaswerk, chemicaliën en reagentia nodig.

([1]) Aangezien deze alkalische absorptie-oplossingen ook kooldioxide uit de ventilatielucht absorberen en kooldioxide die bij aërobe experimenten door ademhaling ontstaat, moeten ze geregeld worden ververst om verzadiging en zodoende verlies van hun absorptievermogen te voorkomen.

▼B

1.8.2 **Selectie van aquatische sedimenten en aantal sedimenten**

De monstememingsplaatsen moeten aan de hand van het doel van de test in een bepaalde situatie worden gekozen. Bij de keuze van de monstememingsplaatsen moet rekening worden gehouden met stoffen die wellicht in het verleden door landbouw, industrie of huishoudens in het stroomgebied en het water stroomopwaarts terecht zijn gekomen. Als het sediment in de loop van de voorgaande vier jaar met de teststof of structureel analoge verbindingen is verontreinigd, mag het niet worden gebruikt.

1.8.2.1 *Selectie van het sediment*

Voor het aërobe onderzoek worden normaal gesproken twee sedimenten gebruikt (7). Het organische koolstofgehalte en de textuur van de gekozen sedimenten moeten verschillen. Eén sediment moet een hoog organisch koolstofgehalte (2,5-7,5 %) en een fijne textuur hebben en het andere sediment een laag organisch koolstofgehalte (0,5-2,5 %) en een grove textuur. Het verschil in organisch koolstofgehalte moet normaal gesproken ten minste 2 % zijn. Een „fijne textuur" wordt gedefinieerd als een gehalte aan [klei + silt] ([1]) van > 50 % en een „grove textuur" wordt gedefinieerd als een gehalte aan [klei + silt] van < 50 %. Het verschil in gehalte aan [klei + silt 1 voor de twee sedimenten moet normaal gesproken ten minste 20 % zijn. Wanneer een chemische stof ook in het zeewater terecht kan komen, moet ten minste een van de water/sedimentsystemen van mariene herkomst zijn.

Voor het strikt anaërobe onderzoek moeten monsters van twee sedimenten (met het bijbehorende water) uit de anaërobe zones van oppervlaktewateren worden genomen (7). Zowel het sediment als de waterfase moeten voorzichtig worden behandeld en vervoerd zodat er geen zuurstof bij kan komen.

Ook andere parameters kunnen belangrijk zijn bij de keuze van sedimenten en moeten van geval tot geval worden bezien. Zo zal het pH-bereik van sedimenten belangrijk zijn wanneer chemische stoffen worden getest waarvan de omzetting en/of sorptie pH-afhankelijk kunnen zijn. Een pH-afhankelijkheid van sorptie kan gevolgen hebben voor de pK_a van de teststof.

1.8.2.2 *Karakterisering van de water/sedimentmonsters*

In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van de sleutelparameters die voor zowel water als sediment moeten worden gemeten en gerapporteerd (met vermelding van de gebruikte methode) en de fase van de test waarin deze parameters moeten worden bepaald. Ter informatie: methoden voor de bepaling van deze parameters worden vermeld in de referenties (18)(19)(20)(21).

Daarnaast kan het van geval tot geval nodig zijn andere parameters te meten en te rapporteren (bijvoorbeeld voor zoet water: deeltjes, alkaliniteit, hardheid, geleidingsvermogen en NO_3/PO_4 (verhouding en elk apart); voor sedimenten: kation-uitwisselingscapaciteit, waterhoudend vermogen, carbonaat en stikstof en fosfor totaal; voor mariene systemen: zoutgehalte). Een analyse van sedimenten en water op nitraat, sulfaat, biologisch beschikbaar ijzer en wellicht andere elektronenacceptoren kan ook nuttig zijn bij de beoordeling van redox-omstandigheden, vooral wanneer het gaat om anaërobe omzetting.

([1]) [Klei + silt] is de minerale fractie van het sediment met een deeltjesgrootte < 50 urn.

▼B

Meting van parameters voor de karakterisering van water/sedimentmonsters (7)(22)(23)

Parameter	Fase van de testprocedure					
	Monster neming	Nabewer-king	Begin acclimatise-ring	Begin test	Gedurende test	Einde test
Water						
Herkomst/bron	X					
Temperatuur	X					
pH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
O_2-concentratie*	X		X	X	X	X
Redoxpotentiaal*			X	X	X	X
Sediment						
Herkomst/bron	X					
Laagdiepte	X					
pH		X	X	X	X	X
Deeltjesgrootte-verdeling		X				
TOC		X	X	X		X
Microbiële biomassa (**)		X		X		X
Redoxpotentiaal (*)	Observatie (kleur/geur)		X	X	X	X

(*) De methode met de microbiële ademhalingssnelheid (26), de fumigatiemethode (27) of de telplaatmethode (bijvoorbeeld bacteriën, actinomyceten, fungi en totaal aantal kolonies) voor aëroob onderzoek en de vormingssnelheid van methaan voor anaëroob onderzoek.

(**) Uit recent onderzoek is gebleken dat metingen van de zuurstofconcentratie van water en van redoxpotentialengeen mechanistische of voorspellende waarde hebben voor de groei en ontwikkeling van microbiële populaties in oppervlaktewateren (24)(25). De bepaling van het biochemische zuurstofverbruik (BZV, bij de monsterneming en aan het begin en aan het einde van de test) en van de concentratie van de micro/macronutriënten Ca, Mg en Mn (aan het begin en aan het einde van de test) in water en de meting van de totale hoeveelheid N en P in sedimenten (bij de monsterneming en aan het einde van de test) zijn wellicht betere instrumenten voor de interpretatie en evaluatie van de aërobe biotransformatiesnelheid en -route.

1.8.3 **Verzameling, behandeling en opslag**

1.8.3.1 *Verzameling*

Voor de monsterneming van sediment moeten de ontwerprichtsnoeren van de ISO voor de monsterneming van bodemsediment (8) worden gevolgd. Sedimentmonsters worden genomen van de hele bovenste sedimentlaag van 5 tot 10 cm. Het bijbehorende water moet op dezelfde plaats en op hetzelfde tijdstip als het sediment worden verzameld. Voor het anaërobe onderzoek moet het monster van het sediment en het bijbehorende water worden genomen en vervoerd zonder dat er zuurstof bij kan komen (28) (zie punt 1.8.2.1). In de literatuur worden enkele monsternemingsapparaten beschreven (8)(23).

▼B

1.8.3.2 *Behandeling*

Het sediment wordt door filtratie van het water gescheiden en het sediment wordt met behulp van extra water van de locatie, dat vervolgens wordt weggegooid, nat gezeefd over een zeef van 2 mm. Vervolgens worden bekende hoeveelheden sediment en water in de gewenste verhouding (zie punt 1.9.1) in incubatiekolven gemengd en voorbehandeld voor de acclimatiseringsperiode (zie punt 1.8.4). Voor het anaërobe onderzoek moeten alle bewerkingen worden uitgevoerd zonder dat er zuurstof bij kan komen (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Opslag*

Het gebruik van verse monsters sediment en water wordt ten zeerste aanbevolen, maar als opslag nodig is, moeten sediment en water volgens bovenstaande beschrijving worden gezeefd en samen in een laag water (6-10 cm) in het donker bij 4 ± 2 °C ([1]) gedurende maximaal 4 weken worden opgeslagen (7)(8)(23). Monsters die voor aëroob onderzoek worden gebruikt, moeten zodanig worden bewaard dat er gemakkelijk lucht bij kan komen (bijvoorbeeld in open bakken), terwijl monsters voor anaëroob onderzoek zodanig moeten worden bewaard dat er geen zuurstof bij kan komen. Bevriezing van sediment en water en uitdroging van het sediment tijdens het vervoer en de opslag moeten worden voorkomen.

1.8.4 **Voorbehandeling van de sediment/watermonsters voor de test**

Voordat de teststof wordt toegevoegd, wordt elk sediment/watermonster geacclimatiseerd. Daartoe worden de monsters onder precies dezelfde omstandigheden als die van de incubatie tijdens de test in het incubatieapparaat gebracht dat bij de test zal worden gebruikt (zie punt 1.9.1). De acclimatiseringsperiode is de tijd die het systeem nodig heeft om redelijk stabiel te worden, zoals dit tot uiting komt in de pH, de zuurstofconcentratie in het water, de redoxpotentiaal van het sediment en het water en de macroscopische scheiding van de fasen. De acclimatiseringsperiode duurt normaal gesproken een tot twee weken en mag niet meer dan vier weken duren. De resultaten van de tijdens deze periode uitgevoerde bepalingen moeten worden gerapporteerd.

1.9 UITVOERING VAN DE TEST

1.9.1 **Testomstandigheden**

De test wordt in het incubatieapparaat (zie punt 1.8.1) uitgevoerd met een volumeverhouding water/sediment tussen 3:1 en 4:1 en een sedimentlaag van 2,5 cm (± 0,5 cm). Een minimum hoeveelheid van 50 g sediment (droog gewicht) per incubatie tijdens wordt.

De test wordt in het donker bij een constante temperatuur tussen 10 °C en 30 °C uitgevoerd. Een temperatuur van 20 ± 2 °C is geschikt. Daarnaast kan waar nodig, afhankelijk van de informatie die de test moet opleveren, van geval tot geval ook een lagere temperatuur (bijvoorbeeld 10 °C) worden overwogen. De incubatietemperatuur worden gemonitord en gerapporteerd.

([1]) Uit recent onderzoek is gebleken dat opslag bij 4 °C tot een afname van het organisch koolstofgehalte van het sediment kan leiden, hetgeen mogelijkerwijs tot gevolg kan hebben dat de microbiële activiteit afneemt (34).

▼B

1.9.2 **Behandeling en toevoeging van de teststof**

Er wordt één concentratie van de teststof gebruikt. Voor gewasbeschermingsmiddelen die rechtstreeks in wateren worden gebracht, moet de op de etikettering vermelde maximale dosering als de maximaal toe te dienen hoeveelheid worden gebruikt ([1]), berekend op basis van het oppervlak van het water in de houder. In alle andere gevallen wordt de te gebruiken concentratie afgeleid van de geraamde emissie in het milieu. Er moet voor worden gezorgd dat de concentratie van de teststof voldoende is om de omzettingsroute en de vorming en afbraak van de omzettingsproducten te kunnen karakteriseren. Het kan nodig zijn hogere doses te gebruiken (bijvoorbeeld een factor 10 hoger), wanneer de concentraties van de teststof aan het begin van de test dicht bij de aantoonbaarheidsgrens liggen en/of wanneer belangrijke omzettingsproducten niet gemakkelijk kunnen worden aangetoond wanneer hun concentratie 10 % van de oorspronkelijk gebruikte hoeveelheid teststof bedraagt. Als er echter hogere testconcentraties worden gebruikt, mogen deze geen significante schadelijke effecten hebben op de microbiële activiteit van het water/sedimentsysteem. Om voor een constante concentratie van de teststof in houders met verschillende afmetingen te zorgen, kan het nodig zijn de hoeveelheid toe te voegen materiaal aan te passen op basis van de verhouding tussen de diepte van de waterkolom in de houder en de waterdiepte in het veld (er wordt uitgegaan van een diepte van 100 cm, maar ook een andere diepte kan worden gebruikt). Voor een voorbeeld van een dergelijke berekening wordt verwezen naar bijlage 4.

In het ideale geval wordt de teststof als waterige oplossing aan de waterfase van het testsysteem toegevoegd. Als dit onvermijdelijk is, mogen kleine hoeveelheden met water mengbare oplosmiddelen (zoals aceton of ethanol) voor de toevoeging en verdeling van de teststof worden gebruikt, maar deze hoeveelheden mogen niet groter zijn dan 1 % (v/v) en geen schadelijke effecten op de microbiële activiteit van het testsysteem hebben. De bereiding van de waterige oplossing van de teststof moet voorzichtig gebeuren — het gebruik van een generatorkolom of menging vooraf kan nodig zijn om voor een volledige homogeniteit te zorgen. Na de toevoeging van de waterige oplossing aan het testsysteem wordt aanbevolen de waterfase voorzichtig te mengen, waarbij het sediment zo min mogelijk wordt verstoord.

Het gebruik van geformuleerde producten wordt normaal gesproken afgeraden, aangezien de bestanddelen van de formulering de verdeling van de teststof en/of de omzettingsproducten over de water- en sedimentfase kunnen beïnvloeden. Voor slecht in water oplosbare stoffen kan het gebruik van geformuleerd materiaal echter een geschikt alternatief zijn.

Het aantal incubatiehouders is afhankelijk van het aantal monsternemingstijdstippen (zie punt 1.9.3). Er moeten zo veel testsystemen beschikbaar zijn dat er op elk monsternemingstijdstip twee systemen uit de proef kunnen worden genomen. Wanneer er controle-opstellingen voor elk aquatisch sedimentsysteem worden gebruikt, mogen deze niet met de teststof worden behandeld. De controle-opstellingen kunnen worden gebruikt om aan het eind van het onderzoek de microbiële biomassa van het sediment en de totale hoeveelheid organische koolstof in het water en het sediment te bepalen. Twee controle-opstellingen (d.w.z. één voor elk aquatisch sediment) kunnen worden gebruikt voor de monitoring van de vereiste parameters in het sediment en het water gedurende de acclimatiseringsperiode (zie de tabel onder punt 1.8.2.2). Wanneer de teststof met behulp van een oplosmiddel wordt toegevoegd, zijn twee extra controle-opstellingen nodig om de schadelijke effecten daarvan op de microbiële activiteit van het testsysteem te meten.

([1]) Een test met een tweede concentratie kan nuttig zijn voor chemische stoffen die langs verschillende routes in het oppervlaktewater terechtkomen en waarbij dit tot significant verschillende concentraties leidt, zolang de laagste concentratie met een afdoende nauwkeurigheid kan worden geanalyseerd.

▼B

1.9.3 **Duur van de test en monsterneming**

Het experiment mag normaal gesproken niet langer duren dan 100 dagen (6) en moet worden voortgezet totdat de afbraakroute en het verdelingspatroon sediment/water vaststaan of 90 % van de teststof door omzetting en/of vervluchtiging is verdwenen. Er moeten ten minste zes monsternemingstijdstippen zijn (inclusief het beginpunt) en een facultatief vooronderzoek (zie punt 1.9.4) kan worden gebruikt om een adequaat monsternemingsschema vast te stellen en de duur van de test te bepalen, tenzij er uit eerder onderzoek voldoende gegevens over de teststof beschikbaar zijn. Voor hydrofobe teststoffen kunnen extra monsternemingspunten tijdens de beginfase van het onderzoek nodig zijn om de snelheid van de verdeling over de sediment- en de waterfase te bepalen.

Op geschikte monsternemingstijdstippen worden hele incubatiehouders (in duplo) voor analyse uit de test genomen. Het sediment en het bovenstaande water worden apart geanalyseerd ([1]). Hert bovenstaande water wordt voorzichtig verwijderd, waarbij het sediment zo min mogelijk wordt verstoord. Bij de extractie en karakterisering van de teststof en de omzettingsproducten worden adequate analyseprocedures gevolgd. Er moet op worden gelet dat ook materiaal dat aan de incubatiehouder of aan de verbindingsbuizen voor het wegvangen van vluchtige stoffen is geadsorbeerd, wordt verwijderd.

1.9.4 **Facultatief vooronderzoek**

Als de duur en het monsternemingsschema niet aan de hand van ander relevant onderzoek aan de teststof kunnen worden bepaald, kan een facultatief vooronderzoek nuttig zijn, dat onder dezelfde testomstandigheden wordt uitgevoerd als het definitieve onderzoek. Als er een vooronderzoek wordt uitgevoerd, moeten de relevante experimentele omstandigheden en resultaten daarvan kort worden gerapporteerd.

1.9.5 **Metingen en analyse**

Voor elk monsternemingstijdstip wordt de concentratie van de teststof en de omzettingsproducten in het water en het sediment gemeten en gerapporteerd (als concentratie en als percentage van de toegevoegde hoeveelheid). In het algemeen moeten omzettingsproducten die op enig monsternemingstijdstip in grotere hoeveelheden dan 10 % van de toegevoegde radioactiviteit in het hele water/sedimentsysteem worden bepaald, worden geïdentificeerd tenzij er een redelijke motivering is om dit niet te doen. Ook voor omzettingsproducten waarvan de concentratie gedurende het onderzoek voortdurend stijgt, moet identificatie worden overwogen, zelfs als hun concentratie niet hoger wordt dan bovengenoemde grenswaarde, aangezien dit op persistentie kan wijzen. Deze aspecten moeten van geval tot geval worden bekeken en in het verslag moet een motivering van de conclusies worden opgenomen.

Voor elk monsternemingstijdstip worden ook de resultaten van systemen voor het wegvangen van gassen en vluchtige stoffen (CO_2 en bijvoorbeeld vluchtige organische verbindingen) gerapporteerd. Ook de mineralisatiesnelheden worden gerapporteerd. Voor elk monsternemingstijdstip worden de niet-extraheerbare (gebonden) residuen in sediment gerapporteerd.

([1]) Wanneer een snelle heroxidatie van anaërobe omzettingsproducten aannemelijk is, moeten ook bij de monsterneming en analyse anaërobe omstandigheden worden gehandhaafd.

▼B

2. **GEGEVENS**

2.1 BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Voor elk monsternemingstijdstip wordt de totale massabalans of de recovery (zie punt 1.7.1) van de toegevoegde radioactiviteit berekend. De resultaten worden als percentage van de toegevoegde radioactiviteit gerapporteerd. De verdeling van de radioactiviteit tussen water en sediment wordt voor elk monsternemingstijdstip als concentratie en als percentage gerapporteerd.

De halveringstijd, de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} van de teststof worden samen met hun betrouwbaarheidsgrenzen (zie punt 1.7.3) berekend. Informatie over de snelheid waarmee de teststof uit het water en het sediment verdwijnt, kan met behulp van geschikte evaluatiehulpmiddelen worden verkregen. Deze kunnen variëren van het gebruik van kinetiek van de pseudo-eerste orde en empirische technieken voor de bepaling van de optimale curve waarbij grafische of numerieke oplossingen worden toegepast, tot complexere evaluaties met behulp van bijvoorbeeld modellen met een of meer compartimenten. Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar de desbetreffende gepubliceerde literatuur (35)(36)(37).

Alle benaderingen hebben hun sterke en zwakke punten en lopen qua complexiteit sterk uiteen. Wanneer wordt uitgegaan van kinetiek van de eerste orde, worden de afbraak- en distributieprocessen wellicht te zeer vereenvoudigd, maar wanneer dit mogelijk is levert dit een parameter op (de snelheidsconstante of halveringstijd) die gemakkelijk te begrijpen is en bruikbaar is voor simulatiemodellen en de berekening van geraamde milieuconcentraties. Empirische benaderingen of lineaire transformaties kunnen leiden tot curves die beter bij de gegevens aansluiten en maken derhalve een betere bepaling van de halveringstijd, de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} mogelijk. Het nut van de afgeleide constanten is echter beperkt. Compartimentmodellen kunnen een aantal nuttige constanten voor een risicobeoordeling opleveren, die de afbraaksnelheid in verschillende compartimenten en de verdeling van de chemische stof beschrijven. Ze moeten ook worden gebruikt voor de bepaling van de snelheidsconstanten voor de vorming en afbraak van belangrijke omzettingsproducten. In alle gevallen moet er een motivering voor de keuze van de methode worden gegeven en moet degene die het experiment uitvoert grafisch en/of statistisch aantonen hoe goed de curve en de gegevens bij elkaar aansluiten.

3. **RAPPORTAGE**

3.1 TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

De teststof:

— de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule (waarin de plaats van het label of de labels wordt aangegeven als radioactief gelabeld materiaal wordt gebruikt) en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof;

— de radiochemische zuiverheid van een gelabelde stof en de molaire activiteit (indien van toepassing).

▼B

Referentiestoffen:

— de chemische naam en de structuur van referentiestoffen die voor de karakterisering en/of de identificatie van omzettingsproducten worden gebruikt.

Voor de test gebruikte sedimenten en wateren:

— de locatie en een beschrijving van de monsternemingsplaats(en) voor het aquatische sediment met indien mogelijk een vermelding van de verontreiniging in het verleden:

— alle informatie over de verzameling, de opslag (als ze zijn opgeslagen) en de acclimatisering van water/sedimentsystemen:

— de kenmerken van de sediment/watermonsters, zoals vermeld in de tabel onder punt 1.8.2.2.

De testomstandigheden:

— het gebruikte testsysteem (bijvoorbeeld doorstroomsysteem, biometer-type, wijze van ventilatie, roermethode, watervolume, sedimentmassa, dikte van de water- en de sedimentlaag, afmetingen van de testhouders enz.);

— de toevoeging van de teststof aan het systeem: gebruikte concentratie bij de test, aantal replicaat- bepalingen en controlebepalingen en de wijze waarop de teststof is toegevoegd (bijvoorbeeld een eventueel gebruik van een oplosmiddel) enz.;

— de incubatietemperatuur:

— de monstememingstijdstippen:

— de extractiemethoden met de efficiëntie en de analysemethoden met de aantoonbaarheidsgrens;

— de methoden voor de karakterisering/identificatie van de omzettingsproducten:

— afwijkingen van het testprotocol of de testomstandigheden tijdens het onderzoek.

De resultaten:

— onbewerkte gegevens van representatieve analyses (alle onbewerkte gegevens moeten in het GLP-archief worden bewaard);

— de herhaalbaarheid en gevoeligheid van de gebruikte analysemethoden;

— de recovery (onder punt 1.7.1 wordt vermeld welke percentages voor een geldig onderzoek gehaald moeten worden);

— tabellen met de resultaten, uitgedrukt als percentage van de gebruikte dosis en in $mg.kg^{-1}$ in het water, het sediment en het totale systeem (alleen percentage), voor de teststof en eventueel de omzettingsproducten en de niet-extraheerbare radioactiviteit;

— de massabalans gedurende en aan het eind van het onderzoek:

— een grafische voorstelling van de omzetting in het water, in het sediment en in het totale systeem (met inbegrip van de mineralisatie);

— de mineralisatiesnelheid;

▼B

— de halveringstijd, de DT_{50} en eventueel de DT_{75} en de DT_{90} voor de teststof en eventueel de belangrijke omzettingsproducten, met vermelding van de betrouwbaarheidsgrenzen, in het water, in het sediment en in het totale systeem;

— een evaluatie van de omzettingskinetiek van de teststof en eventueel de belangrijke omzettingsproducten;

— de voorgestelde omzettingsroute, indien van toepassing;

— een bespreking van de resultaten.

4. **REFERENTIES**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada, pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (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, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 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, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (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, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol., 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation- extraction method.

(28) Beelen, P. van and F. van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues 11. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues 1. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

Bijlage 1

RICHTSNOEREN VOOR HET AËROBE EN HET ANAËROBE TESTSYSTEEM

Het aërobe testsysteem

Het in deze testmethode beschreven aërobe testsysteem bestaat uit een aërobe waterlaag (met een zuurstofconcentratie die normaal tussen 7 en 10 $mg.l^{-1}$ ligt) en een sedimentlaag die aan het oppervlak aëroob en onder het oppervlak anaëroob is (met een gemiddelde redoxpotentiaal (E_h) in het anaërobe gedeelte van het sediment die normaal tussen - 80 en - 190 mV ligt). In elke incubatie-opstelling wordt vochtige lucht over het wateroppervlak geleid om voor voldoende zuurstof in de ruimte boven het water te zorgen.

Het anaërobe testsysteem

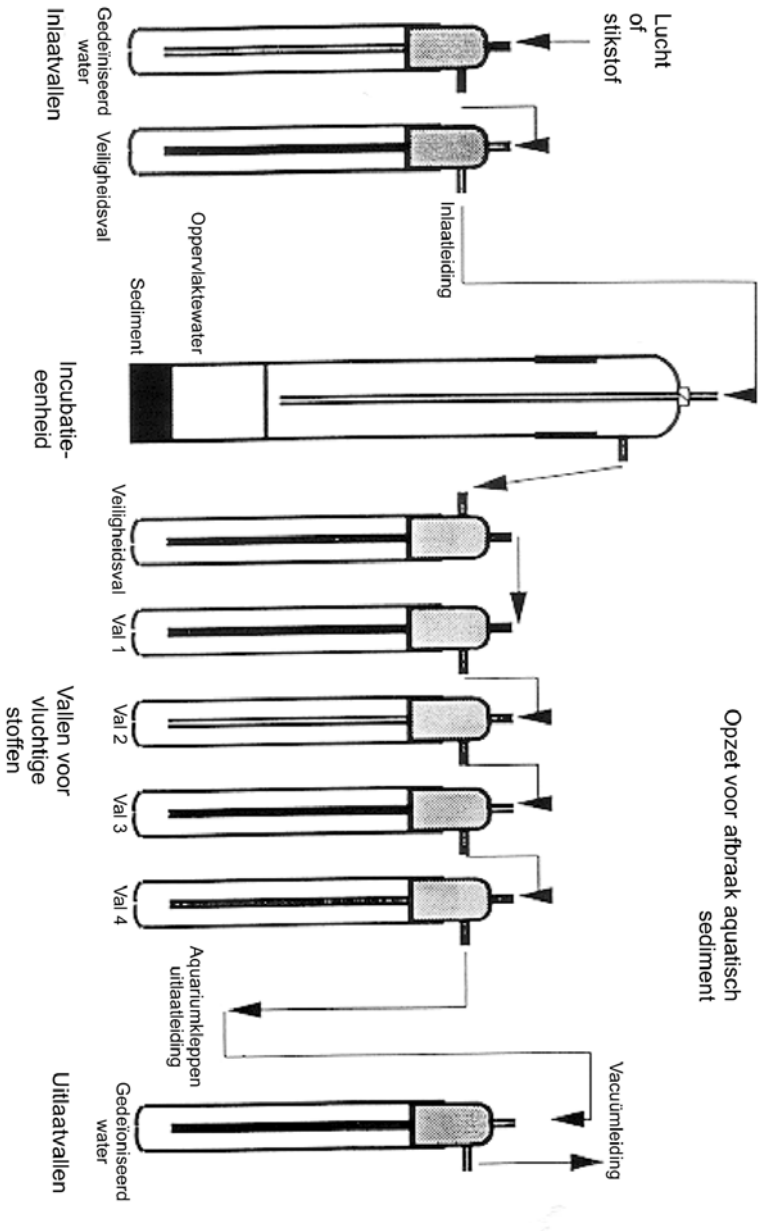
Voor het anaërobe testsysteem is de testprocedure in grote lijnen gelijk aan de voor het aërobe systeem geschetste procedure, behalve dat in elke incubatie-opstelling vochtige stikstof over het wateroppervlak wordt geleid om voor voldoende stikstof in de ruimte boven het water te zorgen. Het sediment en het water worden als anaëroob beschouwd zodra de redoxpotentiaal (E_h) lager dan - 100 mV is.

Bij de anaërobe test wordt voor de bepaling van de mineralisatie ook het vrijgekomen kooldioxide en methaan gemeten.

▼B

Bijlage 2

VOORBEELD VAN EEN DOORSTROOMOPSTELLING

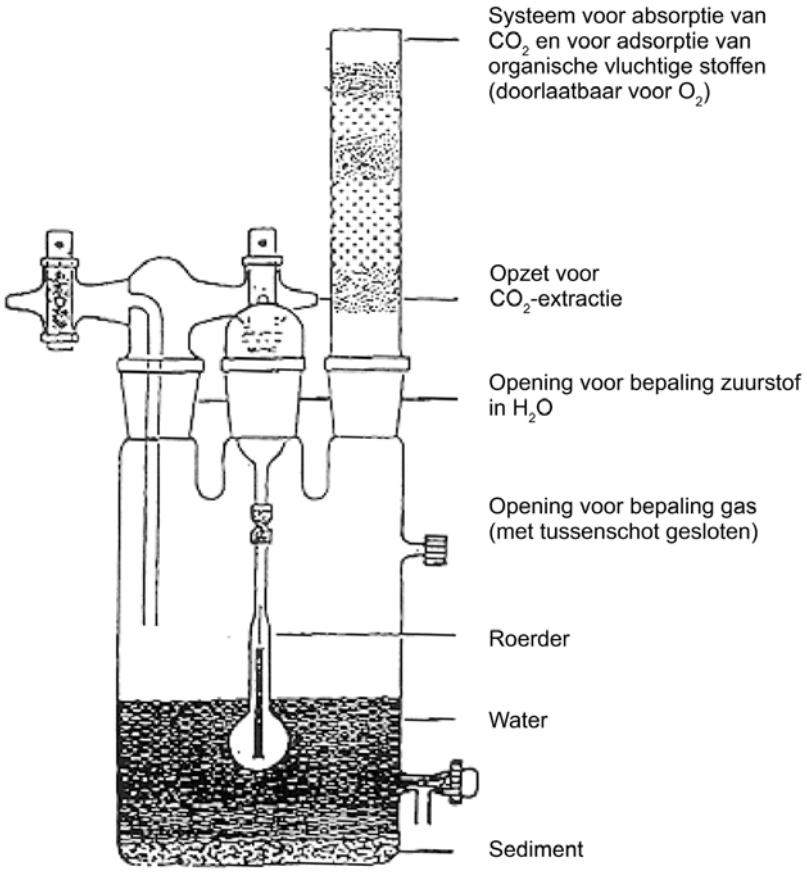


Veiligheidsval, leeg
Val 1:
ethyleenglycol om organische vluchtige stoffen weg te vangen
Val 2:
0,1 M zwavelzuur om alkalische vluchtige stoffen weg te vangen
Val 3 en 4: 2M natriumhydroxide om CO_2 en andere zure vluchtige stoffen weg te vangen

▼B

Bijlage 3

VOORBEELD VAN EEN BIOMETERAPPARAAT



▼B

Bijlage 4

VOORBEELD VOOR DE BEREKENING VAN DE HOEVEELHEID TESTSTOF DIE AAN EEN TESTHOUDER WORDT TOEGEVOEGD

Inwendige diameter van de cylinder:	= 8 cm
Diepte waterkolom zonder sediment:	= 12 cm
Oppervlak waterspiegel: 3,142 × 42	= 50,3 cm^2
Toe te voegen hoeveelheid: 500 g teststof/ha komt overeen met 5 ug/cm^2	
Totaal in µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
Aanpassing van de hoeveelheid op basis van een diepte van 100 cm: 12 x 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Volume van de waterkolom: 50,3 × 12	= 603 ml
Concentratie in water: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml of 50 µg/l

▼M1

C.25. AEROBE MINERALISATIE IN OPPERVLAKTEWATER — SIMULATIETEST VOOR BIOLOGISCHE AFBRAAK

1. METHODE

Deze methode is gelijkwaardig aan OESO TG 309 (2004) (1)

1.1. INLEIDING

Deze test is bedoeld om de tijdsduur te meten voor de biologische afbraak van een teststof in lage concentratie in aeroob natuurlijk water en de waarnemingen te kwantificeren in de vorm van kinetische snelheidsweergaven. De simulatietest is een laboratoriumschudkolfstest om de snelheden te bepalen voor de aerobe biologische afbraak van organische stoffen in monsters van natuurlijk oppervlaktewater (zoet, brak of zout). De test is gebaseerd op ISO/DIS 14592-1 (2) en bevat ook elementen van de testmethoden C.23 en C.24 (3)(4). Eventueel kan bij lange testduren een semicontinue in plaats van een ladingsgewijze procedure worden gevolgd, teneinde achteruitgang van de testmicrokosmos te vermijden. Het doel van de simulatietest is in de eerste plaats het bepalen van de mineralisatie van de teststof in oppervlaktewater, en mineralisatie vormt de basis voor de weergave van de afbraakkinetiek. Een optioneel tweede doel van de test is het verkrijgen van gegevens over de primaire afbraak en de vorming van belangrijke omzettingsproducten. Het aantonen van de omzettingsproducten en zo mogelijk het bepalen van de concentraties daarvan is met name van belang voor stoffen die zeer langzaam gemineraliseerd worden (bv. bij halveringstijden van de totale resthoeveelheid ^{14}C van meer dan 60 dagen). Vanwege analysegrenzen moeten voor het aantonen en bepalen van belangrijke omzettingsproducten normaal gesproken hogere concentraties van de teststof (bv. > 100 μg/l) worden gebruikt.

Een lage concentratie in deze test betekent een concentratie (bv. minder dan 1 μg/l tot 100 μg/l) die laag genoeg is om zeker te zijn dat de biologische afbraakkinetiek die uit de test komt overeenkomt met de verwachte kinetiek in het milieu. Vergeleken met de totale hoeveelheid biologisch afbreekbare koolstofsubstraten in het voor de test gebruikte water, zal de in lage concentratie aanwezige teststof optreden als secundair substraat. Dit betekent een verwachte biologische afbraakkinetiek van de eerste orde („non-growth” kinetiek) en een mogelijke afbraak van de teststof door „cometabolisme”. Eerste-ordekinetiek houdt in dat de afbraaksnelheid (mg/l/dag) evenredig is met de gaandeweg afnemende substraatconcentratie. Bij echte eerste-ordekinetiek is de specifieke afbraaksnelheidsconstante k onafhankelijk van de tijd en de concentratie. Dat wil zeggen: k verandert niet merkbaar in de loop van een experiment en evenmin met de concentratieverhoging tussen de experimenten. De specifieke afbraaksnelheidsconstante is per definitie gelijk aan de relatieve concentratieverandering per tijdseenheid: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Hoewel onder de voorgeschreven omstandigheden normaal gesproken eerste-ordekinetiek te verwachten valt, kunnen er bepaalde situaties zijn waarin een andere kinetiek moet worden toegepast. Afwijkingen van eerste-ordekinetiek kunnen bijvoorbeeld worden waargenomen als overdrachtsverschijnselen zoals de diffusiesnelheid, in plaats van de biologische reactiesnelheid, de beperkende factor zijn voor de biologische afbraaksnelheid. De gegevens kunnen echter zo goed als altijd worden beschreven door pseudo-eerste-ordekinetiek met een concentratie-afhankelijke snelheidsconstante.

▼M1

Voorafgaand aan de test dient informatie beschikbaar te zijn over de biologische afbreekbaarheid van de teststof bij hogere concentraties (bv. uit standaard screeningtests) en over de niet-biologische afbreekbaarheid, omzettingsproducten en relevante fysisch-chemische eigenschappen, zodat deze kunnen worden gebruikt bij het opzetten van het experiment en het interpreteren van de resultaten. Met behulp van met ^{14}C gemerkte teststoffen en de bepaling van de faseverdeling van ^{14}C aan het einde van de test kan de totale biologische afbreekbaarheid worden bepaald. Bij gebruik van een ongemerkte teststof kan de totale biologische afbreekbaarheid alleen worden geschat indien een hogere concentratie is getest en alle belangrijke omzettingsproducten bekend zijn.

1.2. DEFINITIES

Primaire biologische afbraak: De structurele verandering (omzetting) van een chemische verbinding door micro-organismen die leidt tot het verlies van chemische identiteit.

Functionele biologische afbraak: De structurele verandering (omzetting) van een chemische verbinding door micro-organismen die leidt tot het verlies van een bepaalde eigenschap.

Totale aerobe biologische afbraak: De afbraak van een chemische verbinding door micro-organismen, in aanwezigheid van zuurstof, tot kooldioxide, water en anorganische zouten van alle andere aanwezige elementen (mineralisatie) en de productie van nieuwe biomassa en organische microbiële biosyntheseproducten.

Mineralisatie: De afbraak van een chemische verbinding of organisch materiaal door micro-organismen, in aanwezigheid van zuurstof, tot kooldioxide, water en anorganische zouten van alle andere aanwezige elementen.

Aanlooptijd: De tijdsduur vanaf de aanvang van de test, totdat adaptatie van de afbrekende micro-organismen heeft plaatsgevonden en de biologische afbraak van een chemische verbinding of organisch materiaal tot een detecteerbaar niveau is gestegen (bv. 10 % van de theoretische maximale afbraak, of lager, afhankelijk van de gevoeligheid van de meettechniek).

Maximale biologische afbraak: Het percentage biologische afbraak van een chemische verbinding of organisch materiaal in een test waarboven geen verdere biologische afbraak plaatsvindt tijdens de test.

Primair substraat: Een verzameling natuurlijke koolstof- en energiebronnen die zorgen voor de groei en de instandhouding van de microbiële biomassa.

Secundair substraat: Een substraatcomponent die in een dermate lage concentratie aanwezig is dat de afbraak ervan slechts verwaarloosbare hoeveelheden koolstof en energie levert aan de werkzame micro-organismen in verhouding tot de hoeveelheden koolstof en energie die worden geleverd door de belangrijkste substraatcomponenten (het primaire substraat).

Afbraaksnelheidsconstante: Een eerste-orde of pseudo-eerste-orde kinetische snelheidsconstante, k (d^{-1}), die de snelheid van het afbraakproces weergeeft. Voor een ladingsgewijs experiment wordt k geschat aan de hand van het begindeel van de afbraakcurve die wordt verkregen na afloop van de aanlooptijd.

▼M1

Halveringstijd, $t_{1/2}$ (d): Term die wordt gebruikt om de snelheid van een eerste-ordereactie aan te geven. Het is het tijdsinterval dat overeenkomt met een afname van de concentratie met een factor 2. Het verband tussen de halveringstijd en de afbraaksnelheidsconstante wordt gegeven door de vergelijking $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Disappearance Time 50, DT_{50} (d): Term die wordt gebruikt om de uitkomst van biologische-afbraaktests te kwantificeren. De DT_{50} is het tijdsinterval, met inbegrip van de aanlooptijd, dat nodig is om een afbraak van 50 procent te bereiken.

Aantoonbaarheidsgrens en bepaalbaarheidsgrens: De aantoonbaarheidsgrens is de laagste concentratie van een stof waarbij de identiteit van de stof nog kan worden onderscheiden van analytische artefacten. De bepaalbaarheidsgrens is de laagste concentratie van een stof waarbij de concentratie nog met aanvaardbare nauwkeurigheid kan worden bepaald.

Opgeloste organische koolstof (DOC): Dat deel van de organische koolstof in een watermonster dat niet door een bepaalde fasescheiding kan worden verwijderd (bv. centrifugering bij 40 000 ms^{-2} gedurende 15 min of membraanfiltratie met membranen met een poriediameter van 0,2 μm-0,45 μm).

Totale organische ^{14}C-activiteit (TOA): De totale ^{14}C-activiteit die is toe te schrijven aan organische koolstof.

Opgeloste organische ^{14}C-activiteit (DOA): De totale ^{14}C-activiteit die is toe te schrijven aan de opgeloste organische koolstof.

Deeltjesvormige organische ^{14}C-activiteit (POA): De totale ^{14}C-activiteit die is toe te schrijven aan organische koolstofdeeltjes.

1.3. TOEPASBAARHEID VAN DE TEST

Deze simulatietest is toepasbaar op niet-vluchtige of licht vluchtige organische stoffen, in lage concentraties. Bij gebruik van niet-luchtdichte kolven (bv. afgesloten met watten), kunnen stoffen met een constante van de wet van Henry van minder dan ongeveer 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (zo'n 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) worden beschouwd als in de praktijk niet-vluchtig. Bij gebruik van afgesloten kolven met gasruimte is het mogelijk om licht vluchtige stoffen te testen (met een constante van de wet van Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ of < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) zonder dat er verliezen optreden uit het testsysteem. Als niet de juiste voorzorgsmaatregelen worden genomen kan verlies van met ^{14}C gemerkte stoffen optreden wanneer de CO_2 wordt verwijderd. In dergelijke situaties kan het noodzakelijk zijn de CO_2 weg te vangen in een extern CO_2-absorbtiesysteem (voor directe $^{14}CO_2$-bepaling; zie aanhangsel 3). Voor de bepaling van de biologische afbraakkinetiek moeten de teststofconcentraties lager zijn dan de oplosbaarheid van de teststof in water. Er zij evenwel gewezen dat de literatuurwaarden voor de oplosbaarheid in water aanzienlijk hoger kunnen zijn dan de oplosbaarheid van de teststof in natuurlijk water. Eventueel kan de oplosbaarheid van bijzonder slecht in water oplosbare teststoffen worden vastgesteld met gebruik van het te testen natuurlijke water.

De methode kan worden gebruikt voor het simuleren van de biologische afbraak in oppervlaktewater dat vrij is van grove deeltjes („pelagische test") of in troebel oppervlaktewater dat bv. afkomstig kan zijn van een water/sediment-grensvlak („gesuspendeerd-sedimenttest").

▼M1

1.4. PRINCIPE VAN DE TEST

De test wordt ladingsgewijs uitgevoerd door de teststof te incuberen met hetzij alleen oppervlaktewater („pelagische test") of oppervlaktewater dat is aangevuld met 0,01 g drooggewicht/l gesuspendeerde vaste stof/sediment („gesuspendeerd-sedimenttest") ter simulatie van een waterlichaam met gesuspendeerde vaste stof of geresuspendeerd sediment. De concentratie gesuspendeerde vaste stof/sediment in de lagere regionen van dit interval is kenmerkend voor het meeste oppervlaktewater. De testkolven worden in het donker, bij omgevingstemperatuur, onder aerobe omstandigheden en onder roeren geïncubeerd. Om de afbraakkinetiek te bepalen moeten ten minste twee verschillende teststofconcentraties worden gebruikt, die met een factor 5 tot 10 van elkaar verschillen en het verwachte concentratiebereik in het milieu vertegenwoordigen. De maximale teststofconcentratie mag niet boven 100 µg/l liggen, maar maximale testconcentraties van 10 µg/l of lager verdienen de voorkeur, opdat de biologische afbraak volgens eerste-ordekinetiek verloopt. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 10 µg/Al, maar laagste testconcentraties van 1-2 µg/l of lager verdienen de voorkeur. Normaal gesproken kan een adequate analyse van zulke lage concentraties worden bereikt met behulp van in de handel verkrijgbare met ^{14}C gemerkte stoffen. Vanwege analytische grenzen is het dikwijls onmogelijk de teststofconcentratie met de vereiste nauwkeurigheid te meten indien met een teststof concentratie ≤ 100 µg/l wordt gewerkt (zie de tweede alinea van paragraaf 1.7.2). Hogere teststofconcentraties (> 100 µg/l en soms > 1 mg/l) kunnen worden gebruikt voor het aantonen en bepalen van belangrijke omzettingsproducten of als een specifieke analysemethode met een lage aantoonbaarheidsgrens niet beschikbaar is. Als getest wordt met hoge teststofconcentraties, kan het zijn dat de resultaten niet kunnen worden gebruikt voor het schatten van de eerste-orde afbraakconstante en halveringstijd, daar de afbraak waarschijnlijk niet volgens eerste-ordekinetiek verloopt.

De afbraak wordt gevolgd met gewenste tijdsintervallen, door hetzij de resthoeveelheid ^{14}C te meten, hetzij de restconcentratie van de teststof, bij gebruik van een specifieke chemische analyse. Door het meest stabiele deel van het molecuul te merken met ^{14}C kan de totale mineralisatie worden bepaald, terwijl door een minder stabiel deel van het molecuul met ^{14}C te merken, en door specifieke analyse te gebruiken, enkel de primaire biologische afbraak kan worden bepaald. Het meest stabiele deel bevat echter niet noodzakelijkerwijs het relevante functionele gedeelte van het molecuul (het gedeelte dat in verband gebracht kan worden met een specifieke eigenschap zoals toxiciteit, bioaccumulatie, etc.). Als dit het geval is kan het wenselijk zijn een teststof te gebruiken die met ^{14}C gemerkt is in het functionele deel, teneinde de eliminatie van de specifieke eigenschap te volgen.

1.5. INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

In deze test kunnen zowel radioactief gemerkte teststoffen als ongemerkte teststoffen worden gebruikt. ^{14}C-merking wordt aanbevolen en normaal gesproken moet het meest stabiele deel/moeten de meest stabiele delen van het molecuul worden gemerkt (zie ook paragraaf 1.4). Voor stoffen die meer dan een aromatische ring bevatten worden bij voorkeur in elke ring een of meerdere koolstofatomen met ^{14}C gemerkt. Bovendien moeten bij voorkeur aan weerszijden van gemakkelijk afbreekbare bindingen een of meer koolstofatomen met ^{14}C worden gemerkt. De chemische en/of radiochemische zuiverheid van de teststof moet > 95 % zijn. De specifieke activiteit bij radioactief gemerkte stoffen is bij voorkeur ongeveer 50 µCi/mg (1,85 MBq) of meer, ten behoeve van de ^{14}C-metingen in tests met lage beginconcentraties. Over de teststof moeten de volgende gegevens beschikbaar zijn:

▼**M1**

— de oplosbaarheid in water [Methode A.6];

— de oplosbaarheid in organisch(e) oplosmiddel(en) (voor stoffen die met een oplosmiddel worden toegevoegd of met een lage oplosbaarheid in water);

— de dissociatieconstante (pKa) als de stof onderhevig is aan protonering of deprotonering [OECD TG 112] (5);

— de dampspanning [Methode A.4] en de constante van de wet van Henry;

— de chemische stabiliteit in water en in het donker (hydrolyse) [Methode C.7].

Bij het testen van slecht in water oplosbare stoffen in zeewater kan het ook nuttig zijn om de uitzoutingsconstante (of „constante van Setsjenov") K^s te weten, die wordt gedefinieerd als log (S/S') = K^s C_m, waarin S en S' staan voor de oplosbaarheid van de stof in respectievelijk zoet water en zout water, en C_m voor de molaire zoutconcentratie.

Als de test wordt uitgevoerd als „gesuspendeerd-sedimenttest" moeten de volgende gegevens beschikbaar zijn:

— de verdelingscoëfficiënt n-octanol/water [Methode A.8];

— de adsorptiecoëfficiënt [Methode C.18];

Andere gegevens die van pas kunnen komen zijn o.a.:

— de concentratie in het milieu, indien bekend of geschat;

— de toxiciteit van de teststof voor micro-organismen [Methode C.11];

— de „gemakkelijke" en/of inherente biologische afbreekbaarheid [Methoden C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];

— de aerobe en anaerobe biologische afbreekbaarheid in de bodem en de omzetting in aquatische sedimentsystemen [Methoden C.23, C.24].

1.6. REFERENTIESTOF

Als referentiestof moet een stof worden gebruikt die normaal gesproken onder aerobe omstandigheden gemakkelijk wordt afgebroken (bv. aniline of natriumbenzoaat). Het verwachte tijdsinterval voor de afbraak van aniline en natriumbenzoaat is over het algemeen minder dan 2 weken. Met de referentiestoffen kan men zich ervan vergewissen dat de microbiële activiteit van het testwater zich binnen bepaalde grenzen bevindt, d.w.z. dat het water een actieve microbiële populatie bevat.

▼M1

1.7. KWALITEITSCRITERIA

1.7.1. **Recovery**

Onmiddellijk na de toevoeging van de teststof moet de aanvankelijke testconcentratie worden gecontroleerd door meting van de ^{14}C-activiteit of door chemische analysemethoden in geval van ongemerkte stoffen, en dit dient ten minste in duplo te gebeuren. Dit verschaft informatie over de toepasbaarheid en de herhaalbaarheid van de analysemethode en over de homogeniteit van de teststofverdeling. Normaal gesproken wordt in de verdere analysen van gegevens de gemeten aanvankelijke ^{14}C-activiteit of teststofconcentratie gebruikt in plaats van de nominale concentratie, aangezien verliezen door sorptie of doseringsfouten daarmee worden opgevangen. Bij een met ^{14}C gemerkte teststof wordt de recovery aan het einde van het experiment gegeven door de massabalans (zie de laatste alinea van paragraaf 1.8.9.4). Idealiter moet de massabalans voor radioactief gemerkte stoffen tussen 90 % en 110 % liggen, terwijl de nauwkeurigheid van de analyse een aanvankelijke recovery tussen 70 % en 110 % moet opleveren voor ongemerkte teststoffen. Deze bereiken moeten worden opgevat als streefcijfers en moeten niet worden gebruikt als criteria voor de aanvaardbaarheid van de test. Eventueel kan de nauwkeurigheid van de analyse worden bepaald voor de teststof bij een lagere concentratie dan de beginconcentratie en voor belangrijke omzettingsproducten.

1.7.2. **Herhaalbaarheid en gevoeligheid van de analysemethode**

De herhaalbaarheid van de analysemethode (inclusief de efficiëntie van de extractie in het begin) voor de kwantitatieve bepaling van de teststof, en indien van toepassing de omzettingsproducten, moet worden gecontroleerd aan de hand van een analyse in vijfvoud van individuele extracties van het wateroppervlak.

De aantoonbaarheidsgrens van de analysemethode voor de teststof en voor de omzettingsproducten moet mogelijkerwijs zodanig zijn dat ten minste 1 % van de aanvankelijk aan het testsysteem toegevoegde hoeveelheid kan worden aangetoond. De bepaalbaarheidsgrens mag niet hoger zijn dan 10 % van de toegevoegde concentratie. Omwille van de chemische analyse van veel organische stoffen en hun omzettingsproducten is het dikwijls noodzakelijk dat de teststof in een betrekkelijk hoge concentratie wordt toegevoegd, d.w.z. > 100 μg/l.

1.8. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.8.1. **Apparatuur**

De test kan worden uitgevoerd in conische of cilindervormige kolven met de vereiste inhoud (bv. 0,5 of 1,0 liter), die worden afgesloten met een siliconen of rubberen stop, of in CO_2-dichte serumflessen (bv. met butylrubberen septum). Een andere optie is de test uit te voeren met behulp van meerdere kolven en bij elk monsterinterval een hele kolf te nemen, ten minste in tweevoud (zie de laatste alinea van paragraaf 1.8.9.1). Voor niet-vluchtige, ongemerkte teststoffen is gasdichte afsluiting niet nodig; een losse prop watten ter voorkoming van verontreiniging vanuit de lucht is afdoende (zie tweede alinea van paragraaf 1.8.9.1). Licht vluchtige stoffen moeten worden getest in een biometersysteem, waarbij het wateroppervlak zachtjes wordt geroerd. Om bacteriële verontreiniging uit te sluiten, kunnen de vaten eventueel worden gesteriliseerd door ze voor gebruik te verhitten of te autoclaveren. Daarnaast wordt de volgende standaard-laboratoriumapparatuur gebruikt:

— een schudtafel of magneetroerders om de testkolven voortdurend in beweging te houden;

▼M1

— een centrifuge;

— een pH-meter;

— een troebelheidsmeter voor nephelometrische troebelheidsmetingen;

— een oven of magnetronoven voor drooggewichtbepalingen;

— membraanfiltratieapparaat;

— autoclaaf of oven voor hittesterilisatie van het glaswerk;

— voorzieningen om met ^{14}C gemerkte stoffen te werken;

— apparatuur om de ^{14}C-activiteit te bepalen in CO_2-absorptieoplossingen en indien nodig in sedimentmonsters;

— analyseapparatuur voor de bepaling van de teststof (en referentiestoffen), bij gebruik van specifieke chemische analyse (bv. gaschromatografie of hogedrukvloeistofchromatografie).

1.8.2. **Stockoplossingen van de teststof**

Voor de bereiding van de stockoplossingen van de teststof en de referentiestoffen wordt gedeïoniseerd water gebruikt (zie de eerste alinea van paragraaf 1.8.7). Het gedeïoniseerde water mag geen stoffen bevatten die toxisch zijn voor micro-organismen, en de hoeveelheid opgeloste organische koolstof (DOC) mag niet hoger zijn dan 1 mg/l (6).

1.8.3. **Verzameling en vervoer van het oppervlaktewater**

De monsternemingsplaats voor het verzamelen van het oppervlaktewater moet in iedere gegeven situatie worden uitgekozen in overeenstemming met het doel van de test. Bij het kiezen van monsternemingsplaatsen moet rekening gehouden worden met stoffen die wellicht in het verleden vanuit de landbouw, industrie of huishoudens op die plaats zijn terechtgekomen. Als bekend is dat een aquatisch milieu in de voorgaande vier jaar verontreinigd is met de teststof of structureel analoge verbindingen, moet het niet worden gebruikt voor het verzamelen van testwater, tenzij men juist onderzoek wil doen naar de afbraaksnelheden op eerder blootgestelde locaties. De pH en de temperatuur van het water moeten op de monsternemingsplaats worden gemeten. Bovendien moeten de monsternemingsdiepte en het uiterlijk van het watermonster (bv. de kleur en de troebelheid) worden opgeschreven (zie paragraaf 3). Om aerobe omstandigheden aan te tonen moet de zuurstofconcentratie en/of de redoxpotentiaal in het water en in de bovenste sedimentlaag worden gemeten, tenzij dit vanzelf spreekt op grond van het uiterlijk en ervaringen met de plaats uit het verleden. Het oppervlaktewater moet worden vervoerd in een grondig gereinigde bak. Tijdens het vervoer mag de temperatuur van het monster de testtemperatuur niet significant overschrijden. Indien het vervoer langer duurt dan 2 tot 3 uur wordt aanbevolen het monster te koelen tot 4 °C. Het watermonster mag niet worden bevroren.

▼M1

1.8.4. **Opslag en behandeling van het oppervlaktewater**

De test moet bij voorkeur binnen één dag na de monsterneming worden gestart. Als opslag van het water nodig is moet de opslagperiode zoveel mogelijk worden beperkt en in geen geval meer dan 4 weken duren. Het watermonster moet tot gebruik op 4 °C worden gehouden met beluchting. Voor gebruik moeten de grove deeltjes worden verwijderd, bv. door filtratie met een nylonfilter met een maaswijdte van ca. 100 μm, met een grof papierfilter, of door bezinking.

1.8.5. **Behandeling van water aangevuld met sediment (optioneel)**

Voor de gesuspendeerd-sedimenttest wordt sediment uit de bovenste sedimentlaag toegevoegd aan de kolven met natuurlijk water (dat is gefilterd ter verwijdering van grove deeltjes, zoals beschreven in paragraaf 1.8.4), zodat een suspensie wordt verkregen; de concentratie van gesuspendeerde vaste stof moet tussen 0,01 en 1 g/l liggen. Dit oppervlaktesediment moet afkomstig zijn van dezelfde monsternemingsplaats als het watermonster. Afhankelijk van het specifieke aquatische milieu kan het oppervlaktesediment gekenmerkt worden door een hoog organisch koolstofgehalte (2,5-7,5 %) en een fijne textuur of door een laag organisch koolstofgehalte (0,5-2,5 %) en een grove textuur (3). Het oppervlaktesediment moet als volgt worden behandeld: steek meerdere sedimentkernen met behulp van een buisje van doorzichtig plastic, verwijder onmiddellijk na de monsterneming de bovenste aerobe lagen (van het oppervlak tot een diepte van maximaal 5 mm) en voeg de sedimentkernen samen. Het resulterende sedimentmonster moet worden vervoerd in een bak met een grote luchtruimte om het sediment onder aerobe omstandigheden te houden (als het vervoer langer duurt dan 2-3 uur moet gekoeld worden tot 4 °C). Het sedimentmonster moet in het testwater worden gesuspendeerd in een verhouding van 1:10 en op 4 °C worden gehouden met beluchting tot gebruik. Als opslag van het sediment nodig is moet de opslagperiode zoveel mogelijk worden beperkt en in geen geval meer dan 4 weken duren.

1.8.6. **Semicontinue procedure (optioneel)**

Bij een lange aanlooptijd voordat een significante afbraak van de teststof kan worden gemeten kan een langdurige incubatie (van meerdere maanden) noodzakelijk zijn. Indien dit bekend is van eerdere testen met een bepaalde stof, kan de test worden gestart door middel van een semicontinue procedure, waarbij een deel van het testwater of de testsuspensie periodiek kan worden vernieuwd (zie aanhangsel 2). Een tweede mogelijkheid is dat de normale ladingsgewijze test kan worden veranderd in een semicontinue test, indien er gedurende een testperiode van ongeveer 60 dagen met de ladingsgewijze procedure geen afbraak van de teststof is bereikt (zie de tweede alinea van paragraaf 1.8.8.3).

1.8.7. **Toevoeging van de teststof (of referentiestof)**

Van stoffen met een hoge oplosbaarheid in water (> 1 mg/l) en een lage vluchtigheid (constante van de wet van Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ of < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) kan een stockoplossing worden bereid in gedeïsoniseerd water (zie paragraaf 1.8.2); het vereiste volume van de stockoplossing wordt aan de testvaten toegevoegd om de gewenste concentratie te bereiken. Het volume aan toegevoegde stockoplossing moet tot een praktisch minimum worden beperkt (< 10 % van het uiteindelijke vloeistofvolume, indien mogelijk). Een andere procedure is om de teststof in een groter volume testwater op te lossen, dat kan worden beschouwd als alternatief voor het gebruik van organische oplosmiddelen.

▼M1

Indien noodzakelijk kunnen stockoplossingen van niet-vluchtige stoffen met een lage oplosbaarheid in water worden bereid met behulp van een vluchtig organisch oplosmiddel, maar de aan het testsysteem toegevoegde hoeveelheid oplosmiddel mag niet hoger zijn dan 1 % v/v en mag geen nadelige effecten hebben op de microbiële activiteit. Het oplosmiddel mag de stabiliteit van de teststof in water niet beïnvloeden. Het oplosmiddel moet tot een uiterst kleine hoeveelheid worden beperkt, zodat het de DOC-concentratie van het testwater of de testsuspensie niet significant verhoogt. Dit moet worden gecontroleerd door middel van een stofspecifieke analyse of, indien mogelijk, een DOC-analyse (6). Gezorgd moet worden dat de overgebrachte hoeveelheid oplosmiddel tot het strikt noodzakelijke wordt beperkt, en dat de hoeveelheid teststof in het uiteindelijke volume testwater kan oplossen. Andere technieken om de teststof aan de testvaten toe te voegen kunnen worden gebruikt zoals beschreven in (7) en (8). Wanneer voor de toevoeging van de teststof een organisch oplosmiddel wordt gebruikt, dient een oplosmiddelcontrolegroep met testwater zonder toevoegingen en testwater met toegevoegde referentiestof op gelijke wijze te worden behandeld als de actieve testvaten waaraan teststof in oplosmiddel is toegevoegd. Het doel van deze oplosmiddelcontrolegroep is om mogelijke negatieve effecten van het oplosmiddel op de microbiële populatie te onderzoeken aan de hand van de afbraak van de referentiestof.

1.8.8. **Testomstandigheden**

1.8.8.1. *Testtemperatuur*

De incubatie dient in het donker plaats te vinden (bij voorkeur) of in diffuus licht, en bij gecontroleerde temperatuur (± 2 °C), hetzij de temperatuur in het veld, hetzij een standaardtemperatuur van 20-25 °C. De temperatuur in het veld kan de daadwerkelijke monstertemperatuur zijn op het monsternemingstijdstip of de gemiddelde temperatuur op de monsternemingsplaats.

1.8.8.2. *Schudden/roeren*

Om de deeltjes en micro-organismen in suspensie te houden moet continu worden geschud of geroerd. Dit bevordert eveneens de zuurstofoverdracht uit de luchtruimte naar de vloeistof voor een adequate handhaving van de aerobe omstandigheden. Plaats de kolven op een schudtafel (schudsnelheid ongeveer 100 omwentelingen/min) of gebruik magneetroerders. Het schudden/roeren moet continu zijn, maar niet harder dan noodzakelijk om de suspensie homogeen te houden.

1.8.8.3. *Testduur*

De test mag normaal gesproken niet langer duren dan 60 dagen, tenzij de semicontinue procedure met periodieke vernieuwing van de testoplossing wordt toegepast (zie paragraaf 1.8.6 en aanhangsel 2). De testduur voor de ladingsgewijze test kan echter worden verlengd tot maximaal 90 dagen, indien de afbraak van de teststof binnen de eerste 60 dagen is begonnen. De afbraak wordt met geschikte tijdsintervallen gemonitord door bepaling van de resterende ^{14}C-activiteit of van de $^{14}CO_2$-ontwikkeling (zie paragraaf 1.8.9.4), en/of door chemische analyse (paragraaf 1.8.9.5). De incubatietijd moet lang genoeg zijn om het afbraakproces te kunnen berekenen. De mate van afbraak moet bij voorkeur de 50 % overschrijden, en voor langzaam afbreekbare stoffen moet de mate van afbraak afdoende zijn (normaal gesproken groter dan 20 % afbraak) om het schatten van een kinetische afbraaksnelheidsconstante mogelijk te maken.

▼M1

Op gezette tijden moeten de pH en de zuurstofconcentratie in het testsysteem worden gemeten, tenzij eerdere ervaringen met soortgelijke tests met water- en sedimentmonsters van dezelfde monsternemingsplaats dergelijke metingen overbodig maken. Onder sommige omstandigheden kan de metabolisering van primaire substraten bij veel hogere concentraties in het water of het sediment mogelijk leiden tot een zodanige CO_2-ontwikkeling en zuurstofdepletie dat de experimentele omstandigheden gedurende de test significant worden gewijzigd.

1.8.9. **Procedure**

1.8.9.1. *Bereiding van de kolven voor de pelagische test*

Vul de testkolven met een geschikt volume van het testwater, ten hoogste ongeveer een derde van het kolfvolume en ten minste zo'n 100 ml. Bij gebruik van meerdere kolven (zodat bij iedere monsterneming een hele kolf kan worden genomen) is het geschikte testwatervolume eveneens zo'n 100 ml, aangezien kleine monstervolumes invloed kunnen hebben op de lengte van de aanlooptijd. De teststof wordt toegevoegd vanuit een stockoplossing, zoals beschreven in de paragrafen 1.8.2 en 1.8.7. Voor de bepaling van de afbraakkinetiek en de berekening van de afbraaksnelheidsconstante moeten ten minste twee verschillende teststofconcentraties worden gebruikt die een factor 5 tot 10 van elkaar verschillen. Beide gekozen concentraties moeten lager zijn dan 100 μg/l en bij voorkeur in het bereik liggen van < 1-10 μg/l.

Sluit de kolven af met lucht- en CO_2-dichte stoppen of deksels. Voor niet-^{14}C-gemerkte niet-vluchtige testverbindingen zijn losse propjes watten ter voorkoming van verontreiniging vanuit de lucht afdoende (zie paragraaf 1.8.1), mits van alle belangrijke afbraakproducten bekend is dat ze niet vluchtig zijn en bij gebruik van indirecte CO_2-bepaling (zie aanhangsel 3).

Incubeer de kolven bij de gekozen temperatuur (zie paragraaf 1.8.8.1). Monsters voor chemische analyse en ^{14}C-metingen moeten worden genomen bij het begin van de test (d.w.z. voordat de afbraak begint; zie paragraaf 1.7.1) en vervolgens met geschikte tijdsintervallen in de loop van de test. De monsterneming kan worden uitgevoerd door submonsters af te nemen (bv. aliquots van 5 ml) uit elke replicaat-kolf, of bij elke monsterneming een hele kolf te nemen. De mineralisatie van de teststof kan zowel indirect als direct worden bepaald (zie aanhangsel 3). Over het algemeen zijn gedurende de afbraakfase (d.w.z. na de aanlooptijd) minimaal vijf monsternemingen vereist voor een betrouwbare schatting van de snelheidsconstante, tenzij voor snel afbreekbare stoffen kan worden verantwoord dat drie monsternemingen voldoende zijn. Omdat bij stoffen die minder snel worden afgebroken gemakkelijk meer metingen kunnen worden gedaan tijdens de afbraakfase moeten meer meetpunten worden gebruikt voor de schatting van k. Vanwege de uiteenlopende biologische afbraaksnelheden kan geen vast tijdsschema worden gegeven voor de monsterneming; bij langzame afbraak wordt evenwel aanbevolen om eens per week een monster te nemen. Als de teststof snel wordt afgebroken moet gedurende de eerste drie dagen eens per dag een monster worden genomen en daarna eens in de twee of drie dagen. Onder bepaalde omstandigheden, zoals bij zeer snel gehydrolyseerde stoffen, kan het nodig zijn om met intervallen van uren te bemonsteren. Aanbevolen wordt om voorafgaand aan de test een verkennende test uit te voeren om de geschikte monsternemingsintervallen te bepalen. Als er monsters beschikbaar moeten zijn voor verdere specifieke analyse, is het aan te bevelen meerdere monsters te nemen en de te analyseren monsters na afloop van het experiment uit te kiezen volgens een „achterwaartse" strategie, d.w.z. de laatste monsters worden als eerste geanalyseerd (zie de tweede alinea van paragraaf 1.8.9.5 voor advies over de stabiliteit van monsters tijdens opslag).

▼M1

1.8.9.2. *Aantal kolven en monsters*

Gebruik voldoende testkolven om te kunnen beschikken over:

— testkolven; ten minste twee kolven voor elke teststofconcentratie (maar bij voorkeur minimaal drie) of meerdere testkolven voor iedere concentratie, als bij elke monsterneming een hele kolf wordt genomen (symbool: F_T);

— testkolven voor de berekening van de massabalans; ten minste twee kolven voor iedere testconcentratie (symbool: F_M);

— blancocontrole, zonder teststof; ten minste één blanco testkolf met alleen testwater (symbool: F_B);

— referentiecontrole; twee kolven met referentiestof (bv. aniline of natriumbenzoaat, concentratie: 10 μg/l) (symbool:F_C). De referentiecontrole is bedoeld ter bevestiging van een minimum aan microbiële activiteit. Indien gewenst kan een radioactief gemerkte referentiestof worden gebruikt, ook wanneer de afbraak van de teststof wordt gemonitord met behulp van chemische analyse;

— steriele controle; een of twee kolven met gesteriliseerd testwater voor het onderzoeken of er mogelijk niet-biologische afbraak of ander niet-biologisch verlies van teststof plaatsvindt (symbool: F_S). De biologische activiteit kan worden gestopt door het testwater te autoclaveren (20 min bij 121 °C), of door een giftige stof toe te voegen (bv. natriumazide (NaN_3) in een concentratie van 10-20 g/l, kwikchloride ($HgCl_2$) in een concentratie van 100 mg/l of formaline in een concentratie van 100 mg/l), of door bestraling met gammastraling. Bij gebruik van $HgCl_2$ moet dit worden weggegooid als toxisch afval. Voor water waaraan een grote hoeveelheid sediment is toegevoegd, is het niet gemakkelijk steriele omstandigheden te bereiken; in dat geval wordt aanbevolen meermaals te autoclaveren (bv. driemaal). Houd er rekening mee dat de sorptie-eigenschappen van het sediment kunnen veranderen als gevolg van het autoclaveren;

— oplosmiddelcontroles, met testwater en testwater met referentiestof; twee kolven worden behandeld met dezelfde hoeveelheid oplosmiddel en volgens dezelfde procedure als voor de toevoeging van de teststof. Het doel hiervan is om, door de afbraak van de referentiestof te bepalen, na te gaan of het oplosmiddel een nadelige invloed heeft.

Bij het ontwerpen van de test moet de onderzoeker rekening houden met het relatieve belang van hogere experimentele replicatie ten opzichte van een groter aantal monsternemingtijdstippen. Het exacte aantal benodigde kolven zal afhangen van de methode die wordt gebruikt voor het meten van de afbraak (zie de derde alinea van paragraaf 1.8.9.1; paragraaf 1.8.9.4 en aanhangsel 3).

▼M1

Uit iedere testkolf moeten op elk monsternemingstijdstip twee submonsters worden genomen (bv. aliquots van 5 ml). Als meerdere kolven worden gebruikt om hele kolven te kunnen nemen, moeten hiervoor op elk monsternemingstijdstip ten minste twee kolven worden bestemd (zie eerste alinea van paragraaf 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Bereiding van de kolven voor de gesuspendeerd-sedimenttest [optioneel]*

Voeg de noodzakelijke volumes testwater en, indien nodig, sediment toe aan de testvaten (zie paragraaf 1.8.5). De bereiding van de vaten voor de gesuspendeerd-sedimenttest is hetzelfde als bij de pelagische test (zie de paragrafen 1.8.9.1 en 1.8.9.2). Gebruik bij voorkeur serumflessen of gelijkvormige kolven. Plaats de afgesloten kolven horizontaal op een schudtafel. Uiteraard moeten open kolven voor niet-^{14}C-gemerkte, niet-vluchtige stoffen rechtop worden geplaatst; in dit geval wordt magnetisch roeren met behulp van glas-gecoate roerstaafjes aanbevolen. Indien nodig kunnen de kolven worden belucht om daadwerkelijk aerobe omstandigheden te handhaven.

1.8.9.4. *Radiochemische bepalingen*

De $^{14}CO_2$-ontwikkeling kan indirect en direct worden gemeten (zie aanhangsel 3). Voor de indirecte $^{14}CO_2$-bepaling wordt gekeken naar het verschil tussen de aanvankelijke ^{14}C-activiteit in het testwater of de testsuspensie en de totale restactiviteit op het monsternemingstijdstip, zoals die wordt gemeten na het aanzuren van het monster tot pH 2-3 en het verwijderen van de CO_2. Op die manier wordt de anorganische koolstof verwijderd en is de gemeten restactiviteit afkomstig van organisch materiaal. Indirecte $^{14}CO_2$-bepaling moet niet worden gebruikt als tijdens de omzetting van de teststof belangrijke vluchtige omzettingsproducten worden gevormd (zie aanhangsel 3). Indien mogelijk moet de $^{14}CO_2$-ontwikkeling direct worden gemeten (zie aanhangsel 3), op elk monsternemingstijdstip in ten minste één testkolf; met deze werkwijze kan zowel de massabalans als het biologisch afbraakproces worden gecontroleerd, maar zij is alleen toepasbaar bij tests die worden uitgevoerd met afgesloten kolven.

Als de $^{14}CO_2$-ontwikkeling direct wordt gemeten tijdens de test, moeten hiervoor aan het begin van de test meer kolven worden klaargemaakt. Directe $^{14}CO_2$-bepaling wordt aanbevolen als tijdens de omzetting van de teststof belangrijke vluchtige omzettingsproducten worden gevormd. Bij elk meetpunt worden de aanvullende testkolven aangezuurd tot pH 2-3 en wordt $^{14}CO_2$ opgevangen in een intern of extern absorbens (zie aanhangsel 3).

Eventueel kunnen de concentraties van de met ^{14}C gemerkte teststof en van de belangrijke omzettingsproducten worden bepaald met behulp van radiochromatografie (dunnelaagchromatografie, RAD-TLC) of HPLC met radiochemische detectie.

Eventueel kan de faseverdeling van de resterende radioactiviteit (zie aanhangsel 1), de resterende referentiestof en de omzettingsproducten worden bepaald.

▼M1

Aan het einde van de test moet de massabalans worden bepaald aan de hand van directe $^{14}CO_2$-meting, met behulp van aparte testkolven waaruit in de loop van de test geen monsters zijn genomen (zie aanhangsel 3).

1.8.9.5. *Specifieke chemische analyse*

Indien een gevoelige analysemethode beschikbaar is, kan de biologische afbraak worden bepaald door het meten van de totale restconcentratie van de teststof, in plaats van het gebruik van radioactieve merking. Bij gebruik van een radioactief gemerkte teststof (om de totale mineralisatie te meten) kunnen specifieke chemische analysemethoden parallel hieraan worden uitgevoerd om nuttige aanvullende informatie te verkrijgen en om de procedure te controleren. Specifieke chemische analysemethoden kunnen ook worden gebruikt om de bij de afbraak van de teststof gevormde omzettingsproducten te meten. Dit word aanbevolen voor gemineraliseerde stoffen met halveringstijden van meer dan 60 dagen. De concentraties van de teststof en de omzettingsproducten moeten op elk monsternemingstijdstip worden gemeten en gerapporteerd (als concentratie en als percentage van de toegevoegde hoeveelheid). Over het algemeen moeten bij elk monsternemingstijdstip de omzettingsproducten worden geïdentificeerd die in een concentratie $\geq$ 10 % van de toegevoegde concentratie worden gedetecteerd. Ook voor omzettingsproducten waarvan de concentraties tijdens het onderzoek voortdurend toenemen moet identificatie worden overwogen, zelfs als de concentraties ervan de hierboven gegeven grens niet bereiken, aangezien dit kan wijzen op persistentie. Ook het analyseren van omzettingsproducten in steriele controlekolven verdient te worden overwogen, als snelle niet-biologische omzetting van de teststof (bv. hydrolyse) mogelijk wordt geacht. Of het nodig is omzettingsproducten te kwantificeren en te identificeren moet van geval tot geval worden overwogen en moet worden verantwoord in het verslag. Extractietechnieken met organische oplosmiddelen moeten worden toegepast in overeenstemming met de aanwijzingen die in de desbetreffende analyseprocedures worden gegeven.

Indien de analyse binnen 24 uur wordt uitgevoerd (hetgeen de voorkeur verdient) moeten alle monsters bij 2 tot 4 °C luchtdicht worden opgeslagen. Voor langere opslag moeten de monsters worden bevroren onder – 18 °C of chemisch worden geconserveerd. Aanzuring is af te raden als methode om monster te conserveren, daar aangezuurde monsters instabiel kunnen zijn. Indien de monsters niet binnen 24 uur worden geanalyseerd en langduriger worden bewaard, moet een onderzoek worden uitgevoerd naar de stabiliteit bij opslag, om de stabiliteit van de betreffende verbindingen bij opslag onder – 18 °C of onder geconserveerde omstandigheden aan te tonen. Indien de analysemethode extractie met oplosmiddelen of vaste-fase-extractie (SPE) omvat, moet de extractie onmiddellijk na de monsterneming of na gekoelde opslag van het monster gedurende maximaal 24 uur worden uitgevoerd.

Afhankelijk van de gevoeligheid van de analysemethode kunnen grotere monstervolumes dan in paragraaf 1.8.1 aangegeven nodig zijn. De test kan gemakkelijk worden uitgevoerd met testvolumes van een liter in kolven van 2-3 liter, waardoor het mogelijk wordt monsters te nemen van ca. 100 ml.

▼M1

2. **GEGEVENS EN RAPPORTAGE**

2.1. BEHANDELING VAN DE GEGEVENS

2.1.1. **Grafiek van de gegevens**

Rond de monsternemingstijdstippen af op een geheel aantal uren (tenzij de stof in een tijdspanne van minuten een substantiële afbraak ondergaat) maar niet op een geheel aantal dagen. Zet de geschatte restactiviteit van de teststof (voor met ^{14}C gemerkte stoffen) of de restconcentratie (voor ongemerkte stoffen) uit tegen de tijd in zowel een lineaire grafiek als in een semilogaritmische grafiek (zie de figuren 1a en 1b). Vergelijk, als afbraak heeft plaatsgevonden, de resultaten van de F_T-kolven met die van de F_S-kolven. Als de gemiddelde resultaten van de kolven met teststof (F_T) en de steriele kolven (F_S) minder dan 10 % van elkaar verschillen, kan worden aangenomen dat de waargenomen afbraak hoofdzakelijk niet-biologisch is. Als de afbraak in de F_S-kolven lager is, kunnen de cijfers worden gebruikt om de resultaten van de F_T-kolven te corrigeren (door aftrekking) om de mate van biologische afbraak te schatten. Wanneer optionele analysen van de omzettingsproducten zijn uitgevoerd, moeten naast een grafiek van de afbraak van de teststof grafieken van de vorming en afbraak van die omzettingsproducten worden geleverd.

Schat de aanloopfase t_L uit de afbraakcurve (de semilogaritmische grafiek) door het lineaire gedeelte te extrapoleren tot nul afbraak of anders door de tijd te bepalen tot ongeveer 10 % afbraak (zie de figuren 1a en 1b). Schat aan de hand van de semilogaritmische grafiek de eerste-orde snelheidsconstante k, en de bijbehorende standaarddeviatie door lineaire regressie van de natuurlijke logaritme van de resterende ^{14}C-activiteit/teststofconcentratie tegen de tijd. Met name bij ^{14}C-metingen moeten alleen gegevens worden gebruikt vanuit het eerste lineaire gedeelte van de grafiek na afloop van de aanlooptijd, en verdient het de voorkeur te kiezen voor weinig gegevens die representatief zijn boven veel gegevens met een grotere onzekerheid. Onder onzekerheid vallen hierbij de fouten die inherent zijn aan het aanbevolen directe gebruik van de meetwaarden voor de resterende ^{14}C-activiteit (zie hieronder). Indien de afbraak een tweefasig patroon volgt, kan het soms relevant zijn om twee verschillende waarden voor de snelheidsconstante te berekenen. Hiertoe worden twee verschillende fasen van de afbraakcurve gedefinieerd. De snelheidsconstante k en de halveringstijd $t_{½} = \ln 2/k$ moeten voor iedere replicaat-kolf apart worden berekend, wanneer submonsters uit dezelfde kolf worden genomen, dan wel berekend op grond van gemiddelde waarden, wanneer op ieder monsternemingstijdstip hele kolven worden genomen (zie de laatste alinea van paragraaf 1.8.9.2). Bij gebruik van de eerstgenoemde werkwijze moeten zowel de snelheidsconstante en de halveringstijd voor iedere replicaat-kolf apart worden gerapporteerd als de gemiddelde waarden met standaardfout. Indien hoge teststofconcentraties zijn gebruikt kan het zijn dat de afbraakcurve aanzienlijk afwijkt van een rechte lijn (semilogaritmische grafiek) en dat eerste-ordekinetiek niet van toepassing is. Het vaststellen van een halveringstijd heeft dan ook geen betekenis. Voor een beperkt gegevensbereik kan echter pseudo-eerste-ordekinetiek worden toegepast, waarmee de Disappearance Time 50 (DT_{50}; de tijd die nodig is voor 50 % afbraak) kan worden geschat. Er moet evenwel rekening mee worden gehouden dat de DT_{50} slechts een beschrijving geeft van een bepaalde reeks gegevens en niet kan worden gebruikt voor het voorspellen van het afbraakverloop buiten dat gegevensbereik. Analysehulpmiddelen om de statistische berekeningen en het fitten van de curven te vergemakkelijken zijn algemeen beschikbaar en het gebruik van dergelijke programmatuur wordt aanbevolen.

▼M1

Als specifieke chemische analysen worden uitgevoerd moeten de snelheidsconstanten en halveringstijden voor de primaire afbraak op dezelfde wijze worden geschat als hierboven beschreven voor de totale mineralisatie. Indien de primaire afbraak het beperkende proces is, is het soms mogelijk meetpunten uit het gehele afbraakverloop te gebruiken, aangezien de metingen direct zijn, in tegenstelling tot de metingen van de ^{14}C-activiteit.

Bij gebruik van met ^{14}C gemerkte stoffen moet in ieder geval aan het einde van de test een massabalans worden opgesteld, uitgedrukt als percentage van de toegevoegde beginconcentratie.

2.1.2. **Restactiviteit**

Wanneer het met ^{14}C gemerkte gedeelte van een organische stof biologisch wordt afgebroken wordt het grootste deel van de ^{14}C omgezet in $^{14}CO_2$, terwijl een ander deel gebruikt wordt voor groei van de biomassa en/of synthese van extracellulaire metabolieten. Bij totale biologische afbraak van een stof wordt dus niet 100 % van de koolstof uit die stof omgezet in $^{14}CO_2$. De ^{14}C die in biosyntheseproducten wordt ingebouwd komt vervolgens langzaam vrij in de vorm van $^{14}CO_2$ als gevolg van „secundaire mineralisatie". Daardoor zullen grafieken van de resterende organische ^{14}C-activiteit (gemeten na het wegvangen van de CO_2) of de geproduceerde $^{14}CO_2$ tegen de tijd „tailing" vertonen na voltooiing van de afbraak. Dit bemoeilijkt de kinetische interpretatie van de gegevens en daarom kan normaal gesproken alleen het begindeel van de curve (na het einde van de aanlooptijd tot aan het bereiken van ongeveer 50 % afbraak) worden gebruikt voor het schatten van de afbraaksnelheidsconstante. Als de teststof is afgebroken is de totale resterende organische ^{14}C-activiteit altijd hoger dan de ^{14}C-activiteit van de overgebleven intacte teststof. Als de afbraak van de teststof volgens een eerste-ordereactie verloopt en een constante fractie α wordt gemineraliseerd tot CO_2, zal het begin van de helling van de ^{14}C-verdwijningscurve (de totale hoeveelheid ^{14}C tegen de tijd) een factor α maal de helling van de overeenkomstige curve voor de teststofconcentratie zijn (of, om precies te zijn, het met ^{14}C gemerkte gedeelte van de teststof). Wanneer de metingen van de totale organische ^{14}C-activiteit ongecorrigeerd worden gebruikt, zal de berekende afbraaksnelheidsconstante dan ook een voorzichtige schatting zijn. Procedures om de teststofconcentraties te schatten aan de hand van de gemeten radiochemische activiteiten op basis van uiteenlopende vereenvoudigende aannamen zijn beschreven in referenties (2), (9), (10) en (11). Dergelijke procedures zijn heel eenvoudig toe te passen voor gemakkelijk afbreekbare stoffen.

2.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Als de gevonden k onafhankelijk is van de toegevoegde concentratie (d.w.z. als de berekende k ongeveer gelijk is bij verschillende teststofconcentraties) mag worden aangenomen dat de eerste-orde snelheidsconstante representatief is voor de gebruikte testomstandigheden, te weten de teststof, het watermonster en de testtemperatuur. In hoeverre generalisatie of extrapolatie van de resultaten tot andere systemen geoorloofd is moet op basis van deskundigheid worden beoordeeld. Bij gebruik van een hoge teststofconcentratie, waardoor de afbraak niet volgens eerste-ordekinetiek verloopt, kunnen de gegevens niet worden gebruikt voor een rechtstreekse schatting van een eerste-orde snelheidsconstante of bijbehorende halveringstijd. De gegevens uit een test met een hoge teststofconcentratie kunnen echter nog altijd bruikbaar zijn voor het schatten van de totale mineralisatie en/of het aantonen en bepalen van omzettingsproducten.

▼M1

Indien de snelheden van andere verliesprocessen dan biologische afbraak (bv. hydrolyse of vervluchtiging) bekend zijn kunnen deze worden afgetrokken van de netto in de test waargenomen verliessnelheid voor een ruwe schatting van de biologische afbraaksnelheid. Gegevens over hydrolyse kunnen bijvoorbeeld worden verkregen uit de steriele controle of uit een parallelle test met hogere teststofconcentratie.

Indirecte of directe $^{14}CO_2$-bepaling (paragraaf 1.8.9.4 en aanhangsel 3) is alleen te gebruiken om te meten in welke mate de teststof wordt gemineraliseerd tot CO_2. Voor het analyseren van de concentraties van de met ^{14}C gemerkte teststof en de vorming van belangrijke omzettingsproducten kan radiochromatografie (RAD-TLC) of HPLC worden gebruikt (zie de derde alinea van paragraaf 1.8.9.4). Om een directe schatting van de halveringstijd mogelijk te maken mogen er geen belangrijke omzettingsproducten (gedefinieerd als ≥ 10 % van de toegevoegde hoeveelheid teststof) aanwezig zijn. Indien belangrijke omzettingsproducten volgens deze definitie aanwezig zijn is een gedetailleerde evaluatie van de gegevens vereist, in de vorm van bijvoorbeeld herhaalde uitvoering van de test en/of identificatie van de omzettingsproducten (zie de eerste alinea van paragraaf 1.8.9.5), tenzij de levensloop van de omzettingsproducten voldoende kan worden beoordeeld op basis van ervaring (bv. informatie over de afbraakroute). Als het aandeel van de teststof dat wordt omgezet in CO_2 varieert (met een grote afhankelijkheid van de concentratie van de teststof of andere beschikbare substraten, de testomstandigheden en de microbiële kolonie), is deze test niet geschikt voor een rechtstreekse schatting van de totale biologische afbraak, zoals in een DOC-afnametest; de uitkomst is echter van gelijke orde als van een respirometrische test. De mineralisatiegraad zal dus minder zijn dan of gelijk aan het minimale niveau van totale biologische afbraak. Voor een completer beeld van de totale biologische afbraak (mineralisatie en opname in biomassa) moet aan het einde van de test de faseverdeling van de ^{14}C worden geanalyseerd (zie aanhangsel 1). De ^{14}C in de deeltjesfase zal bestaan uit de ^{14}C die is opgenomen in de bacteriële biomassa en de ^{14}C die aan organische deeltjes is gesorbeerd.

2.3. VALIDITEIT VAN DE TEST

Indien de referentiestof niet binnen het verwachte tijdsinterval wordt afgebroken (voor aniline en natriumbenzoaat normaal gesproken binnen twee weken), moet de validiteit van de test worden betwijfeld en nader worden onderzocht, of anders moet de test worden herhaald met een nieuw watermonster. In een ISO ringtest van de methoden, waaraan zeven laboratoria op verschillende plaatsen in Europa hebben meegedaan, werden geadapteerde afbraaksnelheidsconstanten voor aniline gevonden van 0,3 tot 1,7 d^{-1} met een gemiddelde van 0,8 d^{-1} bij 20 °C en een standaardfout van ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dagen). De aanlooptijd was over het algemeen 1 tot 7 dagen. Van de onderzochte watermonsters werd een bacteriële biomassa gerapporteerd van 10^3-10^4 kolonievormende eenheden (kve) per ml. De afbraaksnelheden in voedselrijke Midden-Europese watermonsters waren groter dan in oligotrofe Noord-Europese watermonsters, hetgeen mogelijk toe te schrijven is aan het verschil in trofische status of voorgaande blootstelling aan chemicaliën.

De totale recovery (massabalans) aan het einde van het experiment moet voor radioactief gemerkte stoffen tussen 90 % en 110 % liggen, terwijl voor ongemerkte teststoffen de aanvankelijke recovery aan het begin van het experiment tussen 70 % en 110 % moet liggen. De aangegeven bereiken moeten evenwel worden opgevat als streefcijfers en moeten niet worden gebruikt als criteria voor de aanvaardbaarheid van de test.

▼M1

3. **TESTVERSLAG**

Het type onderzoek — pelagische of gesuspendeerd-sedimenttest — moet duidelijk worden aangegeven in het testverslag, waarin eveneens ten minste de volgende gegevens moeten worden opgenomen:

Teststof en referentiestoffen:

— triviale namen, chemische namen (IUPAC-namen en/of CAS-namen), CAS-nummers, structuurformules (waarin de plaats van de ^{14}C wordt aangegeven bij gebruik van een radioactief gemerkte stof) en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de teststof en de referentiestoffen (zie de paragrafen 1.5 en 1.6);

— chemische namen, CAS-nummers, structuurformules (waarin de plaats van de ^{14}C wordt aangegeven bij gebruik van een radioactief gemerkte stof) en relevante fysisch-chemische eigenschappen van stoffen die zijn gebruikt als standaarden voor het aantonen en bepalen van omzettingsproducten;

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof;

— de zuiverheid van het label van gemerkte chemicaliën en molaire activiteit (indien van toepassing).

Oppervlaktewater:

Van het watermonster moeten ten minste de volgende gegevens worden vermeld:

— de locatie en beschrijving van de monsternemingsplaats inclusief, indien mogelijk, vervuilingsgeschiedenis;

— de datum en de tijd waarop het monster is verzameld;

— het gehalte aan voedingsstoffen (totale N, ammonium, nitriet, nitraat, totale P, opgelost orthofosfaat);

— de monsternemingsdiepte;

— het uiterlijk van het watermonster (bv. kleur en troebelheid);

— DOC-gehalte en TOC-gehalte;

— het BZV;

— de temperatuur en de pH op de plaats en het tijdstip van de monsterneming;

— de zuurstofconcentratie of de redoxpotentiaal (alleen verplicht als aerobe omstandigheden niet vanzelfsprekend zijn);

— de saliniteit of de conductiviteit (in geval van zeewater of brak water);

— gesuspendeerde vaste stoffen (in geval van een troebel monster);

— eventueel overige relevante informatie over de monsternemingsplaats op het tijdstip van monsterneming (bv. actuele en historische gegevens over de stroomsnelheid van rivieren of zeestromingen, belangrijke lozingen in de nabijheid en het soort lozingen, weersomstandigheden voorafgaand aan de monsterneming);

en optioneel:

— microbiële biomassa (bv. directe telling met acridine oranje of kolonievormende eenheden);

▼M1

— anorganische koolstof;

— chlorofyl-a-gehalte als specifieke schatting voor de algenbiomassa.

Indien de gesuspendeerd-sedimenttest is uitgevoerd moeten bovendien de volgende gegevens over het sediment worden vermeld:

— de diepte waarop het sediment is verzameld;

— het uiterlijk van het sediment (zoals gekleurd, modderig, siltig of zandig);

— de textuur (bv. percentage grof zand, fijn zand, silt en klei);

— het drooggewicht in g/l van de gesuspendeerde vaste stoffen, TOC-concentratie of gloeiverlies als maat voor het gehalte aan organisch materiaal;

— de pH;

— de zuurstofconcentratie of de redoxpotentiaal (alleen verplicht als aerobe omstandigheden niet vanzelfsprekend zijn).

Testomstandigheden:

— de tijdsduur tussen monsterneming en het gebruik van het monster in de laboratoriumtest, wijzen van bewaren van het monster, voorbewerking van het monster, uitvoeringsdata van de studies;

— de hoeveelheid toegevoegde teststof, testconcentratie en referentiestof;

— de methode van toevoegen van de teststof en eventueel gebruik van oplosmiddelen;

— het gebruikte volume oppervlaktewater en sediment (indien gebruikt) en het volume dat bij elk interval werd onttrokken voor analyse;

— een beschrijving van het gebruikte testsysteem.

Indien niet in het donker is gewerkt: gegevens over de omstandigheden van het „diffuse licht”;

— gegevens over de gebruikte methode(n) voor het opzetten van de steriele controles (bv. de temperatuur, de tijd en het aantal autoclaveringen);

— de incubatietemperatuur;

— gegevens over de analysetechnieken en de gebruikte methode(n) voor de radiochemische metingen, de massabalanscontrole en de metingen van de faseverdeling (indien uitgevoerd).

— het aantal replicatie-bepalingen.

Resultaten:

— de recovery (zie paragraaf 1.7.1);

— de herhaalbaarheid en de gevoeligheid van de gebruikte analysemethoden, inclusief de detectiegrens en de bepaalbaarheidsgrens (zie paragraaf 1.7.2);

▼M1

— alle onbewerkte gegevens (inclusief monsternemingstijdstippen) en berekende waarden in tabelvorm, en de afbraakcurven; vermeld voor elke testconcentratie en voor elke replicaat-kolf de lineaire correlatiecoëfficiënt voor de helling van de logaritmische grafiek en een eerste-orde of pseudo-eerste-orde snelheidsconstante (indien mogelijk), en de bijbehorende halveringstijd (of de halfwaardetijd, t_{50});

— vermeld relevante waarden als gemiddelden van de waarnemingen in de individuele replicatie-bepalingen, bv. de lengte van de aanlooptijd, de afbraaksnelheidsconstante en de bijbehorende halveringstijd (of t_{50});

— kenmerk het systeem als geadapteerd of niet-geadapteerd op grond van het uiterlijk van de afbraakcurve en de mogelijke invloed van de testconcentratie;

— de resultaten van de eindcontrole van de massabalans en de resultaten van faseverdelingsmetingen (indien uitgevoerd);

— de fractie gemineraliseerde ^{14}C en, bij gebruik van specifieke analysen, de totale primaire afbraak;

— de identificatie, de molaire concentratie en het percentage van de onderzochte en belangrijke omzettingsproducten (zie eerste alinea van paragraaf 1.8.9.5), indien van toepassing;

— een voorgestelde omzettingsroute, indien van toepassing;

— een bespreking van de resultaten.

4. **LITERATUUR**

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. Testmethode C.23. Aerobe en anaerobe omzetting in aquatische sedimentsystemen.

4. Testmethode C.24. Aerobe en anaerobe omzetting in de bodem.

5. OESO (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. OESO ontwerp (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**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

Aanhangsel 1

Faseverdeling van ^{14}C

Ter controle van de procedure dienen de routinemetingen van de resterende organische ^{14}C-activiteit (TOA) worden aangevuld met massabalansmetingen door middel van een directe bepaling van de $^{14}CO_2$-ontwikkeling na opvanging van het CO_2 met een adsorbens (zie aanhangsel 3). Een positieve $^{14}CO_2$-vorming is op zichzelf direct bewijs voor biologische afbraak, daar deze niet optreedt bij niet-biologische afbraak of andere verliesmechanismen, zoals vervluchtiging en sorptie. Door meting van de verdeling van de TOA tussen de opgeloste fase (de opgeloste organische ^{14}C-activiteit, DOA) en de deeltjesfase (deeltjesvormige organische ^{14}C-activiteit, POA), na scheiding van de deeltjes door middel van membraanfiltratie of centrifugatie, kan aanvullende informatie worden verkregen om het biologische afbraakgedrag verder te karakteriseren. De POA bestaat uit teststof die is gesorbeerd door de microbiële biomassa en aan andere deeltjes, naast de van teststof afkomstige koolstof die is gebruikt voor de synthese van nieuw celmateriaal en op die manier is opgenomen in de deeltjesvormige biomassafractie. De vorming van opgelost met ^{14}C gemerkt organisch materiaal kan worden geschat als de DOA aan het einde van het biologische afbraakproces (wanneer de curve van de afbraak tegen de tijd een plateau vertoont).

Schat de faseverdeling van de resterende ^{14}C in geselecteerde monsters door deze te filteren met een 0,22 μm of 0,45 μm membraanfilter van een materiaal waaraan geen significante adsorptie van teststof optreedt (te denken valt aan polycarbonaatfilters). Als de sorptie van de teststof aan het filter te groot is om te verwaarlozen (hetgeen voorafgaand aan het experiment dient te worden gecontroleerd) kan in plaats van filtratie centrifugatie bij hoge snelheid (2 000 g; 10 min.) worden gebruikt.

Met het filtraat of centrifugaat kan worden verdergegaan met de in aanhangsel 3 beschreven procedure voor ongefilterde monsters. Los de membraanfilters op in een geschikte scintillatievloeistof en voer een telling uit volgens de gebruikelijke procedure, normaal gesproken met alleen dovingscorrectie aan de hand van de externe-standaard-kanaal-verhouding, of gebruik een oxidiser. Bij gebruik van centrifugatie: resuspendeer de pellet van de deeltjesfractie in 1-2 ml gedistilleerd water en breng dit over in een scintillatieflesje. Was vervolgens tweemaal met 1 ml gedistilleerd water en breng dit over in het scintillatieflesje. Indien nodig kan de suspensie voor de vloeistofscintillatietelling in een gel worden opgenomen.

▼M1

Aanhangsel 2

Semicontinue procedure

Voor voldoende afbraak van persistente stoffen kan langdurige incubatie nodig zijn, tot meerdere maanden. Normaal gesproken moet de test niet langer duren dan 60 dagen, tenzij de eigenschappen van het oorspronkelijke watermonster worden bewaard door de testsuspensie te verversen. De testduur kan evenwel worden verlengd tot maximaal 90 dagen zonder verversing van de testsuspensie, indien de afbraak van de teststof binnen de eerste 60 dagen is begonnen.

Gedurende langdurige incubatie kan de diversiteit van de microbiële kolonie afnemen als gevolg van uiteenlopende verliesprocessen en als gevolg van de mogelijke depletie van het watermonster van essentiële voedingsstoffen en primaire koolstofsubstraten. Voor een adequate bepaling van de afbraaksnelheid van stoffen die langzaam worden afgebroken wordt dan ook aanbevolen een semicontinue test te gebruiken. De test moet volgens een semicontinue procedure worden gestart als op basis van eerdere ervaring wordt verwacht dat een incubatietijd van drie maanden nodig is om 20 % afbraak van de teststof te bereiken. Ook kan de normale ladingsgewijze test worden omgezet in een semicontinue test als gedurende ca. 60 testdagen volgens de ladingsgewijze procedure nog geen afbraak van de teststof is bereikt. Wanneer een aanzienlijke mate van afbraak is vastgesteld (bv. > 20 %) kan de semicontinue procedure worden gestopt en kan de test worden voortgezet als ladingsgewijs experiment.

In de semicontinue test wordt om de week ongeveer een derde van het volume van de testsuspensie vervangen door vers verzameld water met toegevoegde teststof in de beginconcentratie. Evenzo wordt sediment in de beginconcentratie (tussen 0,01 and 1 g/l) aan het vervangende water toegevoegd in geval van de optionele gesuspendeerd-sedimenttest. Indien de test wordt uitgevoerd met gesuspendeerd vast sediment is het van belang dat het systeem ook gedurende de verversing van het water volledig in suspensie blijft, en dat de verblijftijd voor vaste stoffen en water gelijk is. Zo niet, dan kan de beoogde overeenkomstigheid met een homogeen aquatisch systeem zonder vastliggende fasen verloren gaan. Daarom verdient het bij gebruik van de semicontinue procedure de voorkeur dat een beginconcentratie van gesuspendeerd sediment wordt gekozen in het lagere bereik van het opgegeven interval.

De voorgeschreven toevoeging van de teststof betekent dat door de gedeeltelijke verversing van de testsuspensie de beginconcentratie van de teststof niet wordt overschreden en dat de adaptatie die dikwijls wordt waargenomen bij hoge teststofconcentraties wordt vermeden. Doordat de procedure zowel zorgt voor hernieuwde enting als voor compensatie voor de depletie van voedingsstoffen en primaire substraten, wordt de oorspronkelijke microbiële diversiteit hersteld en kan de testduur in principe tot in het oneindige worden verlengd. Bij gebruik van de semicontinue procedure is het van belang op te merken dat de overgebleven teststofconcentratie moet worden gecorrigeerd voor de bij iedere verversingsprocedure toegevoegde en afgenomen hoeveelheden teststof. Voor verbindingen met weinig sorptie kunnen de totale en de opgeloste teststofconcentratie door elkaar worden gebruikt. Onder de omschreven omstandigheden (0,1-1 g vaste stof/l) is de sorptie te verwaarlozen (< 5 %) voor stoffen met een log Kow < 3 (geldig voor neutrale, lipofiele verbindingen). Dit wordt aanschouwelijk gemaakt in het volgende rekenvoorbeeld. Een vastestofgehalte van 0,1 g/l komt grofweg overeen met 10 mg koolstof per liter (koolstoffractie, f_C = 0,01). Aannemende dat:

log K_{ow} (van de teststof) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Verdelingscoëfficiënt, $K_d = f_C \times K_{oc}$

dan is opgeloste fractie van de totale concentratie (C-water (C_w)/C-totaal (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

Aanhangsel 3

Bepaling van $^{14}CO_2$

Indirecte $^{14}CO_2$-bepaling

Voor routinemetingen is de indirecte methode normaal gesproken de minst tijdrovende en meest nauwkeurige methode, als de teststof niet vluchtig is en niet wordt omgezet in vluchtige omzettingsproducten. Breng ongefilterde monsters van bv. 5 ml over in scintillatieflesjes. Een geschikte beginactiviteit in de monsters is 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq) en de minimale beginactiviteit is zo'n 1 000 dpm. De CO_2 moet worden verwijderd na aanzuring tot pH 2-3 met 1-2 druppels geconcentreerd H_3PO_4 of HCl, door gedurende ½-1 uur lucht door te leiden, dan wel door de kolven gedurende 1-2 uur heftig te schudden (bv. op een microtiterplaatschudder) of een nacht lang zachter te schudden. De efficiëntie van de CO_2-verwijderingsprocedure moet worden gecontroleerd (door het doorleiden van lucht of het schudden te verlengen). Voeg vervolgens een geschikte scintillatievloeistof voor het tellen van waterige monsters toe, homogeniseer het monster met een rotatiemixer en bepaal de radioactiviteit aan de hand van vloeistofscintillatietelling, met aftrekking van de achtergrondactiviteit in de blancokolven (F_B). Tenzij het testwater sterk gekleurd is of een hoge concentratie deeltjes bevat, zal de doving van de monsters normaal gesproken gelijk zijn en is dovingscorrectie met behulp van een externe standaard voldoende. Bij sterk gekleurd testwater kan dovingscorrectie door toevoeging van een interne standaard nodig zijn. Als de deeltjesconcentratie hoog is, kan het zijn dat het niet mogelijk is een homogene oplossing of gel te verkrijgen, of dat de doving te zeer varieert. In dat geval kan de hieronder beschreven telmethode voor testsuspensies worden gebruikt. Als de test wordt uitgevoerd als gesuspendeerd-sedimenttest zou de $^{14}CO_2$-meting indirect kunnen worden uitgevoerd door een homogeen monster van 10 ml te nemen van het testwater/de testsuspensie en de fasen te scheiden door centrifugatie bij een geschikte snelheid (bv. bij 40 000 m/s^2 gedurende 15 min). De waterige fase dient dan te worden behandeld als hierboven beschreven. De ^{14}C-activiteit in de deeltjesfase (POA) moet worden bepaald door het sediment te resuspenderen in een klein volume gedistilleerd water, dit over te brengen in scintillatieflesjes, en scintillatievloeistof toe te voegen om een gel te vormen (voor dit doel zijn speciale scintillatievloeistoffen verkrijgbaar). Afhankelijk van de aard van de deeltjes (bv. het gehalte aan organisch materiaal) kan het mogelijk zijn het monster gedurende de nacht te solubiliseren en vervolgens te homogeniseren met een rotatiemixer alvorens de scintillatievloeistof toe te voegen. De POA kan ook worden bepaald door bij overmaat zuurstof te verbranden met behulp van een oxidiser. Bij het tellen moeten altijd interne standaarden worden doorgemeten en kan het nodig zijn dovingscorrecties uit te voeren door de interne standaard aan ieder afzonderlijk monster toe te voegen.

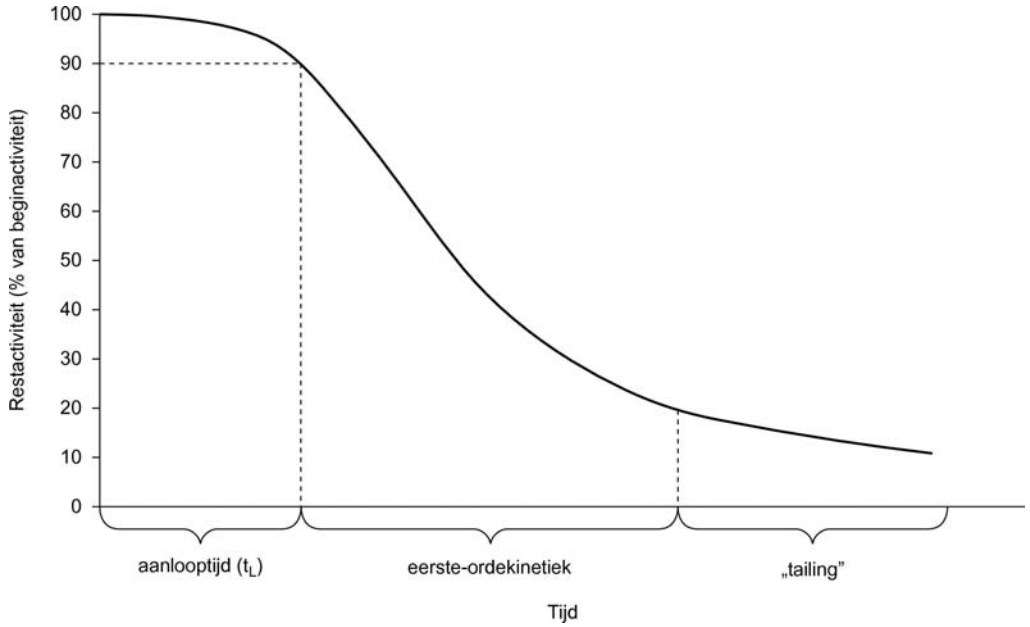
Directe $^{14}CO_2$-bepaling

Bij directe $^{14}CO_2$-meting moeten aan het begin van de test meer kolven worden klaargemaakt. Bij ieder meetpunt moeten testkolven worden aangezuurd tot pH 2-3 en moet de $^{14}CO_2$ worden opgevangen in een intern (aangebracht in elke testkolf aan het begin van de test) of extern absorbens. Als adsorptiemedium kunnen alkali (bv. een 1 M NaOH-oplossing, of een NaOH-pil), ethanolamine dan wel afgeleiden van ethanolamine, of in de handel verkrijgbare adsorptiesystemen worden gebruikt. Voor de directe meting van het $^{14}CO_2$, moeten de kolven worden afgesloten, bv. met een butylrubberen septum.

▼**M1**

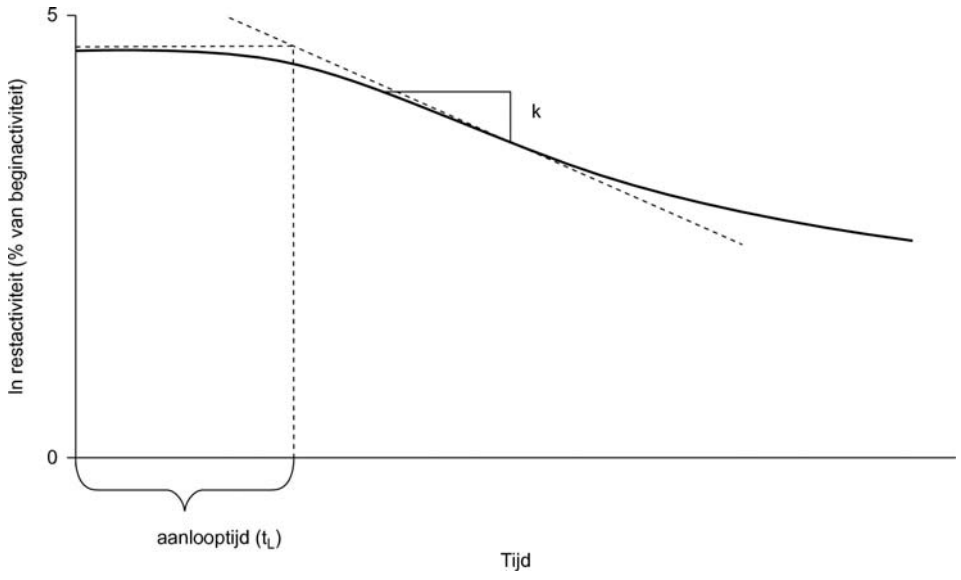
Figuur 1a

Voorbeeld van een metrische gegevensgrafiek (de restactiviteit tegen de tijd)



Figuur 1b

Voorbeeld van een logaritmische gegevensgrafiek (de ln van de restactiviteit tegen de tijd).



▼M6

C.26. LEMNA-SOORTEN: GROEIREMMINGSTEST

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 221 (2006) van de OESO. Ze is bedoeld om de toxiciteit van stoffen te bepalen voor zoetwaterplanten van het geslacht Lemna (eendenkroos). Deze testmethode is gebaseerd op bestaande methoden (1) (2) (3) (4) (5) (6), maar met een aantal wijzigingen naar aanleiding van recent onderzoek en adviezen over een aantal belangrijke aspecten. Deze testmethode is gevalideerd door middel van een internationaal ringonderzoek (7).

2. In deze testmethode worden toxiciteitstests beschreven met *Lemna gibba* en *Lemna minor*, die beide uitgebreid zijn bestudeerd en waarvoor bovengenoemde normen zijn verschenen. De taxonomie van *Lemna* spp. is lastig en wordt gecompliceerd doordat er een breed scala van fenotypen bestaat. Hoewel er bij *Lemna* sprake kan zijn van genetische variabiliteit bij de respons op toxische stoffen, zijn er momenteel onvoldoende gegevens over deze bron van variabiliteit om het gebruik van een specifieke kloon voor deze testmethode aan te kunnen bevelen. De test wordt niet axenisch wordt uitgevoerd, maar in bepaalde fasen van de testprocedure worden maatregelen genomen om besmetting door andere organismen tot een minimum te beperken.

3. Tests met verversing (semistatisch en doorstroom) en zonder verversing (statisch) van de testoplossing worden in detail beschreven. Afhankelijk van de doelstellingen van de test en de voorschriften in de regelgeving wordt aanbevolen het gebruik van semistatische en doorstroommethoden te overwegen, bijvoorbeeld voor stoffen die ten gevolge van verdamping, afbraak onder invloed van licht, neerslaan of biologische afbraak snel uit de oplossing verdwijnen. Zie (8) voor een nadere leidraad.

4. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

5. Men laat exponentieel groeiende plantenculturen van het geslacht *Lemna* gedurende zeven dagen als monocultuur groeien in aanwezigheid van verschillende concentraties van de teststof. Het doel van de test is om op basis van bepalingen van gekozen meetvariabelen de effecten van de chemische stof op de vegetatieve groei gedurende deze periode kwantitatief te bepalen. De primaire meetvariabele is het aantal schijfjes. Daarnaast wordt ten minste één andere meetvariabele gemeten (totaaloppervlak van de schijfjes, drooggewicht of versgewicht), omdat sommige chemische stoffen mogelijk een veel grotere invloed hebben op andere meetvariabelen dan het aantal schijfjes. Om de effecten van de stof te kwantificeren, wordt de groei in de testoplossingen vergeleken met de groei van de controles en wordt de concentratie bepaald die een specifiek percentage remming van de groeisnelheid (bv. 50 %) veroorzaakt; deze wordt uitgedrukt als de EC_x (bv. EC_{50}).

6. Het eindpunt van de test is groeiremming, uitgedrukt als de logaritmische toename van de meetvariabele (gemiddelde specifieke groeisnelheid) gedurende de blootstellingsperiode. Op basis van de gemiddelde specifieke groeisnelheden die in een reeks testoplossingen worden geregistreerd, wordt de concentratie bepaald die een specifiek percentage remming van de groeisnelheid ('growth rate') (bv. 50 %) veroorzaakt; deze wordt uitgedrukt als de E_rC_x (bv. E_rC_{50}).

7. Bij deze testmethode wordt ook de opbrengst ('yield') als responsvariabele gebruikt; deze kan in bepaalde landen nodig zijn om aan specifieke voorschriften in de regelgeving te voldoen. De opbrengst wordt gedefinieerd als de biomassa aan het eind van de blootstellingsperiode verminderd met de biomassa aan het begin van de blootstellingsperiode. Op basis van de opbrengst die in een reeks testoplossingen wordt geregistreerd, wordt de concentratie berekend die een specifiek percentage verlaging van de opbrengst ('yield') (bv. 50 %) veroorzaakt; deze wordt uitgedrukt als de E_yC_x (bv. E_yC_{50}).

▼M6

8. Daarnaast kunnen langs statistische weg de laagste concentratie met waargenomen effect (LOEC) en de concentratie zonder waargenomen effect (NOEC) worden bepaald.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

9. Er moet een analysemethode beschikbaar zijn met een afdoende gevoeligheid voor kwantitatieve bepaling van de stof in het testmedium.

10. Gegevens over de teststof die nuttig kunnen zijn om de testomstandigheden vast te stellen, zijn bijvoorbeeld de structuurformule, zuiverheid, oplosbaarheid in water, stabiliteit in water en licht, pK_a, K_{ow}, dampspanning en biologische afbreekbaarheid. De oplosbaarheid in water en de dampspanning kunnen gebruikt worden om de constante van de Wet van Henry te berekenen die aangeeft of tijdens de testperiode significante verliezen van de teststof te verwachten zijn. Mede op grond hiervan kan worden bepaald of er specifieke maatregelen moeten worden genomen om dergelijke verliezen te beperken. Wanneer de informatie over de oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof onzeker is, wordt aanbevolen deze eigenschappen te bepalen onder de omstandigheden van de test, d.w.z. in het groeimedium, bij de temperatuur en met het lichtregime zoals die in de test worden gebruikt.

11. Wanneer regulering van de pH van het testmedium van bijzonder belang is, bijvoorbeeld bij het testen van metalen of stoffen die instabiel voor hydrolyse zijn, wordt aanbevolen een buffer aan het groeimedium toe te voegen (zie punt 21). Nadere richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat ze moeilijk te testen zijn, worden gegeven in (8).

GELDIGHEID VAN DE TEST

12. Voor een geldige test moet de verdubbelingstijd van het aantal schijfjes in de controlegroep minder dan 2,5 dagen (60 uur) zijn, hetgeen overeenkomt met een ongeveer zevenvoudige toename in zeven dagen en een gemiddelde specifieke groeisnelheid van 0,275 d^{-1}. Bij gebruik van de in deze testmethode beschreven media en testomstandigheden kan met een statische testopzet aan dit criterium worden voldaan (5). Ook bij een semistatische en een doorstroomtest zal naar verwachting aan dit criterium kunnen worden voldaan. In punt 49 wordt de berekening van de verdubbelingstijd beschreven.

REFERENTIESTOF

13. Om de testprocedure te controleren kunnen een of meer referentiestoffen worden getest, zoals 3,5-dichloorfenol dat in het internationale ringonderzoek is gebruikt (7). Het is raadzaam om een referentiestof ten minste twee keer per jaar of, wanneer de test minder frequent wordt uitgevoerd, tegelijk met de bepaling van de toxiciteit van een teststof te testen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

14. Alle apparatuur die in aanraking komt met de testmedia moet van glas of een ander chemisch inert materiaal zijn. Glaswerk dat voor het kweken en de test wordt gebruikt, moet worden ontdaan van chemische verontreinigingen die in het medium terecht kunnen komen, en moet steriel zijn. De testvaten moeten zo breed zijn dat de schijfjes van de verschillende kolonies in de controlevaten kunnen groeien zonder dat ze elkaar aan het eind van de test overlappen. De wortels mogen de bodem van de testvaten raken, maar een minimale diepte van 20 mm en een minimaal volume van 100 ml in elk testvat wordt aanbevolen. De keuze van de testvaten is geen kritische factor zolang aan deze eisen wordt voldaan. Van zowel bekerglazen (van glas) als kristalliseerschalen of glazen petrischalen met geschikte afmetingen is gebleken dat ze geschikt zijn. De testvaten moeten worden afgedekt om verdamping en onopzettelijke verontreiniging tot een minimum te beperken, waarbij

▼M6

echter wel de nodige uitwisseling van lucht mogelijk moet zijn. Bij het kiezen van geschikte testvaten en met name deksels moet erop worden gelet dat ze geen schaduwwerking of veranderingen in de spectrale kenmerken van licht veroorzaken.

15. De culturen en de testvaten mogen niet samen worden bewaard. Hiervoor kan het best worden gezorgd door aparte klimaatkasten, incubators of klimaatkamers te gebruiken. De verlichting en de temperatuur moeten regelbaar zijn en constant worden gehouden (zie punten 35-36).

Testorganismen

16. Het organisme dat voor deze test wordt gebruikt is *Lemna gibba* of *Lemna minor*. Aanhangsel 2 bevat korte beschrijvingen van eendenkroossoorten die voor toxiciteitstests zijn gebruikt. Het plantenmateriaal kan van een cultuurcollectie of een ander laboratorium worden betrokken of uit het veld worden gehaald. Als de planten uit het veld worden gehaald, moeten ze ten minste gedurende acht weken vóór gebruik in hetzelfde medium in cultuur worden gehouden als voor de test wordt gebruikt. Op de plaatsen die voor het verzamelen van de beginculturen worden gebruikt, mogen er geen zichtbare bronnen van verontreiniging zijn. Als ze van een ander laboratorium of van een cultuurcollectie worden betrokken, moeten ze op dezelfde manier gedurende minimaal drie weken in cultuur worden gehouden. De herkomst van het plantenmateriaal en de voor de test gebruikte soort en kloon (indien bekend) moeten altijd worden gerapporteerd.

17. Er dienen monoculturen te worden gebruikt die zichtbaar vrij zijn van verontreiniging door andere organismen zoals algen en protozoën. Gezonde planten van *L. minor* bestaan uit kolonies van twee tot vijf schijfjes, terwijl gezonde kolonies van *L. gibba* maximaal zeven schijfjes kunnen bevatten.

18. De kwaliteit en uniformiteit van de voor de test gebruikte planten hebben een substantiële invloed op de resultaten van de test, en daarom moeten de planten met zorg worden gekozen. Er moeten jonge, snel groeiende planten worden gebruikt zonder zichtbare beschadigingen en zonder verkleuring (chlorose). Wanneer een cultuur veel kolonies van ten minste twee schijfjes bevat, wijst dit op een goede kwaliteit. Een groot aantal losse schijfjes wijst op milieustress, bv. een nutriënt als beperkende factor, en plantenmateriaal van dergelijke culturen mag niet voor de test worden gebruikt.

Kweek

19. Om de onderhoudfrequentie van culturen te beperken (bv. wanneer er gedurende enige tijd geen Lemna-tests gepland zijn), kunnen de culturen onder beperkte verlichting en bij verlaagde temperatuur (4-10 °C) worden bewaard. Nadere informatie over het kweken is te vinden in aanhangsel 3. Wanneer er duidelijke tekenen van verontreiniging door algen of andere organismen zijn, moet er bij een submonster van *Lemna*-schijfjes oppervlaktesterilisatie worden uitgevoerd, waarna het naar vers medium wordt overgezet (zie aanhangsel 3). In dat geval moet de resterende verontreinigde cultuur worden afgekeurd.

20. Ten minste zeven dagen vóór de test worden voldoende kolonies aseptisch overgezet naar vers steriel medium en gedurende 7-10 dagen onder de testomstandigheden gekweekt.

Testmedium

21. Voor *Lemna minor* en *Lemna gibba* worden verschillende groeimedia aanbevolen, die hieronder worden beschreven. Er moet zorgvuldig worden overwogen of er een pH-buffer in het testmedium moet worden opgenomen (MOPS (4-morfolinepropaansulfonzuur, CAS-nr. 1132-61-2) in *L. minor*-medium en $NaHCO_3$ in *L. gibba*-medium) wanneer het vermoeden bestaat dat deze met de teststof kan reageren en de toxische effecten kan beïnvloeden. Steinberg-medium (9) is ook aanvaardbaar zo lang aan de geldigheidscriteria wordt voldaan.

▼M6

22. Voor het kweken van en testen met L. minor wordt een gewijzigde versie van het Lemna-groeimedium van het Zweedse instituut voor normalisatie (SIS) aanbevolen. De samenstelling van deze media wordt in aanhangsel 4 beschreven.

23. Het in aanhangsel 4 beschreven groeimedium 20X-AAP wordt aanbevolen voor het kweken van en testen met *L. gibba*.

24. Het eveneens in aanhangsel 4 beschreven Steinberg-medium is juist geschikt voor *L. minor*, maar kan ook voor *L. gibba* worden gebruikt zo lang aan de geldigheidscriteria wordt voldaan.

Testoplossingen

25. De testoplossingen worden meestal bereid door verdunning van een stamoplossing. Stamoplossingen van de teststof worden doorgaans bereid door de stof op te lossen in groeimedium.

26. De hoogste geteste concentratie van de teststof mag normaal gesproken niet hoger zijn dan de wateroplosbaarheid van de stof onder de testomstandigheden. Er moet echter worden opgemerkt dat *Lemna* spp. op het oppervlak drijft en kan worden blootgesteld aan stoffen die zich aan het grensvlak tussen water en lucht ophopen (bijvoorbeeld stoffen die slecht oplosbaar zijn in water, hydrofobe stoffen of oppervlakteactieve stoffen). Onder dergelijke omstandigheden is er sprake van blootstelling aan materiaal dat niet in oplossing is en mogen de testconcentraties, afhankelijk van de eigenschappen van de teststof, de wateroplosbaarheid overschrijden. Voor slecht in water oplosbare teststoffen kan het nodig zijn om met een organisch oplosmiddel of dispergeermiddel een geconcentreerde stamoplossing of dispersie van de stof te maken, om nauwkeurige hoeveelheden teststof aan het testmedium te kunnen toevoegen en het dispergeren en oplossen ervan te bevorderen. Al het mogelijke moet worden gedaan om gebruik van dergelijke materialen te vermijden. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen als hulpstof mag niet tot fytotoxiciteit leiden. Vaak gebruikte oplosmiddelen die bij concentraties tot 100 µl/l geen fytotoxiciteit veroorzaken zijn bijvoorbeeld aceton en dimethylformamide. Wanneer een oplosmiddel of dispergeermiddel wordt gebruikt, moet de eindconcentratie worden gerapporteerd en tot een minimum worden beperkt (≤ 100 µl/l) en moeten alle test- en controleoplossingen dezelfde concentratie oplosmiddel of dispergeermiddel bevatten. Zie (8) voor nadere richtsnoeren over het gebruik van dispergeermiddelen.

Test- en controlegroepen

27. Wanneer er vooraf iets bekend is over de toxiciteit van de teststof voor *Lemna*, bijvoorbeeld uit een oriënterende test, kan dit nuttig zijn bij het kiezen van geschikte testconcentraties. Bij de definitieve toxiciteitstest moeten normaal gesproken ten minste vijf testconcentraties worden gebruikt die een meetkundige reeks vormen. De rede van de reeks mag bij voorkeur niet hoger zijn dan 3,2 maar bij een vlakke concentratie/responscurve mag een hogere waarde worden gebruikt. Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet een motivering worden gegeven. Voor elke testconcentratie moeten ten minste drie replicaten worden gebruikt.

28. Bij het kiezen van de testconcentraties (voor een bereikbepalingstest en/of de definitieve toxiciteitstest) moeten de volgende punten in aanmerking worden genomen:

— Als een EC_x wordt bepaald, moet de EC_x-waarde binnen het bereik van de testconcentraties vallen om een adequaat betrouwbaarheidsniveau te waarborgen. Als bijvoorbeeld de EC_{50} wordt bepaald, moet de hoogste testconcentratie hoger dan de EC_{50} zijn. Als de EC_{50} buiten het bereik van de testconcentraties ligt, zullen de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen groot zijn en zal een correcte bepaling van de statistische fit van het model wellicht niet mogelijk zijn.

— Als het de bedoeling is de LOEC/NOEC te schatten, moet de laagste testconcentratie zodanig laag zijn dat de groei niet significant lager is dan in de controle. Bovendien moet de hoogste testconcentratie dan zodanig

▼M6

hoog zijn dat de groei significant lager is dan in de controle. Als dit niet het geval is, moet de test met een ander concentratiebereik worden herhaald (tenzij de hoogste concentratie samenvalt met de oplosbaarheidsgrens of de hoogste grensconcentratie die vereist is, bv. 100 mg·/l).

29. In elke test moeten controles worden opgenomen waarbij het voedingsmedium, het aantal schijfjes en kolonies, de milieuomstandigheden en de procedures identiek zijn aan die van de testvaten, maar zonder de teststof. Als er een oplosmiddel of dispergeermiddel als hulpstof wordt gebruikt, moet een extra controle worden opgenomen die dezelfde concentratie oplosmiddel/dispergeermiddel bevat als de vaten met de teststof. Het aantal replicaatcontrolevaten (en -oplosmiddelvaten, indien van toepassing) moet ten minste gelijk zijn aan en liefst twee keer zo groot zijn als het aantal vaten dat voor elke testconcentratie wordt gebruikt.

30. Als bepaling van de NOEC niet nodig is, mag het aantal concentraties worden vergroot en het aantal replicaten per concentratie worden verminderd. Er moeten echter minimaal drie controlereplicaten worden gebruikt.

Blootstelling

31. Kolonies bestaande uit 2 tot 4 zichtbare schijfjes worden vanuit de entcultuur onder aseptische omstandigheden op aselecte wijze overgezet naar de testvaten. Elk testvat moet in totaal 9 tot 12 schijfjes bevatten. Het aantal schijfjes en kolonies moet in elk testvat hetzelfde zijn. Uit de met deze methode opgedane ervaring en de gegevens van het ringonderzoek is gebleken dat drie replicaten per dosisgroep, waarbij elk replicaat aanvankelijk 9 tot 12 schijfjes bevat, voldoende is om verschillen in groei tussen de dosisgroepen te detecteren van ongeveer 4 % tot 7 % remming (berekend op basis van groeisnelheid) of 10 % tot 15 % remming (berekend op basis van opbrengst) (7).

32. Wat de locatie van de testvaten in de incubator betreft, moet een aselecte opzet worden gehanteerd om de invloed van plaatselijke verschillen in lichtintensiteit of temperatuur zo veel mogelijk te beperken. Een blokopzet of aselecte verplaatsing van de vaten bij het doen van observaties (of frequenter verplaatsen) is ook vereist.

33. Als uit een oriënterende stabiliteitstest is gebleken dat de concentratie van de teststof in de loop van de test (7 dagen) niet op peil blijft (d.w.z. dat de gemeten concentratie lager wordt dan 80 % van de gemeten beginconcentratie), wordt een semistatische testopzet aanbevolen. In dit geval moeten de kolonies ten minste twee keer in de loop van de test (bijvoorbeeld op dag 3 en op dag 5) aan vers bereide test- en controleoplossingen worden blootgesteld. De frequentie van blootstelling aan vers medium is afhankelijk van de stabiliteit van de teststof; bij zeer instabiele of vluchtige stoffen kan een hogere frequentie nodig zijn om de concentratie nagenoeg constant te houden. In sommige gevallen kan een doorstroomprocedure nodig zijn (8) (10).

34. Blootstelling door aanbrengen op het blad (spuiten) komt in deze testmethode niet aan de orde; zie hiervoor (11).

Incubatieomstandigheden

35. Er moet continue warm witte of koud witte fluorescerende belichting worden gebruikt om te zorgen voor een lichtintensiteit binnen het bereik 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, gemeten binnen het voor fotosynthese effectieve golflengtebereik (400-700 nm) op punten op dezelfde afstand van de lichtbron als de *Lemna*-schijfjes (dit komt overeen met 6 500-10 000 lux). De lichtintensiteit in het testgebied mag niet meer dan ± 15 % afwijken van de gekozen lichtintensiteit. De methode waarmee het licht wordt gedetecteerd en gemeten, met name het type sensor, zal de meetwaarde beïnvloeden. De voorkeur wordt gegeven aan sferische sensoren (die reageren op licht uit alle hoeken boven

▼M6

en onder het meetvlak) en „cosinus”-sensoren (die reageren op licht uit alle hoeken boven het meetvlak) in plaats van unidirectionele sensoren, aangezien deze een hogere uitslag geven voor een meerpuntslichtbron van het hier beschreven type.

36. De temperatuur in de testvaten moet 24 ± 2 °C zijn. De pH van het controlemedium mag gedurende de test niet meer dan 1,5 eenheden stijgen. Een afwijking van meer dan 1,5 eenheden maakt de test echter niet ongeldig wanneer kan worden aangetoond dat aan de geldigheidscriteria wordt voldaan. In speciale gevallen, bijvoorbeeld wanneer instabiele stoffen of metalen worden getest, moet extra aandacht aan pH-verschuiving worden besteed. Zie (8) voor nadere richtsnoeren.

Duur

37. De test wordt beëindigd 7 dagen na het overzetten van de planten naar de testvaten.

Metingen en analyses

38. Aan het begin van de test wordt het aantal schijfjes in de testvaten geteld en geregistreerd, waarbij ervoor moet worden gezorgd dat overlappende maar apart zichtbare schijfjes worden meegeteld. Het aantal schijfjes (normaal of abnormaal) moet aan het begin van de test, ten minste één keer per drie dagen gedurende de blootstellingsperiode (d.w.z. ten minste twee keer gedurende de periode van 7 dagen) en aan het eind van de test worden bepaald. Veranderingen in de ontwikkeling van de plant (bv. qua grootte van de schijfjes, uiterlijk, verschijnselen van necrose, chlorose of gebocheldheid, uit elkaar vallen of verlies van drijfvermogen van kolonies, lengte en uiterlijk van de wortels) moeten geregistreerd worden. Ook significante kenmerken van het testmedium (bijvoorbeeld aanwezigheid van onopgelost materiaal of algengroei in het testvat) moeten worden geregistreerd.

39. Naast bepalingen van het aantal schijfjes gedurende de test, moeten ook de effecten van de teststof op een (of meer) van de volgende meetvariabelen worden bepaald:

(i) totaaloppervlak van de schijfjes,

(ii) drooggewicht,

(iii) versgewicht.

40. Het voordeel van het totaaloppervlak van de schijfjes is dat het voor elk testvat en controlevat aan het begin, gedurende en aan het eind van de test kan worden bepaald. Het droog- of versgewicht moet aan het begin van de test worden bepaald bij een monster van de entcultuur dat representatief is voor wat er wordt gebruikt om de test te starten, en aan het eind van de test bij het plantenmateriaal van elk testvat en controlevat. Als het oppervlak van de schijfjes niet wordt gemeten, krijgt het drooggewicht de voorkeur boven het versgewicht.

41. Het totaaloppervlak van de schijfjes, het drooggewicht en het versgewicht kunnen als volgt worden bepaald:

(i) *Totaaloppervlak van de schijfjes:* het totaaloppervlak van de schijfjes van alle kolonies kan door beeldanalyse worden bepaald. Met een videocamera kan een silhouet van het testvat en de planten worden opgenomen (bijvoorbeeld door het vat op een lichtbak te zetten) en dit beeld kan gedigitaliseerd worden. Door kalibratie met vlakke vormen met een bekend oppervlak kan vervolgens het totaaloppervlak van de schijfjes in een testvat worden bepaald. Er moet op worden gelet dat storing door de rand van het testvat wordt voorkomen. Een andere methode, die echter bewerkelijker is, is een foto van de testvaten en planten te maken, het resulterende silhouet van de kolonies uit te knippen en het oppervlak te bepalen met een bladoppervlakanalysator of millimeterpapier. Ook andere technieken (bv. de papiergewicht-verhouding tussen het silhouet van het kolonieoppervlak en een oppervlakte-eenheid) kunnen bruikbaar zijn.

▼M6

(ii) *Drooggewicht:* Uit elk testvat worden alle kolonies verzameld en afgespoeld met gedestilleerd of gedeïoniseerd water. Ze worden afgevloeid om het aanhangend water te verwijderen en vervolgens bij 60 °C gedroogd tot constant gewicht. Wortelfragmenten moeten in de bepaling worden meegenomen. Het drooggewicht moet worden uitgedrukt met een precisie van ten minste 0,1 mg.

(iii) *Versgewicht:* Alle kolonies worden overgebracht naar vooraf gewogen buizen van polystyreen (of een ander inert materiaal) met kleine (1 mm) gaten in de afgeronde bodem. De buizen worden vervolgens tien minuten bij kamertemperatuur gecentrifugeerd bij 3 000 rpm. De buizen, die nu de kolonies zonder vocht bevatten, worden opnieuw gewogen en het versgewicht wordt berekend door aftrekking van het gewicht van de lege buis.

Frequentie van de metingen en analyses

42. Als een statische testopzet wordt gebruikt, moet de pH van elke dosisgroep aan het begin en het eind van de test worden gemeten. Als een semistatische testopzet wordt gebruikt, moet de pH vóór elke verversing worden gemeten in elke batch „verse" testoplossing en ook in de corresponderende „gebruikte" oplossingen.

43. De lichtintensiteit moet in de klimaatkast, incubator of klimaatkamer worden gemeten op punten op dezelfde afstand van de lichtbron als de *Lemna*-schijfjes. De metingen dienen ten minste eenmaal gedurende de test te worden uitgevoerd. De temperatuur van het medium moet ten minste eenmaal per dag worden gemeten in een speciaal vat dat onder dezelfde omstandigheden in de klimaatkast, incubator of klimaatkamer wordt bewaard.

44. Gedurende de test worden de concentraties van de teststof op geschikte tijdstippen bepaald. Bij statische tests moeten de concentraties in elk geval aan het begin en aan het eind van de test worden bepaald.

45. In semistatische tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting niet binnen ± 20 % van de nominale concentratie zal blijven, is het nodig om alle vers bereide testoplossingen en dezelfde oplossingen bij elke verversing te analyseren (zie punt 33). Wanneer de gemeten beginconcentratie van de teststof niet binnen ± 20 % van de nominale concentratie ligt, maar afdoende kan worden aangetoond dat de beginconcentraties herhaalbaar en stabiel zijn (d.w.z. binnen het bereik van 80-120 % van de beginconcentratie liggen), hoeven de chemische bepalingen alleen bij de hoogste en laagste testconcentratie te worden uitgevoerd. In alle gevallen volstaat het de bepaling van de teststofconcentraties vóór verversing op één van de replicaatvaten voor elke testconcentratie uit te voeren (of op de gecombineerde inhoud van de replicaatvaten).

46. Als een doorstroomtest wordt gebruikt, kan een vergelijkbaar bemonsteringsschema worden gebruikt als voor semistatische tests is beschreven, met een analyse aan het begin, halverwege en aan het eind van de test, maar in dit geval is een meting van de „gebruikte" oplossingen niet relevant. Bij een dergelijke test moet de stroomsnelheid van het verdunningsmiddel en de teststof of de stamoplossing van de teststof dagelijks worden gecontroleerd.

47. Als kan worden aangetoond dat de concentratie van de geteste stof gedurende de gehele test op afdoende wijze binnen ± 20 % van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, kan de analyse van de resultaten op basis van de nominale of gemeten beginwaarden worden uitgevoerd. Als de afwijking ten opzichte van de nominale of gemeten beginconcentratie groter is dan ± 20 %, moet de analyse van de resultaten worden uitgevoerd op basis van het meetkundige gemiddelde van de concentratie gedurende de blootstelling of op basis van modellen waarmee de afname van de concentratie van de teststof wordt beschreven (8).

▼M6

Limiettest

48. Onder bepaalde omstandigheden, bijvoorbeeld wanneer een oriënterende test erop wijst dat de teststof in concentraties tot 100 mg/l of tot de oplosbaarheidsgrens in het testmedium (als deze lager ligt) geen toxische effecten heeft, kan een limiettest worden uitgevoerd, waarbij de respons in een controlegroep en één dosisgroep (100 mg/ml of een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheidsgrens) wordt vergeleken. Er wordt sterk aanbevolen dit te ondersteunen met een analyse van de blootstellingsconcentratie. Alle in het voorgaande beschreven testomstandigheden en geldigheidscriteria zijn ook van toepassing bij een limiettest, alleen moet het aantal replicaten per dosis worden verdubbeld. De groei in de controlegroep en de dosisgroep kan geanalyseerd worden met behulp van een statistische toets om gemiddelden te vergelijken, bijvoorbeeld een t-toets van Student.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verdubbelingstijd

49. Om de verdubbelingstijd (T_d) van het aantal schijfjes te bepalen en na te gaan of in deze test aan dit geldigheidscriterium wordt voldaan (zie punt 12), wordt op de gegevens van de controlevaten de volgende formule toegepast:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

Hierbij is μ de gemiddelde specifieke groeisnelheid, bepaald zoals beschreven in de punten 54 en 55.

Responsvariabelen

50. De test is bedoeld om de effecten van de teststof op de vegetatieve groei van *Lemna* te bepalen. In deze testmethode worden twee responsvariabelen beschreven, aangezien verschillende rechtsgebieden verschillende voorkeuren en behoeften qua regelgeving hebben. De testresultaten zijn alleen in alle rechtsgebieden aanvaardbaar als de effecten met beide onderstaande responsvariabelen a) en b) worden bepaald:

(a) *Gemiddelde specifieke groeisnelheid:* deze responsvariabele wordt berekend op basis van de logaritmische verandering in het aantal schijfjes en daarnaast op basis van de logaritmische verandering in een andere meetparameter (totaaloppervlak van de schijfjes, drooggewicht of versgewicht) in de loop van de tijd (uitgedrukt per dag) in de controles en elke dosisgroep. Dit wordt ook wel de relatieve groeisnelheid genoemd (12).

(b) *Opbrengst:* deze responsvariabele wordt berekend op basis van de verandering in het aantal schijfjes en daarnaast op basis van de verandering in een andere meetparameter (totaaloppervlak van de schijfjes, drooggewicht of versgewicht) in de controles en elke dosisgroep tot het eind van de test.

51. Er moet worden opgemerkt dat de met behulp van deze twee responsvariabelen berekende waarden voor de toxiciteit niet vergelijkbaar zijn en bij gebruik van de resultaten van de test moet met dit verschil rekening worden gehouden. Vanwege de mathematische grondslagen van de respectieve benaderingen zullen EC_x -waarden op basis van de gemiddelde specifieke groeisnelheid (E_rC_x) in het algemeen hoger zijn dan resultaten op basis van de opbrengst (E_yC_x) als de testomstandigheden van deze testmethode worden aangehouden. Dit moet niet worden geïnterpreteerd als een verschil in gevoeligheid tussen de twee responsvariabelen, maar zuiver als een mathematisch verschil tussen de waarden. Het begrip gemiddelde specifieke groeisnelheid is gebaseerd op het algemene exponentiële groeipatroon van eendenkroos in niet-beperkte culturen, waarbij de toxiciteit wordt geschat op basis van de effecten op de groeisnelheid, zonder dat deze afhankelijk is van het absolute niveau van de specifieke groeisnelheid van de controle, van de

▼M6

helling van de concentratie-responscurve of van de duur van de test. De resultaten op basis van de responsvariabele opbrengst zijn daarentegen afhankelijk van al deze andere variabelen. De E_yC_x is afhankelijk van de specifieke groeisnelheid van de bij elke test gebruikte eendenkroossoort en van de maximale specifieke groeisnelheid die van soort tot soort en zelfs van kloon tot kloon kan verschillen. Deze responsvariabele moet niet worden gebruikt voor een vergelijking tussen eendenkroossoorten of zelfs verschillende klonen qua gevoeligheid voor toxische stoffen. De wetenschap geeft weliswaar de voorkeur aan het gebruik van de gemiddelde specifieke groeisnelheid om de toxiciteit te schatten, maar in deze testmethode wordt ook de schatting van de toxiciteit op basis van de opbrengst opgenomen om te voldoen aan de vereisten in de huidige regelgeving in bepaalde landen.

52. De toxiciteit moet worden geschat op basis van het aantal schijfjes en daarnaast één andere meetvariabele (totaaloppervlak van de schijfjes, drooggewicht of versgewicht), omdat sommige stoffen mogelijk een veel grotere invloed hebben op andere meetvariabelen dan het aantal schijfjes. Dit effect zou niet worden gedetecteerd als alleen naar het aantal schijfjes wordt gekeken.

53. Er wordt een tabel gemaakt met het aantal schijfjes en een andere geregistreerde meetvariabele, d.w.z. het totaaloppervlak van de schijfjes, het drooggewicht of het versgewicht, alsmede de concentraties van de teststof op elk meettijdstip. Bij de latere gegevensanalyse, bijvoorbeeld om de LOEC, de NOEC of de EC_x te bepalen, moet worden uitgegaan van de waarden voor de afzonderlijke replicaten en niet van de berekende gemiddelden voor elke dosisgroep.

Gemiddelde specifieke groeisnelheid

54. De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een bepaalde periode wordt voor elk controlereplicaat en elk dosisreplicaat met de volgende vergelijking berekend als de logaritmische toename van de groeivariabelen — het aantal schijfjes en één andere meetvariabele (totaaloppervlak van de schijfjes, drooggewicht of versgewicht):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

waarbij

— μ_{i-j}: de gemiddelde specifieke groeisnelheid van tijdstip i tot tijdstip j;

— N_i: de gemiddelde specifieke groeisnelheid van tijdstip i tot tijdstip j;

— N_j: de meetvariabele in het test- of controlevat op tijdstip j;

— t: de periode van tijdstip i tot tijdstip j.

Voor elke dosisgroep en controlegroep wordt een gemiddelde waarde voor de groeisnelheid berekend en een waarde voor de variantie.

55. De gemiddelde specifieke groeisnelheid moet voor de volledige testperiode worden berekend (tijdstip „i” in bovenstaande formule is het begin van de test en tijdstip „j” is het einde van de test). Voor elke testconcentratie en controle wordt een gemiddelde waarde voor de gemiddelde specifieke groeisnelheid berekend en een waarde voor de variantie. Daarnaast moet de partiële groeisnelheid worden bepaald om effecten van de teststof gedurende de blootstellingsperiode te evalueren (bijvoorbeeld door inspectie van de loggetransformeerde groeicurven). Aanzienlijke verschillen tussen de partiële groeisnelheid en de gemiddelde groeisnelheid wijzen erop dat de groei niet voortdurend exponentieel is en dat de groeicurven grondig moeten worden bestudeerd. In dit geval zou het een behoedzame aanpak zijn om de specifieke groeisnelheden van behandelde culturen gedurende de periode van maximale remming te vergelijken met die van controles gedurende dezelfde periode.

56. De procentuele remming van de groeisnelheid (I_r) kan dan voor elke testconcentratie (dosisgroep) worden berekend met de volgende formule:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

waarbij

— $\%I_r$: procentuele remming van de gemiddelde specifieke groeisnelheid;

— μ_C: gemiddelde waarde van μ in de controlegroep

— μ_T: gemiddelde waarde van μ in de dosisgroep

Opbrengst

57. De effecten op de opbrengst worden bepaald op basis van twee meetvariabelen, het aantal schijfjes en één andere meetvariabele (totaaloppervlak van de schijfjes, drooggewicht of versgewicht) in elk testvat aan het begin en aan het eind van de test. Voor het drooggewicht of het versgewicht wordt de biomassa aan het begin bepaald op basis van een schijfjesmonster genomen uit de batch die voor het beënten van de testvaten wordt gebruikt (zie punt 20). Voor elke testconcentratie en controle wordt een gemiddelde waarde voor de opbrengst berekend en een waarde voor de variantie. De gemiddelde procentuele remming van de opbrengst ($\%I_y$) kan voor elke dosisgroep als volgt worden berekend:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

waarbij

— $\%\ I_y$: procentuele remming van de opbrengst;

— b_C: biomassa aan het eind minus biomassa aan het begin in de controlegroep;

— b_T: biomassa aan het eind minus biomassa aan het begin in de dosisgroep.

Uitzetting van de groeicurven

58. Uitzetting van de gemiddelde procentuele remming van de responsvariabele (I_r, of I_y, berekend volgens punt 56 of 57) tegen de logaritme van de concentratie van de teststof levert concentratie-responscurven op.

Schatting van de EC_x

59. De EC_x (bv. EC_{50}) moet worden geschat op basis van zowel de gemiddelde specifieke groeisnelheid (E_rC_x) als de opbrengst (E_yC_x), in beide gevallen op basis van het aantal schijfjes en één andere meetvariabele (totaaloppervlak van de schijfjes, drooggewicht of versgewicht). De reden hiervoor is dat sommige teststoffen het aantal schijfjes anders beïnvloeden dan andere meetvariabelen. De gewenste toxiciteitsparameters zijn derhalve vier EC_x-waarden voor elk berekend remmingsniveau x: E_rC_x (aantal schijfjes); E_rC_x (totaaloppervlak schijfjes, drooggewicht of versgewicht); E_yC_x (aantal schijfjes); en E_yC_x (totaaloppervlak schijfjes, drooggewicht of versgewicht).

Statistische procedures

60. Het is de bedoeling om met behulp van regressieanalyse een kwantitatieve concentratie-responsrelatie te verkrijgen. Het is mogelijk een gewogen lineaire regressie te gebruiken nadat op de responsgegevens een lineariserende transformatie is uitgevoerd, bijvoorbeeld naar probit-, logit- of Weibull-eenheden (13), maar de voorkeur wordt gegeven aan niet-lineaire regressieprocedures, die beter omgaan met onvermijdelijke onregelmatigheden in gegevens en afwijkingen van uniforme verdelingen. In de buurt van het nulpunt of totale remming kunnen dergelijke onregelmatigheden door de transformatie worden uitvergroot en kunnen ze de analyse storen (13). Er moet worden

▼M6

opgemerkt dat standaardanalysemethoden met probit-, logit- of Weibull-transformaties bedoeld zijn voor gebruik bij een binaire respons (bv. sterfte of overleven) en moeten worden aangepast om voor groeisnelheid- of opbrengstdata te kunnen worden gebruikt. Specifieke procedures voor de bepaling van EC_x-waarden uit continue data zijn te vinden in (14), (15) en (16).

61. Voor elke te analyseren responsvariabele wordt de concentratie-responsrelatie gebruikt voor de berekening van puntschattingen van EC_x-waarden. Waar mogelijk moeten voor elke schatting de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen worden bepaald. De kwaliteit van de fitting van de responsgegevens op het regressiemodel moet grafisch of statistisch worden bepaald. De regressieanalyse moet met responsen van individuele replicaten worden uitgevoerd en niet met gemiddelden van dosisgroepen.

62. Als de beschikbare regressiemodellen/methoden niet geschikt zijn voor de gegevens, kunnen de EC_{50} en de betrouwbaarheidsgrenzen ook worden bepaald met behulp van lineaire interpolatie met bootstrapping (17).

63. Voor de bepaling van de LOEC en daaruit de NOEC moeten de gemiddelden van de dosisgroepen worden vergeleken met behulp van variantieanalyse-technieken (ANOVA). Het gemiddelde voor elke concentratie moet dan worden vergeleken met het gemiddelde van de controlegroep met behulp van een geschikte methode voor meervoudige vergelijking of trendtoets. Hiervoor kan de Dunnett- of Williams-toets geschikt zijn (18) (19) (20) (21). Er moet worden bepaald of de ANOVA-aanname van homogeniteit van variantie opgaat. Deze bepaling kan grafisch worden uitgevoerd of met een formele toets (22). Hiervoor kan de Levene- of Bartlett-toets worden gebruikt. Wanneer de aanname van homogeniteit van variantie niet opgaat, kan dit soms worden gecorrigeerd door logaritmische transformatie van de gegevens. Als de heterogeniteit van variantie extreem is en niet door transformatie kan worden gecorrigeerd, moet een analyse met methoden als de stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere worden overwogen. Aanvullende richtsnoeren voor het bepalen van de NOEC zijn te vinden in (16).

64. Recente wetenschappelijke ontwikkelingen hebben geleid tot een aanbeveling om het begrip NOEC niet langer te gebruiken en te vervangen door op regressie gebaseerde puntschattingen van EC_x. Voor deze *Lemna*-test is geen geschikte waarde voor x vastgesteld. Een interval van 10 tot 20 % lijkt geschikt (afhankelijk van de gekozen responsvariabele) en bij voorkeur moeten zowel de EC_{10} als de EC_{20} worden gerapporteerd.

Rapportage

65. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard en fysisch-chemische eigenschappen, waaronder de oplosbaarheidsgrens in water;

— chemische identificatiegegevens (bv. CAS-nummer), waaronder de zuiverheid (verontreinigingen).

Geteste soort:

— wetenschappelijke naam, kloon (indien bekend) en herkomst.

Testomstandigheden:

— gebruikte testprocedure (statisch, semistatisch of doorstroom);

— begindatum en duur van de test;

— testmedium;

— beschrijving van de testopzet: testvaten en deksels, volume van de oplossingen, aantal kolonies en schijfjes per testvat aan het begin van de test;

— testconcentraties (nominaal en gemeten, indien van toepassing) en aantal replicaten per concentratie;

▼M6

— wijze van bereiding van de stam- en testoplossingen met vermelding van het gebruik van eventuele oplosmiddelen of dispergeermiddelen;

— temperatuur tijdens de test;

— lichtbron, lichtintensiteit en homogeniteit van het licht;

— pH-waarden van de test- en controlemedia;

— concentraties van de teststof en de analysemethode met relevante kwaliteitsborgingsgegevens (valideringsstudies, standaarddeviaties of betrouwbaarheidsgrenzen van analyses);

— methoden voor de bepaling van het aantal schijfjes en andere meetvariabelen (bv. drooggewicht, versgewicht of oppervlak schijfjes);

— alle afwijkingen van deze testmethode.

Resultaten:

— de ruwe data: het aantal schijfjes en andere meetvariabelen in elk test- en controlevat bij elke observatie en op elk analysetijdstip;

— de gemiddelden en standaarddeviaties voor elke meetvariabele;

— de groeicurven voor elke concentratie (aanbevolen met log-getransformeerde meetvariabele; zie punt 55);

— de verdubbelingstijd/groeisnelheid in de controle op basis van het aantal schijfjes;

— de berekende responsvariabelen voor elk dosisreplicaat, met het gemiddelde en de variatiecoëfficiënt voor de replicaten;

— een grafische weergave van de concentratie-effectrelatie;

— schattingen van de toxiciteit voor responsvariabelen, zoals EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} en de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen. De LOEC en/of de NOEC, indien deze zijn berekend, en de voor de bepaling daarvan gebruikte statistische methoden;

— als ANOVA is gebruikt, de grootte van het effect dat kan worden gedetecteerd (bv. het minst significante verschil);

— een eventuele stimulering van de groei, als deze bij een behandeling is geconstateerd;

— eventuele zichtbare tekenen van fytotoxiciteit en observaties aan de testoplossingen;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp. 8pp.

(3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. 15pp. (in het Zweeds).

▼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 pp.

(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. and 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. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) 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- September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R.,, 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. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and 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. Organisation for Economic Co-operation and Development, 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. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Aanhangsel 1

Definities

In de context van deze testmethode worden de volgende definities en afkortingen gebruikt:

Biomassa: het drooggewicht van het levende materiaal in een populatie. Bij deze test worden meestal vervangende eenheden voor biomassa gemeten, zoals aantal schijfjes of schijfoppervlak, en ook deze eenheden kunnen bij gebruik van de term „biomassa" worden bedoeld.

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Chlorose: gele verkleuring van schijfweefsel.

Kloon: een organisme of cel, door ongeslachtelijke voortplanting ontstaan uit één individu. Individuen uit één kloon zijn derhalve genetisch identiek.

Kolonie: een combinatie van aan elkaar vastzittende moeder- en dochterschijfjes (meestal 2 tot 4). Soms ook plant genoemd.

EC_x: de concentratie van de in het testmedium opgeloste teststof die binnen een bepaalde blootstellingsperiode (die expliciet moet worden vermeld als deze afwijkt van de volledige of normale duur van de test) leidt tot een afname van de groei van *Lemna* met x % (bv. 50 %). Om ondubbelzinnig aan te geven of een EC-waarde gebaseerd is op de groeisnelheid of de opbrengst, worden de symbolen „E_rC" voor de groeisnelheid en „E_yC" voor de opbrengst gebruikt, gevolgd door de gebruikte meetvariabele, bv. E_rC (aantal schijfjes).

Doorstroomtest: een test waarbij de testoplossing continu wordt ververst.

Schijfje: een individuele „bladachtige" structuur van een eendenkroosplant. Het is de kleinste eenheid (d.w.z. individu) die zich kan voortplanten.

Gebocheldheid: schijfjes die er gebocheld of gezwollen uitzien.

Groei: een toename van de meetvariabele, bv. aantal schijfjes, drooggewicht, natgewicht of schijfoppervlak, gedurende de testperiode.

Groeisnelheid: (gemiddelde specifieke groeisnelheid): de logaritmische toename van de biomassa gedurende de blootstellingsperiode.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): de laagste geteste concentratie waarbij wordt waargenomen dat de stof binnen een bepaalde blootstellingstijd in vergelijking met de controle tot een statistisch significante afname van de groei ($p < 0,05$) leidt. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten een schadelijk effect hebben dat ten minste gelijk is aan het bij de LOEC waargenomen effect. Wanneer niet aan deze twee voorwaarden kan worden voldaan, moet een volledige toelichting worden gegeven op de wijze waarop de LOEC (en dus de NOEC) is bepaald.

Meetvariabelen: alle soorten variabelen die gemeten worden om aan de hand van een of meer verschillende responsvariabelen het eindpunt van de test te beschrijven. Bij deze methode zijn aantal schijfjes, schijfoppervlak, versgewicht en drooggewicht meetvariabelen.

Monocultuur: een cultuur met één plantensoort.

Necrose: sterfte van schijfjesweefsel (dat daardoor wit of met water doordrenkt wordt).

NOEC (No Observed Effect Concentration): de testconcentratie die direct onder de LOEC ligt.

Fenotype: de waarneembare kenmerken van een organisme die door de interactie van de genen met het milieu worden bepaald.

Responsvariabelen: variabelen voor de geschatte toxiciteit die met uiteenlopende berekeningsmethoden wordt afgeleid uit gemeten variabelen die de biomassa beschrijven. Voor deze testmethode worden de responsvariabelen groeisnelheid en opbrengst afgeleid uit meetvariabelen zoals aantal schijfjes, schijfoppervlak, versgewicht of drooggewicht.

▼M6

Semi-statische test (met verversing): een test waarbij de testoplossing op specifieke tijdstippen gedurende de test periodiek wordt ververst.

Statische test: een testmethode waarbij de testoplossing gedurende de test niet wordt ververst.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

Testeindpunt: de algemene factor die volgens het doel van de test door de teststof zal worden veranderd in vergelijking met de controle. Het eindpunt van deze testmethode is groeiremming, die kan worden uitgedrukt door verschillende responsvariabelen die op een of meer meetvariabelen gebaseerd zijn.

Groeimedium: het volledige kunstmatige groeimedium waarin de testplanten gedurende de blootstelling aan de teststof groeien. De teststof wordt normaal gesproken in het medium opgelost.

Opbrengst: de waarde van een meetvariabele om de biomassa uit te drukken aan het eind van de blootstellingstijd, verminderd met de waarde van de meetvariabele aan het begin van de blootstellingstijd.

▼M6

Aanhangsel 2

Beschrijving van *Lemna* spp.

De meestal als „eendenkroos" aangeduide waterplant, *Lemna* spp., behoort tot de familie *Lemnaceae*, die een aantal wereldwijd voorkomende soorten in vier geslachten omvat. Hun uiterlijk en taxonomie is uitgebreid beschreven (1) (2). *Lemna gibba* en *L. minor* zijn soorten die representatief zijn voor gematigde zones en worden vaak voor toxiciteitstests gebruikt. Beide soorten hebben een drijvende of in het water ondergedompelde bladachtige stengel (schijfje) en uit het midden van de onderkant van elk schijfje steekt een heel dunne wortel. *Lemna* spp. heeft zelden bloemen en de voortplanting verloopt ongeslachtelijk door het maken van nieuwe schijfjes (3). De jongere planten zijn meestal bleker dan de oudere, hebben kortere wortels en bestaan uit twee of drie schijfjes die niet even groot zijn. Doordat *Lemna* klein is, een eenvoudige structuur heeft, zich ongeslachtelijk voortplant en een korte generatietijd heeft, zijn planten van dit geslacht heel geschikt voor laboratoriumproeven (4) (5).

Omdat de gevoeligheid waarschijnlijk van soort tot soort verschilt, mag de gevoeligheid alleen binnen één soort worden vergeleken.

Voorbeelden van *Lemna*-soorten die voor tests zijn gebruikt: soortenreferentie

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: 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: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in het Zweeds).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp. 8pp.

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. et al. (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.

Bronnen van *Lemna*-soorten

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel:. +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
Verenigde Staten
Telefoon 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
ZWEDEN
Tel:. +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlijn
Duitsland
e-mail: lemna@uba.de

LITERATUUR

(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, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds *(Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) 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

Aanhangsel 3

Bewaring van stamculturen

Stamculturen kunnen bij lage temperatuur (4-10 °C) geruime tijd gebruiksklaar worden bewaard. Voor *Lemna* kan hetzelfde groeimedium worden gebruikt als voor de test, maar voor stamculturen kan een ander nutriëntrijk medium worden gebruikt.

Periodiek wordt een aantal jonge, lichtgroene planten met een aseptische techniek overgezet naar nieuwe kweekvaten met vers medium. Onder de hier voorgestelde koele omstandigheden kan tot drie maanden worden gewacht voordat een nieuwe subcultuur wordt gemaakt.

Er moeten chemisch zuivere (met zuur gewassen) en steriele glazen kweekvaten worden gebruikt en aseptische behandelingstechnieken worden toegepast. Bij verontreiniging van de stamcultuur, bv. met algen of schimmels, moeten maatregelen worden genomen om de verontreinigende organismen te verwijderen. Bij algen en de meeste andere verontreinigende organismen kan dit gebeuren door oppervlaktesterilisatie. Er wordt een monster van het verontreinigde plantenmateriaal genomen en de wortels worden afgeknipt. Het materiaal wordt krachtig geschud in schoon water en daarna gedurende 30 seconden tot 5 minuten ondergedompeld in 0,5 % (v/v) natriumhypochlorietoplossing. Vervolgens wordt het plantenmateriaal afgespoeld met steriel water en in een aantal porties overgebracht in kweekvaten met vers groeimedium. Veel schijfjes zullen door deze behandeling afsterven, vooral als er een lange blootstellingstijd wordt gebruikt, maar meestal zullen sommige van de overlevende schijfjes vrij van verontreiniging zijn. Deze kunnen dan worden gebruikt om nieuwe culturen te beënten.

▼M6

Aanhangsel 4

Media

Voor *L. minor* and *L. gibba* worden verschillende groeimedia aanbevolen. Voor *L. minor* wordt een gewijzigde versie van een medium van het SIS (Zweeds instituut voor normalisatie) aanbevolen, terwijl voor *L. gibba* het medium 20X-AAP wordt aanbevolen. Voor beide media is de samenstelling hieronder vermeld. Bij de bereiding van deze media moeten reagentia van p.a.-kwaliteit en gedeïoniseerd water worden gebruikt.

Groeimedium voor *Lemna* van het SIS

— De stamoplossingen I-V worden in de autoclaaf (15 minuten bij 120 °C) of door membraanfiltratie (poriediameter ongeveer 0,2 μm) gesteriliseerd.

— Stamoplossing VI (en facultatief VII) worden alleen door membraanfiltratie gesteriliseerd; deze mogen niet in de autoclaaf worden behandeld.

— De steriele stamoplossingen moeten koel en in het donker worden bewaard. De stamoplossingen I-V moeten binnen zes maanden worden gebruikt, terwijl stamoplossing VI (en facultatief VII) ten hoogste één maand kunnen worden bewaard.

Stamoplossing nr.	Stof	Concentratie in stamoplossing (g/l)	Concentratie in bereid medium (mg/·l)	Bereid medium	
				Element	Concentratie (mg/·l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffer)	490	490	—	—

Voor de bereiding van één liter SIS-medium wordt aan 900 ml gedeïoniseerd water toegevoegd:

▼**M6**

— 10 ml stamoplossing I

— 5 ml stamoplossing II

— 5 ml stamoplossing III

— 5 ml stamoplossing IV

— 1 ml stamoplossing V

— 5 ml stamoplossing VI

— 1 ml stamoplossing VII (facultatief)

Noot: Stamoplossing VII (MOPS-buffer) kan voor bepaalde teststoffen nodig zijn (zie punt 11).

De pH wordt met 0,1 M of 1 M HCl of NaOH op 6,5 ± 0,2 gebracht en het volume wordt met gedeïoniseerd water aangevuld tot 1 liter.

Groeimedium 20X-AAP

De stamoplossingen worden bereid in steriel gedestilleerd of gedeïoniseerd water.

De steriele stamoplossingen moeten koel en in het donker worden bewaard. Onder deze omstandigheden kunnen de stamoplossingen ten minste 6-8 weken worden bewaard.

Voor het medium 20X-AAP worden vijf nutriënt-stamoplossingen gemaakt (A1, A2, A3, B en C), waarbij p.a. reagentia worden gebruikt. Voor de bereiding van het groeimedium wordt 20 ml van elke nutriënt-stamoplossing toegevoegd aan ongeveer 850 ml gedeïoniseerd water. De pH wordt met 0,1 M of 1 M HCl of NaOH op 7,5 ± 0,1 gebracht en het volume wordt met gedeïoniseerd water aangevuld tot 1 liter. Vervolgens wordt het medium over een (ongeveer) 0,2 μm membraanfilter in een steriele fles gefiltreerd.

Het groeimedium voor de test moet 1-2 dagen vóór gebruik worden bereid, zodat de pH kan stabiliseren. De pH van het groeimedium moet vóór gebruik worden gecontroleerd en indien nodig met 0,1 M of 1 M HCl of NaOH worden bijgesteld, zoals hierboven is beschreven.

Stamoplossing nr.	Stof	Concentratie in stamoplossing (g/ · l) (*)	Concentratie in bereid medium (mg/ · l) (*)	Bereid medium	
				Element	Concentratie (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	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	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**

Stamoplossing nr.	Stof	Concentratie in stamoplossing (g/ · l) (*)	Concentratie in bereid medium (mg/ · l) (*)	Bereid medium	
				Element	Concentratie (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

(*) Tenzij anders vermeld

Noot: De theoretisch juiste eindconcentratie bicarbonaat (waarbij de pH niet significant hoeft te worden aangepast) is 15 mg/l en niet 300 mg/l. In het verleden, en ook in het ringonderzoek voor deze test, is het medium 20X-AAP echter altijd gebruikt met 300 mg/l bicarbonaat. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)

STEINBERG-medium (volgens ISO 20079)

Concentraties en stamoplossingen

Het gewijzigde Steinberg-medium wordt in ISO 20079 alleen voor *Lemna minor* gebruikt (aangezien daar alleen *Lemna minor* wordt toegestaan), maar uit tests is gebleken dat ook met *Lemna gibba* goede resultaten te verkrijgen zijn.

Bij de bereiding van het medium moeten chemische stoffen van reagens- of p.a.-kwaliteit en gedeïoniseerd water worden gebruikt.

Het nutriëntmedium wordt bereid uit stamoplossingen of het 10-voudig geconcentreerde medium, dat een maximale concentratie van het medium mogelijk maakt zonder dat er een neerslag ontstaat.

Tabel 1

pH-gestabiliseerd STEINBERG-medium (gewijzigd volgens Altenburger)

Component		Voedingsmedium	
Macro-elementen	mol. gewicht	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**

Component		Voedingsmedium	
Micro-elementen	mol. gewicht	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
Dinatrium-EDTA, dihydraat	372,24	1 500,00	4,03

Tabel 2

Stamoplossingen (macro-elementen)

1. Macro-elementen (50-voudig geconcentreerd)	**g/l**
Stamoplossing 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Stamoplossing 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Stamoplossing 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabel 3

Stamoplossingen (micro-elementen)

2. Macro-elementen (1 000-voudig geconcentreerd)	**mg/l**
Stamoplossing 4:	
H_3BO_3	120,0
Stamoplossing 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Stamoplossing 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Stamoplossing 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Stamoplossing 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
Dinatrium-EDTA, dihydraat	1 500,00

— De stamoplossingen 2 en 3 en (apart) 4 tot en met 7 kunnen worden gecombineerd (rekening houdend met de vereiste concentraties).

▼**M6**

— Om de stamoplossingen langer te kunnen bewaren kunnen ze 20 minuten bij 121 °C in een autoclaaf worden behandeld of steriel worden gefiltreerd (0,2 μm). Voor stamoplossing 8 wordt steriele filtratie (0,2 μm) sterk aanbevolen.

Bereiding van het (gewijzigde) STEINBERG-medium in de uiteindelijke concentratie

— Voeg 20 ml van de stamoplossingen 1, 2 en 3 (zie tabel 2) toe aan ongeveer 900 ml gedeïoniseerd water om neerslaan te voorkomen.

— Voeg 1,0 ml van de stamoplossingen 4, 5, 6, 7 en 8 toe (zie tabel 3).

— De pH moet nu 5,5 ± 0,2 zijn (eventueel aanpassen met een minimaal volume verdund NaOH of HCl).

— Vul met water aan tot 1 000 ml.

— Als de stamoplossingen gesteriliseerd zijn en er geschikt water wordt gebruikt, is verdere sterilisatie niet nodig. Als de sterilisatie met het uiteindelijke medium wordt uitgevoerd, moet stamoplossing 8 na de behandeling in de autoclaaf (20 minuten bij 121 °C) worden toegevoegd.

Bereiding van het 10-voudig geconcentreerde (gewijzigde) STEINBERG-medium om tijdelijk te bewaren

— Voeg 20 ml van de stamoplossingen 1, 2 en 3 (zie tabel 2) toe aan ongeveer 30 ml gedeïoniseerd water om neerslaan te voorkomen.

— Voeg 1,0 ml van de stamoplossingen 4, 5, 6, 7 en 8 toe (zie tabel 3). Vul met water aan tot 100 ml.

— Als de stamoplossingen gesteriliseerd zijn en er geschikt water wordt gebruikt, is verdere sterilisatie niet nodig. Als de sterilisatie met het uiteindelijke medium wordt uitgevoerd, moet stamoplossing 8 na de behandeling in de autoclaaf (20 minuten bij 121 °C) worden toegevoegd.

— De pH van het medium (uiteindelijke concentratie) moet 5,5 ± 0,2 zijn.

▼M4

C.27 TEST TER BEPALING VAN DE TOXICITEIT VOOR *CHIRONOMIDEA* IN SEDIMENT EN WATER M.B.V. VERRIJKT SEDIMENT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 218 (2004) van de OESO (TG 218). Deze testmethode is bedoeld om de effecten te bepalen van langdurige blootstelling van in het sediment levende larven van tweevleugelige zoetwaterinsecten van *Chironomus* sp. aan stoffen. De methode is gebaseerd op bestaande toxiciteitstestprotocollen voor *Chironomus riparius* en *Chironomus tentans* die in Europa (1)(2)(3) en Noord-Amerika (4)(5)(6)(7)(8) zijn ontwikkeld en aan een ringonderzoek zijn onderworpen (1)(6)(9). Er kunnen ook andere goed gedocumenteerde *Chironomidae* worden gebruikt, bijvoorbeeld *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Bij het in deze testmethode gebruikte blootstellingsscenario wordt het sediment met de teststof verrijkt. De selectie van het juiste blootstellingsscenario hangt af van het beoogde doel van de test. Het scenario waarbij sediment wordt verrijkt, dient om accumulatie van persistente stoffen in het sediment na te bootsen. Bij dit blootstellingssysteem wordt het sediment van een testsysteem van sediment en water verrijkt.

3. De stoffen die moeten worden getest voor in het sediment levende organismen zijn gewoonlijk gedurende lange tijd persistent in dit compartiment. De in het sediment levende organismen kunnen via een aantal routes worden blootgesteld. Het relatieve belang van elke blootstellingsroute en de tijd die voor de bijdrage aan de algehele toxische effecten via elke route wordt genomen, hangen af van de fysisch-chemische eigenschappen van de betrokken stof. Voor sterk adsorberende stoffen (bijvoorbeeld met log K_{ow} > 5) of voor stoffen die een covalente binding met het sediment aangaan, kan ingestie van besmet voedsel een belangrijke blootstellingsroute zijn. Om de toxiciteit van zeer lipofiele stoffen niet te onderschatten, kan worden overwogen vóór aanbrenging van de teststof voedsel aan het sediment toe te voegen. Om rekening te houden met alle mogelijke blootstellingsroutes, ligt de nadruk bij deze testmethode op langdurige blootstelling. De testduur bedraagt 20-28 dagen voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui*, en 28-65 dagen voor *C. tentans*. Als voor een specifiek doel, bijvoorbeeld om de effecten van een onstabiele stof te onderzoeken, kortetermijngegevens vereist zijn, kunnen na een periode van tien dagen aanvullende duplo's worden verwijderd.

4. De gemeten eindpunten zijn het totale aantal tot adult ontwikkelde dieren en de hiervoor benodigde tijd. Als aanvullende kortetermijngegevens vereist zijn, wordt aanbevolen de overleving en de groei van de larven pas te meten na een periode van tien dagen en zo nodig aanvullende duplo's te gebruiken.

5. Het gebruik van kunstmatig sediment wordt aanbevolen. Kunstmatig sediment heeft verschillende voordelen ten opzichte van natuurlijke sedimenten:

   — de experimentele variabiliteit wordt beperkt omdat het een reproduceerbare „genormaliseerde matrix" vormt en niet gezocht hoeft te worden naar niet-besmette schone sedimentbronnen;

   — het testsediment kent geen seizoensveranderingen en op ieder moment kunnen tests worden gestart; het sediment hoeft niet te worden voorbehandeld om inheemse fauna te verwijderen; het gebruik van kunstmatig sediment beperkt ook de kosten aangezien geen sediment in het veld hoeft te worden verzameld voor routinetests;

   — door het gebruik van kunstmatig sediment is de toxiciteit van stoffen vergelijkbaar en kunnen stoffen dienovereenkomstig worden gerangschikt.

6. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

▼M4

PRINCIPE VAN DE TEST

7. Larven in het eerste stadium van *Chironomidae* worden in sediment-watersystemen aan een concentratiebereik van de teststof blootgesteld. Het sediment wordt met de teststof verrijkt, waarna larven in het eerste stadium aan de gestabiliseerde concentraties sediment en water in de testglazen worden toegevoegd. Aan het eind van de test worden het uitkomstquotiënt en het ontwikkelingstempo van *Chironomidae* gemeten. Zo nodig kunnen tevens na tien dagen de overleving en het gewicht van de larven worden bepaald (hiervoor kunnen zo nodig aanvullende duplo's worden gebruikt). Deze gegevens worden geanalyseerd door hetzij met een regressiemodel een schatting te maken van de concentratie die zou leiden tot een afname van het uitkomen, de overleving of de groei van larven met × % (bv. EC_{15}, EC_{50} enz.), hetzij een statistische hypothese te toetsen om een NOEC/LOEC te bepalen. In het laatste geval worden de effectwaarden door middel van statistische toetsen met controlewaarden vergeleken.

GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

8. De oplosbaarheid in water van de teststof, de dampspanning ervan, de gemeten of berekende verdeling in sediment en de stabiliteit in water en sediment moeten bekend zijn. Er moet een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de teststof in bovenliggend water, poriewater en sediment. Andere nuttige informatie zijn de structuurformule en de zuiverheid van de teststof. Ook het uiteindelijke chemische lot van de teststof (bv. dissipatie, niet-biologische en biologische afbraak enz.) is nuttige informatie. Nadere richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat de uitvoering van de test problematisch is, zijn in (12) opgenomen.

REFERENTIESTOFFEN

9. Er kunnen regelmatig tests met referentiestoffen worden uitgevoerd om de betrouwbaarheid van het testprotocol en de testomstandigheden te waarborgen. Voorbeelden van toxische referentiestoffen die met succes in ringonderzoek en valideringsstudies zijn gebruikt, zijn: lindaan, trifluralin, pentachloorfenol, cadmiumchloride en kaliumchloride (1)(2)(5)(6)(13).

GELDIGHEID VAN DE TEST

10. De test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

— het uitkomstpercentage in de controlegroepen moet aan het eind van de test ten minste 70 % zijn (1)(6);

— de ontwikkeling tot adult van de in de controlevaten gestopte *C. riparius* en *C. yoshimatsui* moet binnen 12 tot 23 dagen plaatsvinden; voor *C. tentans* is een periode van 20 tot 65 dagen nodig;

— aan het eind van de test worden de pH en het gehalte aan opgeloste zuurstof in elk vat gemeten. Het zuurstofgehalte moet ten minste 60 % bedragen van de verzadigingswaarde van lucht (ASV) bij de heersende temperatuur en het bovenliggende water moet in alle testvaten een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben;

— de watertemperatuur mag niet met meer dan ± 1,0 °C afwijken. De watertemperatuur kan worden geregeld door een isotherme kamer te gebruiken; in dat geval wordt de kamertemperatuur met passende tussenpozen bevestigd.

▼M4

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Testvaten

11. De studie wordt uitgevoerd in bekerglazen met een inhoud van 600 ml en een diameter van 8 cm. Ook andere vaten kunnen geschikt zijn, mits zij voldoende diep zijn voor het bovenliggende water en het sediment. Het sedimentoppervlak moet ten minste 2 tot 3 cm^2 per larve bedragen. De verhouding tussen de dikte van de sedimentlaag en de diepte van het bovenliggende water moet 1:4 zijn. Testvaten en andere apparatuur die in contact met het testsysteem komt, moeten volledig van glas of een ander chemisch inert materiaal zijn gemaakt (bv. teflon).

Keuze van de soorten

12. Als testsoort heeft *Chironomus riparius* de voorkeur. *Chironomus tentans* is ook geschikt, maar is lastiger in het gebruik en vergt een lagere testperiode. *Chironomus yoshimatsui* mag ook worden gebruikt. Aanhangsel 2 bevat bijzonderheden over de kweekmethoden van *Chironomus riparius*. Er is ook informatie beschikbaar over de kweekomstandigheden van andere soorten, namelijk *Chironomus tentans* (4) en *Chironomus yoshimatsui* (11). Vóór de test moet de identificatie van de soorten worden bevestigd; als de organismen uit eigen kweek afkomstig zijn, is geen bevestiging voorafgaand aan iedere test nodig.

Sediment

13. Er wordt bij voorkeur kunstmatig sediment gebruikt (ook wel bereid, gereconstitueerd of synthetisch sediment genoemd). Als echter natuurlijk sediment wordt gebruikt, moet dit worden gekarakteriseerd (ten minste pH en gehalte aan organische koolstof; bepaling van parameters als C/N-verhouding en korrelgrootteverdeling worden eveneens aanbevolen) en moet het vrij zijn van verontreinigingen en andere organismen die de *Chironomidae* zouden kunnen beconcurreren of consumeren. Ook wordt aanbevolen het natuurlijke sediment, voordat het in een test ter bepaling van de toxiciteit voor *Chironomidae* wordt gebruikt, zeven dagen te laten rusten onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen. Voor deze test wordt sediment aanbevolen dat op basis van de in testmethode C.8 (14) gebruikte kunstmatige grond als volgt is samengesteld (1)(15)(16):

a) 4-5 % (drooggewicht) turf: de pH moet zo dicht mogelijk bij 5,5 tot 6,0 liggen; het is belangrijk dat fijngemalen turf in poedervorm (deeltjesgrootte ≤ 1 mm) wordt gebruikt dat alleen aan de lucht is gedroogd;

b) 20 % (drooggewicht) kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

c) 75-76 % (drooggewicht) kwartszand (overwegend bestaande uit fijn zand; meer dan 50 % van de deeltjes moet een grootte tussen 50 en 200 μm hebben);

d) er wordt gedeïoniseerd water toegevoegd om het uiteindelijke mengsel een vochtgehalte van 30-50 % te geven;

e) er wordt chemisch zuiver calciumcarbonaat ($CaCO_3$) toegevoegd om het uiteindelijke sedimentmengsel een pH van 7,0 ± 0,5 te geven. Het gehalte aan organische koolstof van het uiteindelijke mengsel moet 2 % (± 0,5 %) bedragen en moet worden aangepast door toevoeging van extra turf en zand overeenkomstig a) en c).

14. De bron van de turf, de kaolienklei en het zand moet bekend zijn. De bestanddelen van het sediment moeten worden gecontroleerd op verontreiniging met chemische stoffen (bv. zware metalen, organische chloor- en fosforverbindingen enz.). In aanhangsel 3 wordt een voorbeeld gegeven van de bereiding van kunstmatig sediment. Menging van droge bestanddelen is ook aanvaardbaar, mits wordt aangetoond dat na toevoeging van het bovenliggende water geen scheiding van de bestanddelen van het sediment plaatsvindt (bv. door drijvende turfdeeltjes) en dat de turf of het sediment voldoende geconditioneerd is.

▼M4

Water

15. Elk water dat aan de in de aanhangsels 2 en 4 vermelde chemische eigenschappen van aanvaardbaar verdunningswater voldoet, is geschikt als testwater. Als kweek- en testwater is elk geschikt water, natuurlijk water (oppervlakte- of grondwater), synthetisch water (zie aanhangsel 2) of ontchloord kraanwater aanvaardbaar, mits de *Chironomidae* daarin gedurende het kweken en testen overleven zonder tekenen van stress te vertonen. Aan het begin van de test moet het testwater een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben en mag de totale hardheid, uitgedrukt als $CaCO_3$, niet hoger zijn dan 400 mg/l. Als echter een interactie tussen de hardheidsionen en de teststof wordt vermoed, moet water met een lagere hardheid worden gebruikt (en is Elendt-medium M4 dus ongeschikt). Voor de hele studie moet één soort water worden gebruikt. De in aanhangsel 4 vermelde kwaliteitskenmerken voor water moeten ten minste twee keer per jaar worden gemeten, of wanneer vermoed wordt dat een significante verandering heeft plaatsgevonden.

Stamoplossingen — Verrijkte sedimenten

16. Verrijkte sedimenten worden gewoonlijk in de gekozen concentratie bereid door rechtstreeks een oplossing van de teststof aan het sediment toe te voegen. Een stamoplossing van de in gedeïoniseerd water opgeloste teststof wordt met het kunstmatige sediment gemengd met behulp van een wals of een voedermixer of door handmatig mengen. Indien de teststof slecht in water oplosbaar is, kan deze worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bv. hexaan, aceton of chloroform). Deze oplossing wordt vervolgens gemengd met 10 g fijn kwartszand per testvat. Laat het oplosmiddel verdampen, zodat het volledig uit het zand wordt verwijderd; vervolgens wordt het zand gemengd met een geschikte hoeveelheid sediment per testglas. Voor het oplossen, dispergeren of emulgeren van de teststof mogen alleen gemakkelijk verdampende oplosmiddelen worden gebruikt. Bij de bereiding van het sediment moet rekening worden gehouden met het zand dat in het mengsel van teststof en zand aanwezig is (het sediment wordt dus met minder zand bereid). De aan het sediment toegevoegde teststof moet zorgvuldig en gelijkmatig over het sediment worden verdeeld. Zo nodig kunnen deelmonsters worden geanalyseerd om de homogeniteit te bepalen.

TESTOPZET

17. De testopzet heeft betrekking op het aantal testconcentraties en de factor waarmee ze van elkaar verschillen, het aantal vaten per concentratieniveau en het aantal larven per vat. Er wordt een beschrijving gegeven van testopzetten voor de puntschatting van de EC, de schatting van de NOEC en de uitvoering van een limiettest.

Opzet voor regressieanalyse

18. De in de test gebruikte concentraties moeten de effectconcentratie (bv. EC_{15} en EC_{50}) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is, omvatten. In het algemeen nemen de nauwkeurigheid en in het bijzonder de geldigheid van schattingen van de effectconcentraties (EC_x) toe als de effectconcentratie binnen het geteste concentratiebereik ligt. Extrapolaties ver onder de laagste positieve concentratie of boven de hoogste concentraties moeten worden vermeden. Om het concentratiebereik te kiezen, kan een preliminaire bereikbepalingstest worden uitgevoerd (zie punt 27).

▼M4

19. Als een EC_x-schatting moet worden gemaakt, worden ten minste vijf concentraties in triplo getest. In alle gevallen is het raadzaam bij voldoende concentraties te testen om een goede modelschatting mogelijk te maken. Het verschil tussen de concentraties mag niet meer dan factor 2 bedragen (als de dosis-responscurve een geringe helling vertoont, kan hiervan worden afgeweken). Het aantal duplo's voor elke testgroep kan worden verlaagd wanneer het aantal testconcentraties met een verschillende respons wordt verhoogd. Als het aantal duplo's wordt verhoogd of de intervallen tussen de testconcentraties worden verkleind, worden de betrouwbaarheidsintervallen van de test gewoonlijk kleiner. Als een schatting van de overleving en de groei van larven na tien dagen moet worden gemaakt, zijn aanvullende duplo's vereist.

Opzet voor de schatting van een NOEC/LOEC

20. Als een LOEC- of NOEC-schatting moet worden gemaakt, worden vijf concentraties getest met ten minste vier duplo's en mag het verschil tussen de concentraties niet meer dan factor 2 bedragen. Het aantal duplo's moet toereikend zijn om voldoende onderscheidend vermogen te waarborgen om een verschil van 20 % met de controlegroep te kunnen vaststellen bij een significantieniveau van 5 % (p = 0,05). Het ontwikkelingstempo kan gewoonlijk worden bepaald met een variantieanalyse (ANOVA), zoals de toets van Dunnett of Williams (17)(18)(19)(20). Voor het uitkomstquotiënt kan de toets van Cochran-Armitage, de exacte toets van Fisher (met correctie van Bonferroni) of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt.

Limiettest

21. Als in de preliminaire bereikbepalingstest geen effecten zijn waargenomen, kan een limiettest worden uitgevoerd (één testconcentratie en controlegroep). Deze limiettest wordt uitgevoerd bij een concentratie die voldoende hoog is om de besluitvormers in staat te stellen mogelijke toxische effecten van de teststof uit te sluiten; deze concentratie wordt vastgesteld op een niveau dat zich naar verwachting in geen enkele situatie zal voordoen. Een concentratie van 1 000 mg/kg (drooggewicht) wordt aanbevolen. Gewoonlijk zijn zes duplo's voor zowel de testgroep als de controlegroep nodig. Aangetoond moet worden dat het onderscheidend vermogen groot genoeg is om een verschil van 20 % met de controlegroep te kunnen vaststellen bij een significantieniveau van 5 % (p = 0,05). Voor de meetrespons (ontwikkelingstempo en gewicht) is de T-toets een geschikte statistische methode, mits de gegevens aan de voorwaarden van deze toets voldoen (normale verdeling, homogene variantie). Als niet aan die voorwaarden wordt voldaan, kan de T-toets voor ongelijke variantie of een verdelingsvrije toets, zoals de Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, worden gebruikt. Voor het uitkomstquotiënt is de exacte toets van Fisher geschikt.

PROCEDURE

Blootstellingsomstandigheden

Voorbereiding van het verrijkt sediment-watersysteem

22. Voor het aanbrengen van de teststof wordt de in testmethode C.8, Toxiciteit voor regenwormen, beschreven verrijkingsprocedure aanbevolen (14). De verrijkte sedimenten worden in de vaten aangebracht, waaraan voldoende bovenliggend water wordt toegevoegd om te zorgen voor een volumeverhouding van 1:4 tussen het sediment en het water (zie punten 11 en 15). De sedimentlaag moet een dikte van 1,5 tot 3 cm hebben. Om te voorkomen dat tijdens de toevoeging van testwater aan de waterkolom bestanddelen zich van het sediment afscheiden en fijn materiaal in suspensie wordt gebracht, kan het sediment tijdens het gieten worden afgedekt met een kunststof schijf, die onmiddellijk daarna wordt verwijderd. Ook andere middelen kunnen geschikt zijn.

23. De testvaten worden (bijvoorbeeld met glasplaten) bedekt. Om verdampingsverliezen te compenseren, kan het waterniveau tijdens de studie worden aangevuld tot het oorspronkelijke volume. Om te voorkomen dat zouten ontstaan, moet hiervoor gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden gebruikt.

▼M4

Stabilisatie

24. Nadat het verrijkte sediment met bovenliggend water is voorbereid, is het wenselijk de teststof zich te laten verdelen uit de waterfase naar het sediment (3)(4)(6)(13). Dit moet bij voorkeur gebeuren onder de in de test heersende temperatuur- en beluchtingsomstandigheden. De tijd die nodig is voor equilibratie hangt af van het sediment en de stof en kan variëren van enkele uren tot verscheidene dagen en soms zelfs weken (vier-vijf weken). Aangezien veel stoffen ondertussen zouden kunnen afbreken, wordt niet gewacht tot een evenwicht is ontstaan, maar wordt een equilibratieperiode van 48 uur aanbevolen. Aan het eind van deze nadere equilibratieperiode wordt in het bovenliggende water, het poriewater en het sediment, bij ten minste de hoogste en een lagere concentratie, de concentratie van de teststof gemeten (zie punt 38). Op basis van deze analysen van de teststof kan de massabalans worden berekend en kunnen de resultaten als gemeten concentraties worden uitgedrukt.

Toevoeging van testorganismen

25. Vier tot vijf dagen voordat de testorganismen aan de testvaten worden toegevoegd, worden eipakketten uit de kweken genomen en in kleine vaten in een kweekmedium geplaatst. Er kan ouder medium uit de voorraadcultuur of vers bereid medium worden gebruikt. In het laatste geval wordt aan het kweekmedium een kleine hoeveelheid voedsel, zoals groene algen en/of enkele druppels filtraat uit een fijngemalen suspensie van visvoervlokken, toegevoegd (zie aanhangsel 2). Er worden alleen vers afgezette eipakketten gebruikt. Normaliter beginnen de larven enkele dagen nadat de eieren zijn gelegd (twee tot drie dagen voor *Chironomus riparius* bij 20 °C en één tot vier dagen voor *Chironomus tentans* bij 23 °C en *Chironomus yoshimatsui* bij 25 °C) uit te komen en vindt de groei van de larven plaats in vier stadia die elk vier-acht dagen duren. Voor de test worden larven in het eerste stadium (2-3 of 1-4 dagen na uitkomen) gebruikt. Het stadium van muggen kan mogelijk worden gecontroleerd aan de hand van de breedte van het epicranium (6).

26. Twintig larven in het eerste stadium worden met een stompe pipet willekeurig verdeeld over de testvaten met verrijkt sediment en water. Tijdens het inbrengen van de larven in de testvaten en de eerste 24 uur daarna wordt de beluchting van het water uitgezet (zie de punten 25 en 32). Afhankelijk van de testopzet (zie de punten 19 en 20) bedraagt het aantal larven dat per concentratie wordt gebruikt ten minste 60 voor de EC-puntschatting en 80 voor de NOEC-bepaling.

Testconcentraties

27. Om het concentratiebereik van de test te bepalen kan een bereikbepalingstest worden uitgevoerd. Daarvoor wordt een reeks sterk gespreide concentraties van de teststof gebruikt. Om te zorgen voor dezelfde oppervlaktedichtheid per *Chironomus* als in de eigenlijke test, worden de *Chironomidae* aan elke concentratie van de teststof blootgesteld gedurende een periode die een schatting van de wenselijke testconcentraties mogelijk maakt, en zijn geen duplo's vereist.

28. De testconcentraties voor de eigenlijke test worden gebaseerd op de uitkomsten van de bereikbepalingstest. Er moeten ten minste vijf concentraties worden gebruikt en geselecteerd, zoals beschreven in de punten 18 tot en met 20.

▼M4

Controlegroep

29. De test omvat controlevaten zonder teststof maar met sediment, met het vereiste aantal duplo's (zie de punten 19 en 20). Indien voor het aanbrengen van de teststof een oplosmiddel is gebruikt (zie punt 16), wordt een controlegroep voor het oplosmiddel in het sediment toegevoegd.

Testsysteem

30. Er worden statische systemen gebruikt. In uitzonderlijke gevallen kunnen semistatische of doorstroomsystemen met onderbroken of continue verversing van het bovenliggende water worden gebruikt, bijvoorbeeld als de kwaliteitsspecificaties voor het water niet geschikt zijn voor het testorganisme of het chemische evenwicht wordt aangetast (te laag gehalte opgeloste zuurstof, te hoge concentratie excretieproducten, uit het sediment vrijkomende mineralen, gewijzigde pH en/of waterhardheid enz.). Gewoonlijk kan de kwaliteit van het bovenliggende water echter met andere methoden, zoals beluchting, worden verbeterd; deze verdienen de voorkeur.

Voedsel

31. De larven moeten, bij voorkeur dagelijks of ten minste drie keer per week, worden gevoerd. Voor jonge larven lijkt in de eerste tien dagen 0,25-0,5 mg visvoer (een suspensie in water of fijngemalen voedsel, bv. TetraMin of TetraPhyll; zie details in aanhangsel 2) per larve per dag voldoende te zijn (0,35-0,5 mg voor *C. yoshimatsui*). Oudere larven kunnen iets meer voedsel nodig hebben: tijdens de rest van de test zou 0,5-1 mg per larve per dag moeten volstaan. Als schimmelgroei wordt waargenomen of sterfte in de controlegroepen wordt geconstateerd, moet het voedselrantsoen in alle test- en controlegroepen worden verlaagd. Als de schimmelontwikkeling niet kan worden gestopt, moet de test worden herhaald. Voor sterk adsorberende stoffen (bijvoorbeeld met log K_{ow} > 5) of voor stoffen die een covalente binding met het sediment aangaan, kan de voor de overleving en natuurlijke groei van de organismen vereiste hoeveelheid voedsel vóór de stabilisatieperiode aan het kunstmatige sediment worden toegevoegd. In dat geval wordt in plaats van visvoer plantaardig materiaal gebruikt, bv. 0,5 % (drooggewicht) fijngemalen bladeren van bv. brandnetel (*Urtica dioica*), witte moerbei (*Morus alba*), witte klaver (*Trifolium repens*), spinazie (*Spinacia oleracea*) of ander plantaardig materiaal (*Cerophyl* of alfacellulose).

Incubatieomstandigheden

32. In het bovenliggende water in de testvaten wordt bij voorkeur 24 uur na toevoeging van de larven voorzichtige beluchting toegepast en gedurende de test voortgezet (waarbij erop moet worden gelet dat het gehalte aan opgeloste zuurstof niet lager wordt dan 60 % van de ASV). De beluchting vindt plaats via een glazen pasteurpipet die 2-3 cm boven de sedimentlaag wordt bevestigd (bv. één of enkele luchtbellen/s). Als vluchtige stoffen worden getest, kan worden overgewogen het sediment-watersysteem niet te beluchten.

33. De test wordt verricht bij een constante temperatuur van 20 °C (± 2 °C). Voor *C. tentans* en *C. yoshimatsui* bedraagt de aanbevolen temperatuur respectievelijk 23 °C en 25 °C (± 2 °C). Er wordt een fotoperiode van 16 uur gebruikt bij een lichtintensiteit van 500 tot 1 000 lux.

▼M4

Blootstellingsduur

34. De blootstelling begint bij toevoeging van larven aan de verrijkte vaten en de controlevaten. De maximale blootstellingsduur bedraagt 28 dagen voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui*, en 65 dagen voor *C. tentans*. Als eerder muggen uitkomen, kan de test worden beëindigd nadat minimaal vijf dagen zijn verstreken na verschijning van de laatste volwassen mug in de controlegroep.

Waarnemingen

Uitkomst van muggen

35. De ontwikkelingstijd en het totale aantal volledig uitgekomen mannelijke en vrouwelijke muggen worden bepaald. Mannetjes zijn gemakkelijk te herkennen aan hun veerachtige antennes.

36. De testvaten worden ten minste drie keer per week geobserveerd om een visuele beoordeling van eventueel afwijkend gedrag te verrichten (bv. verlating van het sediment, ongewoon zwemgedrag), waarbij met de controlegroep wordt vergeleken. In de periode waarin verwacht wordt dat de muggen uitkomen, moet dagelijks een telling van de uitgekomen muggen worden verricht. Dagelijks worden het aantal volledig uitgekomen muggen en hun geslacht geregistreerd. Na identificatie worden de muggen uit de vaten verwijderd. Als er voor het eind van de test eipakketten zijn afgezet, worden deze geregistreerd en vervolgens verwijderd om te voorkomen dat opnieuw larven in het sediment terechtkomen. Ook wordt geregistreerd hoeveel zichtbare poppen niet zijn uitgekomen. Aanhangsel 5 bevat aanwijzingen voor de meting van het uitkomen.

Groei en overleving

37. Als gegevens over de overleving en groei van larven na tien dagen vereist zijn, wordt bij het begin gezorgd voor extra testvaten, die voor de voortzetting worden gebruikt. Het sediment van deze aanvullende vaten wordt door een 250 µm-zeef gevoerd, zodat de larven overblijven. De criteria voor „dood” zijn immobiliteit of geen reactie op een mechanische prikkel. Niet meer aangetroffen larven moeten als dode larven worden geteld (aan het begin van de test gestorven larven kunnen door microben zijn afgebroken). Het (asvrije) drooggewicht van de overlevende larven per testvat wordt bepaald en op grond daarvan wordt het gemiddelde individuele drooggewicht per vat berekend. Het is nuttig om te bepalen in welk stadium de overlevende larven zich bevinden; dit kan door de breedte van het epicranium van elk individu te meten.

Analytische bepalingen

Concentratie van de teststof

38. Voor aanvang van de test (d.w.z. voordat de larven worden toegevoegd) worden uit ten minste één vat per behandeling monsters van het bulksediment genomen om de concentratie van de teststof in het sediment analytisch te bepalen. Aanbevolen wordt ten minste bij de hoogste en een lagere concentratie monsters van het bovenliggende water, het poriewater en het sediment te analyseren bij het begin (zie punt 24) en eind van de test. Deze bepalingen van de concentratie van de teststof leveren informatie op over het gedrag en de verdeling van de teststof in het water-sedimentsysteem.

39. Wanneer tussenliggende metingen worden verricht (bv. op dag 7) en voor de analyse grotere monsters nodig zijn die niet uit de testvaten kunnen worden genomen zonder het testsysteem te beïnvloeden, worden analytische bepalingen verricht op monsters uit aanvullende testvaten die op dezelfde wijze zijn behandeld (inclusief toevoeging van testorganismen), maar niet voor biologische waarnemingen zijn gebruikt.

▼M4

40. Om het poriewater te isoleren, wordt aanbevolen te centrifugeren, bijvoorbeeld 30 minuten bij 10 000 g en een temperatuur van 4 °C. Filtratie kan ook aanvaardbaar zijn, mits aangetoond is dat de teststof niet aan filters adsorbeert. In sommige gevallen kan analyse van de concentraties in het poriewater onmogelijk zijn doordat het monster te klein is.

Fysisch-chemische eigenschappen

41. De pH en temperatuur van de testvaten moeten op een geschikte wijze worden gemeten (zie punt 10). De hardheid en het ammoniagehalte moeten bij het begin en het eind van de test in de controlevaten en in één testvat worden gemeten bij de hoogste concentratie.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

42. Doel van deze test is het bepalen van het effect van de teststof op het ontwikkelingstempo en het totale aantal volledig uitgekomen mannelijke en vrouwelijke muggen, of bij de tiendaagse test de effecten op de overleving en het gewicht van de larven. Als er geen aanwijzingen zijn voor een statistisch verschil in gevoeligheid tussen de geslachten, kunnen de resultaten voor mannetjes en vrouwtjes worden samengevoegd voor statistische analysen. Het verschil in gevoeligheid tussen de geslachten kan statistisch worden beoordeeld met bv. een χ^2-r × 2-toets. Zo nodig worden na tien dagen de overleving en het gemiddelde individuele drooggewicht per vat van de larven bepaald.

43. Bij voorkeur aan de hand van de bij het begin van de test gemeten sedimentconcentraties (zie punt 38) worden effectconcentraties berekend, die gebaseerd zijn op en uitgedrukt worden als drooggewicht.

44. Voor de berekening van een puntschatting voor de EC_{50} of enige andere EC_x kunnen de gegevens per vat als echte replicaties worden gebruikt. Bij de berekening van een betrouwbaarheidsinterval voor elke EC_x moet rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen vaten, tenzij wordt aangetoond dat deze verwaarloosbaar is. Wanneer voor het model de kleinstekwadratenmethode wordt toegepast, worden de gegevens per vat getransformeerd om de homogeniteit van de variantie te vergroten. Voordat de EC_x-waarden worden berekend, moet de respons echter zijn teruggetransformeerd naar de oorspronkelijke waarde.

45. Wanneer de statistische analyse dient om de NOEC/LOEC te bepalen door toetsing van een hypothese, moet rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen vaten, bv. met een geneste ANOVA. Als de gebruikelijke ANOVA-aannamen niet opgaan, kunnen robuustere tests (21) wenselijk zijn.

Uitkomstquotiënt

46. Het uitkomstquotiënt betreft een binaire respons en kan, wanneer een monotone dosisrespons wordt verwacht en de gegevens consistent zijn met die verwachting, worden geanalyseerd met de toets van Cochran-Armitage, toegepast met stapjes omlaag. Als dit niet het geval is, kan de exacte toets van Fisher of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt, met volgens Bonferroni-Holm gecorrigeerde p-waarden. Als er aanwijzingen zijn dat de variabiliteit tussen duplo's met dezelfde concentratie groter is dan een binomiale verdeling zou uitwijzen (zogeheten „extrabinomiale" variantie), moet een robuuste toets van Cochran-Armitage of een exacte toets van Fisher, zoals voorgesteld in punt 21, worden gebruikt.

▼M4

47. Het aantal uitgekomen muggen per vat, n_e, wordt bepaald en gedeeld door het aantal in het vat gestopte larven, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

waarbij:

ER = uitkomstquotiënt (emergence ratio);

n_e = aantal uitgekomen muggen per vat;

n_a = aantal larven dat in één vat is gestopt.

48. Bij wijze van alternatief, dat vooral voor grote monsters geschikt is, kan, wanneer een monotone dosisrespons wordt verwacht en de gegevens over het uitkomstquotiënt consistent zijn met die verwachting, het uitkomstquotiënt in geval van extrabinomiale variantie als een continue respons worden behandeld en kunnen procedures als de toets van Williams worden gebruikt. Wanneer er geen sprake is van een monotone dosisrespons, kan de toets van Dunnett geschikt zijn. Als „grote" monsters worden hier beschouwd monsters waarvan per duplo (vat) zowel het aantal uitgekomen als het aantal niet-uitgekomen muggen groter is dan vijf.

49. Voordat ANOVA-methoden worden toegepast, moeten de waarden van het uitkomstquotiënt eerst een hoektransformatie of een Freeman-Tukey-transformatie ondergaan om een approximatieve normale verdeling te verkrijgen en de variantie te egaliseren. Wanneer de absolute frequenties worden gebruikt, kan de toets van Cochran-Armitage, de exacte toets van Fisher (Bonferroni) of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt. De hoektransformatie wordt uitgevoerd door de arcsinus ($\sin^{-1}$) van de vierkantswortel van het uitkomstquotiënt te nemen.

50. Voor uitkomstquotiënten worden de EC_x-waarden berekend door middel van regressieanalyse (of bv. probit (22), logit, Weibull, geschikte commerciële software enz.). Als geen regressieanalyse mogelijk is (bv. als er minder dan twee partiële responsen zijn), worden andere niet-parametrische methoden, zoals voortschrijdend gemiddelde of eenvoudige interpolatie, gebruikt.

Ontwikkelingstempo

51. Met de gemiddelde ontwikkelingstijd wordt bedoeld de gemiddelde tijd tussen het moment waarop de larven in het vat worden gestopt (dag 0 van de test) en het moment waarop de experimentele cohort muggen uitkomt (voor de berekening van de werkelijke ontwikkelingstijd moet rekening worden gehouden met de leeftijd van de larven op het moment van inbrengen). Het ontwikkelingstempo is de reciproke waarde van de ontwikkelingstijd (eenheid: dag^{-1}) en staat voor het deel van de larvenontwikkeling dat per dag plaatsvindt. Het ontwikkelingstempo heeft de voorkeur voor de evaluatie van deze sedimenttoxiciteitsstudies, omdat deze in vergelijking met de ontwikkelingstijd een kleinere variantie en een grotere homogeniteit heeft en de normale verdeling beter benadert. Daarom kunnen sterke parametrische testprocedures beter op het ontwikkelingstempo dan op de ontwikkelingstijd worden toegepast. Voor het ontwikkelingstempo als continue respons kunnen EC_x = waarden worden geschat door middel van regressieanalyse (bv. (23)(24)).

52. Bij de volgende statistische tests wordt aangenomen dat het op inspectiedag x waargenomen aantal muggen is uitgekomen in het midden van het tijdsinterval tussen dag x en dag x-l (l = lengte van het inspectie-interval, doorgaans één dag). Het gemiddelde ontwikkelingstempo per vat ($\overline{x}$) wordt als volgt berekend:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

waarbij:

$\overline{x}$: gemiddeld ontwikkelingstempo per vat;

i: index van het inspectie-interval;

m: maximumaantal inspectie-intervallen;

f_i: in inspectie-interval i uitgekomen aantal muggen;

n_e: totaal aantal uitgekomen muggen aan het eind van de proef (= $\sum f_i$)

x_i: ontwikkelingstempo van de in interval i uitgekomen muggen;

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

waarbij

day_i: inspectiedag (dagen na aanbrengen);

l_i: lengte van inspectie-interval i (dagen, gewoonlijk één dag).

Testverslag

53. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische toestand en, indien relevant, fysisch-chemische kenmerken (oplosbaarheid in water, dampspanning, verdelingscoëfficiënt in de bodem (of in sediment, indien beschikbaar), stabiliteit in water enz.);

— identificatiegegevens van de stof (triviale naam, chemische naam, structuurformule, CAS-nummer enz.) met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van de teststof.

Diersoort:

— gebruikte proefdieren: soort, wetenschappelijke naam, bron van de organismen en kweekomstandigheden;

— informatie over de hantering van eipakketten en larven;

— leeftijd van de proefdieren op het moment waarop zij in de testvaten werden gestopt.

Testomstandigheden:

— gebruikt sediment, d.w.z. natuurlijk of kunstmatig sediment;

— voor natuurlijk sediment: de locatie en beschrijving van de sedimentmonsternemingsplaats inclusief, indien mogelijk, vervuilingsgeschiedenis; eigenschappen: pH, gehalte aan organische koolstof, C/N-verhouding en korrelgrootteverdeling (indien van toepassing);

— bereiding van het kunstmatige sediment: ingrediënten en eigenschappen (gehalte aan organische koolstof, pH, vocht enz. bij het begin van de test);

— bereiding van het testwater (bij gebruik van synthetisch water) en eigenschappen (zuurstofgehalte, pH, geleidbaarheid, hardheid enz. bij het begin van de test);

— dikte van de sedimentlaag en diepte van het bovenliggende water;

— volume van het bovenliggende en poriewater; gewicht van het natte sediment met en zonder poriewater;

▼M4

— testvaten (materiaal en afmetingen);

— sedimentverrijkingsmethode: toegepaste testconcentraties, aantal duplo's en eventueel gebruik van oplosmiddel;

— evenwichtsstabiliseringsfase van het verrijkte sediment-watersysteem: duur en omstandigheden;

— incubatieomstandigheden: temperatuur, lichtcyclus en -intensiteit, belichting (frequentie en intensiteit);

— details over het voedsel, met inbegrip van soort voedsel, bereiding, hoeveelheid en voederregime.

Resultaten:

— de nominale testconcentraties, de gemeten testconcentraties en de resultaten van alle analysen die zijn verricht om de concentratie van de teststof in het testvat te bepalen;

— kwaliteit van het water in de testvaten, d.w.z. pH, temperatuur, opgeloste zuurstof, hardheid en ammonia;

— vervanging van verdampt testwater, indien van toepassing;

— aantal uitgekomen mannelijke en vrouwelijke muggen per vat en per dag;

— aantal niet tot mug ontwikkelde larven per vat;

— gemiddeld individueel drooggewicht van de larven per vat, en per stadium, indien van toepassing;

— percentage uitgekomen muggen per vat en testconcentratie (mannelijke en vrouwelijke muggen gecombineerd);

— gemiddeld ontwikkelingstempo van volledig uitgekomen muggen per duplo en behandeling (mannelijke en vrouwelijke muggen gecombineerd);

— schattingen van toxische eindpunten, bv. EC_x (met bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen), NOEC en/of LOEC, en de statistische methoden waarmee zij zijn bepaald;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van een eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼**M4**

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Testmethode C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Voor de toepassing van deze testmethode wordt verstaan onder:

kunstmatig sediment (ook wel bereid, gereconstitueerd of synthetisch sediment genoemd): een mengsel van materialen waarmee de fysische bestanddelen van natuurlijk sediment worden nagebootst;

„**bovenliggend water**”: het water dat in het testvat op het sediment wordt gegoten;

„**poriewater**” (ook wel interstitieel water genoemd): het water in de ruimten tussen de sediment- en bodemdeeltjes;

„**verrijkt sediment**”: sediment waaraan teststof is toegevoegd;

„**teststof**”: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M4

Aanhangsel 2

Aanbevelingen voor de kweek van *Chironomus riparius*

1. Larven van *Chironomus* kunnen worden gekweekt in kristalliseerschalen of grotere houders. Op de bodem van de houder wordt een 5 tot 10 mm dikke laag fijn kwartszand gestrooid. Ook kiezelgoer (bv. Merck, Art 8117) is geschikt gebleken als substraat (in dat geval volstaat een dunnere laag van slechts enkele mm). Vervolgens wordt een enkele cm diepe laag geschikt water toegevoegd. Om verdampingsverliezen te compenseren en uitdroging te voorkomen, worden de waterniveaus zo nodig aangevuld. Indien nodig kan het water worden vervangen. Er wordt voorzichtige beluchting toegepast. De larvenkweekvaten worden in een geschikte kooi geplaatst, zodat de volwassen muggen niet kunnen ontsnappen. De kooi moet groot genoeg zijn om de uitgekomen volwassen muggen te laten zwermen, omdat anders mogelijk niet wordt gecopuleerd (ten minste ca. 30 x 30 x 30 cm).

2. De kooien worden op kamertemperatuur of in een kamer met een constant klimaat bij 20 ± 2 °C gehouden, met een lichtregime van 16 uur licht (intensiteit ca. 1 000 lux), 8 uur donker. Gerapporteerd is dat een relatieve luchtvochtigheid van minder dan 60 % de voortplanting kan belemmeren.

Verdunningswater

3. Elk geschikt natuurlijk of synthetisch water kan worden gebruikt. Gebruikelijk zijn bronwater, ontchloord kraanwater en kunstmatige media (bv. Elendt-media M4 en M7, zie hieronder). Voor gebruik moet het water worden belucht. Indien nodig kan het kweekwater worden ververst door voorzichtig het gebruikte water uit de kweekvaten te gieten of hevelen zonder de larvenhulzen te beschadigen.

Toediening van voedsel aan larven

4. De larven van *Chironomus* worden dagelijks gevoerd met ongeveer 250 mg visvoervlokken (TetraMin®, TetraPhyll® of een soortgelijk merk visvoer) per vat. Dit voer kan worden gegeven als droog gemalen poeder of als suspensie in water: aan 20 ml verdunningswater wordt 1,0 g voedervlokken toegevoegd en gemengd, zodat een homogeen mengsel ontstaat. Van dit mengsel kan ongeveer 5 ml per vat per dag worden gebruikt (schudden voor gebruik). Aan oudere larven kan meer voer worden gegeven.

5. Het voedsel wordt aangepast op basis van de waterkwaliteit. Als het kweekmedium troebel wordt, wordt de hoeveelheid voedsel verminderd. De toediening van voedsel moet zorgvuldig worden geobserveerd. Als te weinig voer wordt gegeven, zullen de larven naar de waterkolom uitwijken; als te veel voer wordt gegeven, neemt de microbiële activiteit toe en daalt het zuurstofgehalte. Beide condities kunnen tot lagere groeisnelheden leiden.

6. Wanneer nieuwe kweekvaten worden ingericht, kunnen ook enige cellen van groene algen (bv. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) worden toegevoegd.

Toediening van voedsel aan uitgekomen volwassen muggen

7. Enkele onderzoekers hebben erop gewezen dat een in een sacharoseoplossing gedrenkt wattenschijfje als voedsel kan dienen voor uitgekomen volwassen muggen.

▼M4

Uitkomst van muggen

8. In de larvenkweekvaten zullen zich bij 20 ± 2 °C na ongeveer 13-15 dagen volwassen muggen ontwikkelen. Mannetjes zijn gemakkelijk te herkennen aan hun veerachtige antennes.

Eipakketten

9. Zodra in de kweekkooi volwassen muggen aanwezig zijn, worden alle larvenkweekvaten drie keer per week gecontroleerd op afgezette geleiachtige eipakketten. Als eipakketten aanwezig zijn, worden zij voorzichtig verwijderd. Zij worden overgebracht naar een klein schaaltje met een monster van het kweekwater. De eipakketten worden gebruikt om een nieuw kweekvat te beginnen (bv. 2-4 eipakketten per vat) of worden voor toxiciteitstests gebruikt.

10. Larven in het eerste stadium moeten na twee-drie dagen uitkomen.

Inrichting van nieuwe kweekvaten

11. Zodra kweken zijn opgezet, moet het mogelijk zijn een keer per week, of minder vaak naargelang de testvoorschriften, een vers larvenkweekvat in te richten, waarbij de oudere vaten worden verwijderd nadat zich volwassen muggen hebben ontwikkeld. Dit systeem zorgt voor een regelmatige aanvoer van volwassen muggen met een minimum aan beheer.

Bereiding van de testoplossingen M4 en M7

12. Elendt (1990) heeft het medium M4 beschreven. Het medium M7 wordt op dezelfde wijze als M4 bereid, maar met een vier keer zo lage concentratie van de in tabel 1 vermelde stoffen. Er is een publicatie over het medium M7 in voorbereiding (persoonlijk medegedeeld door Elendt). De testoplossing mag niet volgens Elendt en Bias (1990) worden bereid, omdat de voor de stamoplossingen vermelde concentraties van $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 en K_2HPO_4 niet geschikt zijn.

Bereiding van het medium M7

13. Elke stamoplossing (I) wordt apart bereid en met deze stamoplossingen (I) wordt een gecombineerde stamoplossing (II) bereid (zie tabel 1). Het medium M7 wordt bereid uit 50 ml gecombineerde stamoplossing (II) en de in tabel 2 vermelde hoeveelheden van elke stamoplossing van macronutriënten en tot 1 liter gedeïoniseerd water aangevuld. Een vitaminestamoplossing wordt bereid door overeenkomstig tabel 3 drie vitaminen toe te voegen aan gedeïoniseerd water; kort voor gebruik wordt 0,1 ml van de gecombineerde vitaminestamoplossing aan het definitieve medium M7 toegevoegd (de vitaminestamoplossing wordt in bevroren toestand in kleine porties bewaard.) Het medium wordt belucht en gestabiliseerd.

LITERATUUR:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabel 1

Stamoplossingen van spoorelementen voor de media M4 en M7

Stamoplossingen (I)	Hoeveelheid (mg) aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water	Gecombineerde stamoplossing (II) bereiden door de volgende hoeveelheden (ml) van de stamoplossingen (I) te mengen en tot 1 liter gedeïoniseerd water aan te vullen		Uiteindelijke concentraties in testoplossingen (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Deze stoffen zijn verschillend voor M4 en M7, zoals hierboven is aangegeven.
(2) Deze oplossingen worden apart bereid, vervolgens samengevoegd en onmiddellijk in een autoclaaf behandeld.

Tabel 2

Stamoplossingen van macronutriënten voor de media M4 en M7

	Hoeveelheid aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water (mg)	Hoeveelheid stamoplossing van macronutriënten die wordt toegevoegd om de media M4 en M7 te bereiden (ml/l)	Uiteindelijke concentraties in de testoplossingen M4 en M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabel 3

Vitaminestamoplossing voor de media M4 en M7. De drie vitamineoplossingen worden tot één vitaminestamoplossing samengevoegd

	Hoeveelheid aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water (mg)	Hoeveelheid vitaminestamoplossing die wordt toegevoegd om de media M4 en M7 te bereiden (ml/l)	Uiteindelijke concentraties in de testoplossingen M4 en M7 (mg/l)
Thiaminehydrochloride	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

LITERATUUR:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Aanhangsel 3

BEREIDING VAN KUNSTMATIG SEDIMENT

Samenstelling van het sediment

Het kunstmatige sediment wordt als volgt samengesteld:

Bestanddeel	Eigenschappen	% van het sediment (drooggewicht)
Turf	Veenmosturf, zo dicht mogelijk bij pH 5,5-6,0, zonder zichtbare plantenresten, fijngemalen (deeltjesgrootte ≤ 1 mm) en aan de lucht gedroogd	4-5
Kwartszand	Korrelgrootte: > 50 % van de deeltjes moet binnen het bereik 50-200 µm liggen	75-76
Kaolienklei	Met ≥ 30 % kaoliniet	20
Organische koolstof	Aangepast door toevoeging van turf en zand	2 (± 0,5)
Calciumcarbonaat	$CaCO_3$, poedervormig, chemisch zuiver	0,05-0,1
Water	Geleidbaarheid ≤ 10 µS/cm	30-50

Bereiding

De turf wordt aan de lucht gedroogd en tot een fijn poeder vermalen. Er wordt een suspensie van de vereiste hoeveelheid turfpoeder in gedeïoniseerd water bereid met een kwalitatief hoogwaardig homogeniseerapparaat. De pH van deze suspensie wordt met $CaCO_3$ aangepast tot 5,5 ± 0,5. De suspensie wordt ten minste twee dagen lang onder zachtjes roeren bij 20 ± 2 °C geconditioneerd om de pH te stabiliseren en een stabiele microbiële component te verkrijgen. De pH wordt opnieuw gemeten en moet nu 6,0 ± 0,5 bedragen. Vervolgens wordt de turfsuspensie met de andere bestanddelen (zand en kaolienklei) en gedeïoniseerd water vermengd om een homogeen sediment te verkrijgen met een watergehalte van 30-50 % van het drooggewicht van het sediment. De pH van het uiteindelijke mengsel wordt nogmaals gemeten en zo nodig met $CaCO_3$ tot 6,5-7,5 aangepast. Er worden monsters van het sediment genomen om het drooggewicht en het gehalte aan organische koolstof te bepalen. Aanbevolen wordt het kunstmatige sediment, voordat het in een test ter bepaling van de toxiciteit voor *Chironomidae* wordt gebruikt, zeven dagen te laten rusten onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen.

Opslag

De droge bestanddelen voor de bereiding van het kunstmatige sediment kunnen op een droge en koele plaats bij kamertemperatuur worden bewaard. Het kunstmatige (natte) sediment mag niet worden opgeslagen voordat het in de test wordt gebruikt. Het moet onmiddellijk na afloop van de zevendaagse conditioneringsperiode die de bereiding afsluit, worden gebruikt.

LITERATUUR:

Hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Aanhangsel 4

Chemische eigenschappen van aanvaardbaar verdunningswater

Stof	Concentraties
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Hardheid uitgedrukt als $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Restchloorgehalte	< 10 µg/l
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

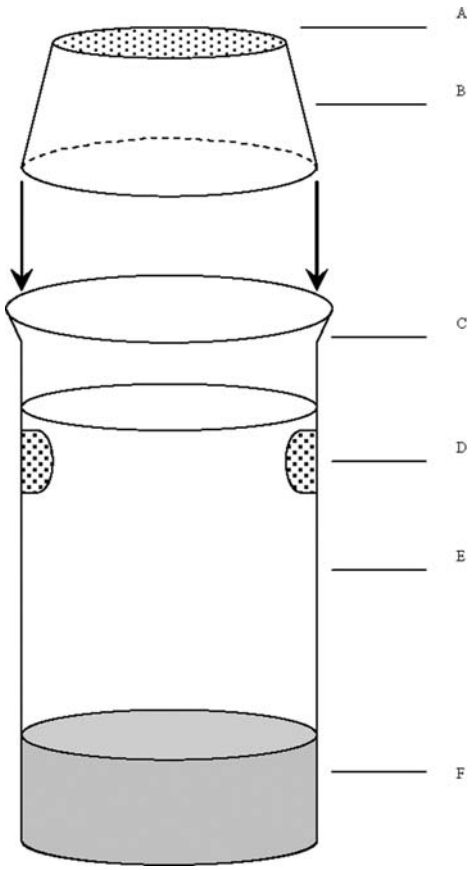
(*) Opgemerkt zij echter dat als er een interactie tussen de hardheidsionen en de teststof wordt vermoed, water met een lagere hardheid moet worden gebruikt (dan is Elendt-medium M4 dus ongeschikt).

▼M4

Aanhangsel 5

Richtsnoeren voor de monitoring van het uitkomen van larven van chiromidae

Op de testglazen worden „emergence traps” geplaatst. Deze vallen zijn vanaf dag 20 tot het eind van de test nodig. Onderstaande tekening toont een voorbeeld van een gebruikte val:



A: nylon hor

B: omgekeerde kunststofbekers

C: bekerglas zonder tuit

D: openingen met hor voor wateruitwisseling

E: water

F: sediment

▼M4

C.28. TEST TER BEPALING VAN DE TOXICITEIT VOOR *CHIRONOMIDEA* IN SEDIMENT EN WATER M.BV VERRIJKT WATER

INLEIDING

1. Deze methode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 219 (2004) van de OESO. De testmethode is bedoeld om de effecten te bepalen van langdurige blootstelling van in het sediment levende larven van tweevleugelige zoetwaterinsecten van *Chironomus* spp. aan stoffen. Zij berust hoofdzakelijk op de BBA-richtsnoeren en maakt gebruik van een testsysteem van sediment en water met kunstmatige grond en een blootstellingsscenario voor de waterkolom (1). De methode houdt ook rekening met de bestaande toxiciteitstestprotocollen voor *Chironomus riparius* en *Chironomus tentans* die in Europa en Noord-Amerika zijn ontwikkeld (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) en aan een ringonderzoek zijn onderworpen (1)(6)(9). Er kunnen ook andere goed gedocumenteerde *Chironomidae* worden gebruikt, bijvoorbeeld *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Bij het in deze testmethode gebruikte blootstellingsscenario wordt gebruikgemaakt van verrijkt water. De selectie van het juiste blootstellingsscenario hangt af van het beoogde doel van de test. Het waterblootstellingsscenario, waarbij de waterkolom wordt verrijkt, is bedoeld om een gebeurtenis na te bootsen waarbij een gespoten bestrijdingsmiddel overwaait; het scenario heeft betrekking op de initiële concentratiepiek in het poriewater. Dit scenario is ook bruikbaar voor andersoortige blootstelling (waaronder weglekkende chemische stoffen), maar niet voor accumulatieprocessen die langer duren dan de testperiode.

3. De stoffen die moeten worden getest voor in het sediment levende organismen, zijn gewoonlijk gedurende lange tijd persistent in dit compartiment. De in het sediment levende organismen kunnen via een aantal routes worden blootgesteld. Het relatieve belang van elke blootstellingsroute en de tijd die voor de bijdrage aan de algehele toxische effecten via elke route wordt genomen, hangen af van de fysisch-chemische eigenschappen van de betrokken stof. Voor sterk adsorberende stoffen (bijvoorbeeld met log K_{ow} > 5) of voor stoffen die een covalente binding met het sediment aangaan, kan ingestie van besmet voedsel een belangrijke blootstellingsroute zijn. Om de toxiciteit van zeer lipofiele stoffen niet te onderschatten, kan worden overwogen vóór aanbrenging van de teststof voedsel aan het sediment toe te voegen. Om rekening te houden met alle mogelijke blootstellingsroutes, ligt de nadruk bij deze testmethode op langdurige blootstelling. De testduur bedraagt 20-28 dagen voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui*, en 28-65 dagen voor *C. tentans*. Als voor een specifiek doel, bijvoorbeeld om de effecten van onstabiele stoffen te onderzoeken, kortetermijngegevens vereist zijn, kunnen na een periode van tien dagen aanvullende duplo's worden verwijderd.

4. De gemeten eindpunten zijn het totale aantal tot adult ontwikkelde dieren en de hiervoor benodigde tijd. Als aanvullende kortetermijngegevens vereist zijn, wordt aanbevolen de overleving en de groei van de larven pas te meten na een periode van tien dagen en zo nodig aanvullende duplo's te gebruiken.

5. Het gebruik van kunstmatig sediment wordt aanbevolen. Kunstmatig sediment heeft verschillende voordelen ten opzichte van natuurlijke sedimenten:

   — de experimentele variabiliteit wordt beperkt omdat het een reproduceerbare „genormaliseerde matrix" vormt en niet gezocht hoeft te worden naar niet-besmette schone sedimentbronnen;

   — het testsediment kent geen seizoensveranderingen en op ieder moment kunnen tests worden gestart; het sediment hoeft niet te worden voorbehandeld om inheemse fauna te verwijderen; het gebruik van kunstmatig sediment beperkt ook de kosten aangezien geen sediment in het veld hoeft te worden verzameld voor routinetests;

▼M4

— door het gebruik van kunstmatig sediment is de toxiciteit van stoffen vergelijkbaar en kunnen stoffen dienovereenkomstig worden gerangschikt: voor verscheidene stoffen zijn de toxiciteitsgegevens uit tests met natuurlijk en kunstmatig sediment vergelijkbaar gebleken (2).

6. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

7. Larven in het eerste stadium van *Chironomidae* worden in sediment-watersystemen aan een concentratiebereik van de teststof blootgesteld. De test begint op het moment waarop de larven in het eerste stadium in de testbekers met het sediment-watersysteem worden gestopt, waarna het water met de teststof wordt verrijkt. Aan het eind van de test worden het uitkomstquotiënt en het ontwikkelingstempo van *Chironomidae* gemeten. Zo nodig kunnen tevens na tien dagen de overleving en het gewicht van de larven worden bepaald (hiervoor kunnen zo nodig aanvullende duplo's worden gebruikt). Deze gegevens worden geanalyseerd door hetzij met een regressiemodel een schatting te maken van de concentratie die zou leiden tot een afname van het uitkomen, de overleving of de groei van larven met x % (bv. EC_{15}, EC_{50} enz.), hetzij een statistische hypothese te toetsen om een NOEC/LOEC te bepalen. In het laatste geval worden de effectwaarden door middel van statistische toetsen met controlewaarden vergeleken.

GEGEVENS OVER DE TESTSTOF

8. De oplosbaarheid in water van de teststof, de dampspanning ervan, de gemeten of berekende verdeling in sediment en de stabiliteit in water en sediment moeten bekend zijn. Er moet een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de teststof in bovenliggend water, poriewater en sediment. Andere nuttige informatie zijn de structuurformule en de zuiverheid van de teststof. Ook het uiteindelijke chemische lot van de teststof (bv. dissipatie, niet-biologische en biologische afbraak enz.) is nuttige informatie. Nadere richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat de uitvoering van de test problematisch is, zijn in (12) opgenomen.

REFERENTIESTOFFEN

9. Er kunnen regelmatig tests met referentiestoffen worden uitgevoerd om de betrouwbaarheid van het testprotocol en de testomstandigheden te waarborgen. Voorbeelden van toxische referentiestoffen die met succes in ringonderzoek en valideringsstudies zijn gebruikt, zijn: lindaan, trifluralin, pentachloorfenol, cadmiumchloride en kaliumchloride (1)(2)(5)(6)(13).

GELDIGHEID VAN DE TEST

10. De test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

— het uitkomstpercentage in de controlegroepen moet aan het eind van de test ten minste 70 % zijn (1)(6);

— de ontwikkeling tot adult van de in de controlevaten gestopte *C. riparius* en *C. yoshimatsui* moet binnen 12 tot 23 dagen plaatsvinden; voor *C. tentans* is een periode van 20 tot 65 dagen nodig;

— aan het eind van de test worden de pH en het gehalte aan opgeloste zuurstof in elk vat gemeten. Het zuurstofgehalte moet ten minste 60 % bedragen van de verzadigingswaarde van lucht (ASV) bij de heersende temperatuur en het bovenliggende water moet in alle testvaten een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben;

▼M4

— de watertemperatuur mag niet met meer dan ± 1,0 °C afwijken. De watertemperatuur kan worden geregeld door een isotherme kamer te gebruiken; in dat geval wordt de kamertemperatuur met passende tussenpozen bevestigd.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Testvaten

11. De studie wordt uitgevoerd in bekerglazen met een inhoud van 600 ml en een diameter van 8 cm. Ook andere vaten kunnen geschikt zijn, mits zij voldoende diep zijn voor het bovenliggende water en het sediment. Het sedimentoppervlak moet ten minste 2 tot 3 cm^2 per larve bedragen. De verhouding tussen de dikte van de sedimentlaag en de diepte van het bovenliggende water moet 1:4 zijn. Testvaten en andere apparatuur die in contact met het testsysteem komt, moeten volledig van glas of een ander chemisch inert materiaal zijn gemaakt (bv. teflon).

Keuze van de soorten

12. Als testsoort heeft *Chironomus riparius* de voorkeur. *Chironomus tentans* is ook geschikt maar is lastiger in het gebruik en vergt een lagere testperiode. *Chironomus yoshimatsui* mag ook worden gebruikt. Aanhangsel 2 bevat bijzonderheden over de kweekmethoden van *Chironomus riparius*. Er is ook informatie beschikbaar over de kweekomstandigheden van andere soorten, namelijk *Chironomus tentans* (4) en *Chironomus yoshimatsui* (11). Vóór de test moet de identificatie van de soorten worden bevestigd; als de organismen uit eigen kweek afkomstig zijn, is geen bevestiging voorafgaand aan iedere test nodig.

Sediment

13. Er wordt bij voorkeur kunstmatig sediment gebruikt (ook wel bereid, gereconstitueerd of synthetisch sediment genoemd). Als echter natuurlijk sediment wordt gebruikt, moet dit worden gekarakteriseerd (ten minste pH en gehalte aan organische koolstof; bepaling van parameters als C/N-verhouding en korrelgrootteverdeling worden eveneens aanbevolen) en moet het vrij zijn van verontreinigingen en andere organismen die de *Chironomidae* zouden kunnen beconcurreren of consumeren. Ook wordt aanbevolen het natuurlijke sediment, voordat het in een test ter bepaling van de toxiciteit voor *Chironomidae* wordt gebruikt, zeven dagen te laten rusten onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen. Voor deze test wordt sediment aanbevolen dat op basis van de in testmethode C.8 (14) gebruikte kunstmatige grond als volgt is samengesteld (1)(15)(16):

a) 4-5 % (drooggewicht) turf: de pH moet zo dicht mogelijk bij 5,5 tot 6,0 liggen; het is belangrijk dat fijngemalen turf in poedervorm (deeltjesgrootte ≤ 1 mm) wordt gebruikt dat alleen aan de lucht is gedroogd;

b) 20 % (drooggewicht) kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

c) 75-76 % (drooggewicht) kwartszand (overwegend bestaande uit fijn zand; meer dan 50 % van de deeltjes moet een grootte tussen 50 en 200 µm hebben);

d) er wordt gedeïoniseerd water toegevoegd om het uiteindelijke mengsel een vochtgehalte van 30-50 % te geven;

e) er wordt chemisch zuiver calciumcarbonaat ($CaCO_3$) toegevoegd om het uiteindelijke sedimentmengsel een pH van 7,0 ± 0,5 te geven.

f) Het gehalte aan organische koolstof van het uiteindelijke mengsel moet 2 % (± 0,5 %) bedragen en moet worden aangepast door toevoeging van extra turf en zand overeenkomstig a) en c).

▼M4

14. De bron van de turf, de kaolienklei en het zand moet bekend zijn. De bestanddelen van het sediment moeten worden gecontroleerd op verontreiniging met chemische stoffen (bv. zware metalen, organische chloor- en fosforverbindingen enz.). In aanhangsel 3 wordt een voorbeeld gegeven van de bereiding van kunstmatig sediment. Menging van droge bestanddelen is ook aanvaardbaar, mits wordt aangetoond dat na toevoeging van het bovenliggende water geen scheiding van de bestanddelen van het sediment plaatsvindt (bv. door drijvende turfdeeltjes) en dat de turf of het sediment voldoende geconditioneerd is.

Water

15. Elk water dat aan de in de aanhangsels 2 en 4 vermelde chemische eigenschappen van aanvaardbaar verdunningswater voldoet, is geschikt als testwater. Als kweek- en testwater is elk geschikt water, natuurlijk water (oppervlakte- of grondwater), synthetisch water (zie aanhangsel 2) of ontchloord kraanwater aanvaardbaar, mits de *Chironomidae* daarin gedurende het kweken en testen overleven zonder tekenen van stress te vertonen. Aan het begin van de test moet het testwater een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben en mag de totale hardheid, uitgedrukt als $CaCO_3$, niet hoger zijn dan 400 mg/l. Als echter een interactie tussen de hardheidsionen en de teststof wordt vermoed, moet water met een lagere hardheid worden gebruikt (en is Elendt-medium M4 dus ongeschikt). Voor de hele studie moet één soort water worden gebruikt. De in aanhangsel 4 vermelde kwaliteitskenmerken voor water moeten ten minste twee keer per jaar worden gemeten, of wanneer vermoed wordt dat een significante verandering heeft plaatsgevonden.

Stamoplossingen — verrijkt water

16. De testconcentraties worden berekend op basis van de concentraties in de waterkolom, d.w.z. het boven het sediment liggende water. Testoplossingen van de gekozen concentraties worden gewoonlijk bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossingen worden bij voorkeur bereid door oplossing van de teststof in het testmedium. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen kan in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van geschikte oplosmiddelen zijn aceton, ethanol, methanol, ethyleenglycolmonoëthylether, ethyleenglycoldimethylether, dimethylformamide en triëthyleenglycol. Als dispergeermiddelen mogen Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40 worden gebruikt. De concentratie van de solubilisator in het uiteindelijke testmedium moet minimaal zijn (d.w.z. ≤ 0,1 ml/l) en moet in elke testgroep gelijk zijn. Indien een solubilisator wordt gebruikt, mag dit geen significante effecten op de overleving hebben, noch een zichtbaar negatief effect op de *Chironomidae*-larven hebben, hetgeen blijkt uit de controlegroep met uitsluitend oplosmiddel. Het gebruik van deze stoffen moet echter zo veel mogelijk worden vermeden.

TESTOPZET

17. De testopzet heeft betrekking op het aantal testconcentraties en de factor waarmee ze van elkaar verschillen, het aantal vaten per concentratieniveau en het aantal larven per vat. Er wordt een beschrijving gegeven van testopzetten voor de puntschatting van de EC, de schatting van de NOEC en de uitvoering van een limiettest. Regressieanalyse heeft de voorkeur boven toetsing van een hypothese.

Opzet voor regressieanalyse

18. De in de test gebruikte concentraties moeten de effectconcentratie (bv. EC_{15} en EC_{50}) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is omvatten. In het algemeen nemen de nauwkeurigheid en in het bijzonder de geldigheid van schattingen van de effectconcentraties (EC_x) toe

▼M4

als de effectconcentratie binnen het geteste concentratiebereik ligt. Extrapolaties ver onder de laagste positieve concentratie of boven de hoogste concentraties moeten worden vermeden. Om het concentratiebereik te kiezen, kan een preliminaire bereikbepalingstest worden uitgevoerd (zie punt 27).

19. Als een EC_x-schatting moet worden gemaakt, worden ten minste vijf concentraties in triplo getest. In alle gevallen is het raadzaam bij voldoende concentraties te testen om een goede modelschatting mogelijk te maken. Het verschil tussen de concentraties mag niet meer dan factor 2 bedragen (als de dosis-responscurve een geringe helling vertoont, kan hiervan worden afgeweken). Het aantal duplo's voor elke testgroep kan worden verlaagd wanneer het aantal testconcentraties met een verschillende respons wordt verhoogd. Als het aantal duplo's wordt verhoogd of de intervallen tussen de testconcentraties worden verkleind, worden de betrouwbaarheidsintervallen van de test gewoonlijk kleiner. Als een schatting van de overleving en de groei van larven na tien dagen moet worden gemaakt, zijn aanvullende duplo's vereist.

Opzet voor de schatting van een NOEC/LOEC

20. Als een LOEC- of NOEC-schatting moet worden gemaakt, worden vijf concentraties getest met ten minste vier duplo's en mag het verschil tussen de concentraties niet meer dan factor 2 bedragen. Het aantal duplo's moet toereikend zijn om voldoende onderscheidend vermogen te waarborgen om een verschil van 20 % met de controlegroep te kunnen vaststellen bij een significantieniveau van 5 % ($p = 0,05$). Het ontwikkelingstempo kan gewoonlijk worden bepaald met een variantieanalyse (ANOVA), zoals de toets van Dunnett of Williams (17)(18)(19)(20). Voor het uitkomstquotiënt kan de toets van Cochran-Armitage, de exacte toets van Fisher (met correctie van Bonferroni) of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt.

Limiettest

21. Als in de preliminaire bereikbepalingstest geen effecten zijn waargenomen, kan een limiettest worden uitgevoerd (één testconcentratie en controlegroep). De limiettest dient om aanwijzingen te verzamelen dat de toxische waarde van de teststof groter is dan de geteste limietconcentratie. Er kan geen concentratie voor deze testmethode worden aanbevolen; die wordt aan het oordeel van de regelgever overgelaten. Gewoonlijk zijn zes duplo's voor zowel de testgroep als de controlegroep nodig. Aangetoond moet worden dat het onderscheidend vermogen groot genoeg is om een verschil van 20 % met de controlegroep te kunnen vaststellen bij een significantieniveau van 5 % ($p = 0,05$). Voor de meetrespons (ontwikkelingstempo en gewicht) is de T-toets een geschikte statistische methode, mits de gegevens aan de voorwaarden van deze toets voldoen (normale verdeling, homogene variantie). Als niet aan die voorwaarden wordt voldaan, kan de T-toets voor ongelijke variantie of een verdelingsvrije toets, zoals de Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, worden gebruikt. Voor het uitkomstquotiënt is de exacte toets van Fisher geschikt.

PROCEDURE

Blootstellingsomstandigheden

Voorbereiding van het verrijkt water-sedimentsysteem

22. In de testvaten wordt voldoende kunstmatig sediment (zie de punten 13-14 en aanhangsel 3) aangebracht om een laag van ten minste 1,5 cm te vormen. Vervolgens wordt een 6 cm diepe laag water toegevoegd (zie punt 15). De verhouding tussen de dikte van de sedimentlaag en de diepte van het water mag niet groter zijn dan 1:4 en de sedimentlaag mag niet dikker zijn dan 3 cm. Laat het sediment-watersysteem onder voorzichtige beluchting zeven dagen rusten voordat de testorganismen worden toegevoegd (zie punt 14 en aanhangsel 3). Om te voorkomen dat tijdens de toevoeging van testwater aan de waterkolom bestanddelen zich van het sediment afscheiden en fijn materiaal in suspensie wordt gebracht, kan het sediment tijdens het gieten worden afgedekt met een kunststof schijf, die onmiddellijk daarna wordt verwijderd. Ook andere middelen kunnen geschikt zijn.

▼M4

23. De testvaten worden (bijvoorbeeld met glasplaten) bedekt. Om verdampingsverliezen te compenseren, kan het waterniveau tijdens de studie worden aangevuld tot het oorspronkelijke volume. Om te voorkomen dat zouten ontstaan, moet hiervoor gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden gebruikt.

Toevoeging van testorganismen

24. Vier tot vijf dagen voordat de testorganismen aan de testvaten worden toegevoegd, worden eipakketten uit de kweken genomen en in kleine vaten in een kweekmedium geplaatst. Er kan ouder medium uit de voorraadcultuur of vers bereid medium worden gebruikt. In het laatste geval wordt aan het kweekmedium een kleine hoeveelheid voedsel, zoals groene algen en/of enkele druppels filtraat uit een fijngemalen suspensie van visvoervlokken, toegevoegd (zie aanhangsel 2). Er worden alleen vers afgezette eipakketten gebruikt. Normaliter beginnen de larven enkele dagen nadat de eieren zijn gelegd (twee tot drie dagen voor *Chironomus riparius* bij 20 °C en één tot vier dagen voor *Chironomus tentans* bij 23 °C en *Chironomus yoshimatsui* bij 25 °C) uit te komen en vindt de groei van de larven plaats in vier stadia die elk vier-acht dagen duren. Voor de test worden larven in het eerste stadium (twee-drie of één-vier dagen na uitkomen) gebruikt. Het stadium van muggen kan mogelijk worden gecontroleerd aan de hand van de breedte van het epicranium (6).

25. Twintig larven in het eerste stadium worden met een stompe pipet willekeurig verdeeld over de testvaten met verrijkt sediment en water. Tijdens het inbrengen van de larven in de testvaten en de eerste 24 uur daarna wordt de beluchting van het water uitgezet (zie de punten 24 en 32). Afhankelijk van de testopzet (zie de punten 19 en 20) bedraagt het aantal larven dat per concentratie wordt gebruikt ten minste 60 voor de EC-puntschatting en 80 voor de NOEC-bepaling.

26. 24 uur na toevoeging van de larven wordt de bovenliggende waterkolom met de teststof verrijkt, waarna weer lichte beluchting wordt toegepast. Onder het wateroppervlak worden met een pipet kleine hoeveelheden van de teststofoplossing ingebracht. Vervolgens wordt het bovenliggende water voorzichtig gemengd, zonder het sediment te verstoren.

Testconcentraties

27. Om het concentratiebereik van de test te bepalen, kan een bereikbepalingstest worden uitgevoerd. Daarvoor wordt een reeks sterk gespreide concentraties van de teststof gebruikt. Om te zorgen voor dezelfde oppervlaktedichtheid per *Chironomus* als in de eigenlijke test, worden de *Chironomidae* aan elke concentratie van de teststof blootgesteld gedurende een periode die een schatting van de wenselijke testconcentraties mogelijk maakt, en zijn geen duplo's vereist.

28. De testconcentraties voor de eigenlijke test worden gebaseerd op de uitkomsten van de bereikbepalingstest. Er moeten ten minste vijf concentraties worden gebruikt en geselecteerd, zoals beschreven in de punten 18 tot en met 20.

Controlegroep

29. De test omvat controlevaten zonder teststof maar met sediment, met het vereiste aantal duplo's (zie de punten 19-20). Indien voor het aanbrengen van de teststof een oplosmiddel is gebruikt (zie punt 16), wordt een controlegroep voor het oplosmiddel in het sediment toegevoegd.

▼M4

Testsysteem

30. Er worden statische systemen gebruikt. In uitzonderlijke gevallen kunnen semistatische of doorstroomsystemen met onderbroken of continue verversing van het bovenliggende water worden gebruikt, bijvoorbeeld als de kwaliteitsspecificaties voor het water niet geschikt zijn voor het testorganisme of het chemische evenwicht wordt aangetast (te laag gehalte opgeloste zuurstof, te hoge concentratie excretieproducten, uit het sediment vrijkomende mineralen, gewijzigde pH en/of waterhardheid enz.). Gewoonlijk kan de kwaliteit van het bovenliggende water echter met andere methoden, zoals beluchting, worden verbeterd; deze verdienen de voorkeur.

Voedsel

31. De larven moeten, bij voorkeur dagelijks of ten minste drie keer per week, worden gevoerd. Voor jonge larven lijkt in de eerste tien dagen 0,25-0,5 mg visvoer (een suspensie in water of fijngemalen voedsel, bv. TetraMin of TetraPhyll; zie details in aanhangsel 2) per larve per dag voldoende te zijn (0,35-0,5 mg voor *C. yoshimatsui*). Oudere larven kunnen iets meer voedsel nodig hebben: tijdens de rest van de test zou 0,5-1 mg per larve per dag moeten volstaan. Als schimmelgroei wordt waargenomen of sterfte in de controlegroepen wordt geconstateerd, moet het voedselrantsoen in alle test- en controlegroepen worden verlaagd. Als de schimmelontwikkeling niet kan worden gestopt, moet de test worden herhaald. Voor sterk adsorberende stoffen (bijvoorbeeld met log K_{ow} > 5) of voor stoffen die een covalente binding met het sediment aangaan kan de voor de overleving en natuurlijke groei van de organismen vereiste hoeveelheid voedsel vóór de stabilisatieperiode aan het kunstmatige sediment worden toegevoegd. In dat geval wordt in plaats van visvoer plantaardig materiaal gebruikt, bv. 0,5 % (drooggewicht) fijngemalen bladeren van bv. brandnetel (*Urtica dioica*), witte moerbei (*Morus alba*), witte klaver (*Trifolium repens*), spinazie (*Spinacia oleracea*) of ander plantaardig materiaal (Cerophyl of alfacellulose).

Incubatieomstandigheden

32. In het bovenliggende water in de testvaten wordt bij voorkeur 24 uur na toevoeging van de larven voorzichtige beluchting toegepast en gedurende de test voortgezet (waarbij erop moet worden gelet dat het gehalte aan opgeloste zuurstof niet lager wordt dan 60 % van de ASV). De beluchting vindt plaats via een glazen pasteurpipet die 2-3 cm boven de sedimentlaag wordt bevestigd (bv. één of enkele luchtbellen/s). Als vluchtige stoffen worden getest, kan worden overgewogen het sediment-watersysteem niet te beluchten.

33. De test wordt verricht bij een constante temperatuur van 20 °C (± 2 °C). Voor *C. tentans* en *C. yoshimatsui* bedraagt de aanbevolen temperatuur respectievelijk 23 °C en 25 °C (± 2 °C). Er wordt een fotoperiode van 16 uur gebruikt bij een lichtintensiteit van 500 tot 1 000 lux.

Blootstellingsduur

34. De blootstelling begint bij toevoeging van larven aan de verrijkte vaten en de controlevaten. De maximale blootstellingsduur bedraagt 28 dagen voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui*, en 65 dagen voor *C. tentans*. Als eerder muggen uitkomen, kan de test worden beëindigd nadat minimaal vijf dagen zijn verstreken na verschijning van de laatste volwassen mug in de controlegroep.

WAARNEMINGEN

Uitkomst van muggen

35. De ontwikkelingstijd en het totale aantal volledig uitgekomen mannelijke en vrouwelijke muggen worden bepaald. Mannetjes zijn gemakkelijk te herkennen aan hun veerachtige antennes.

▼M4

36. De testvaten worden ten minste drie keer per week geobserveerd om een visuele beoordeling van eventueel afwijkend gedrag te verrichten (bv. verlating van het sediment, ongewoon zwemgedrag), waarbij met de controlegroep wordt vergeleken. In de periode waarin verwacht wordt dat de muggen uitkomen, moet dagelijks een telling van de uitgekomen muggen worden verricht. Dagelijks worden het aantal volledig uitgekomen muggen en hun geslacht geregistreerd. Na identificatie worden de muggen uit de vaten verwijderd. Als er voor het eind van de test eipakketten zijn afgezet, worden deze geregistreerd en vervolgens verwijderd om te voorkomen dat opnieuw larven in het sediment terechtkomen. Ook wordt geregistreerd hoeveel zichtbare poppen niet zijn uitgekomen. Aanhangsel 5 bevat aanwijzingen voor de meting van het uitkomen.

Groei en overleving

37. Als gegevens over de overleving en groei van larven na tien dagen vereist zijn, wordt bij het begin gezorgd voor extra testvaten, die voor de voortzetting worden gebruikt. Het sediment van deze aanvullende vaten wordt door een 250 μm-zeef gevoerd, zodat de larven overblijven. De criteria voor „dood" zijn immobiliteit of geen reactie op een mechanische prikkel. Niet meer aangetroffen larven moeten als dode larven worden geteld (aan het begin van de test gestorven larven kunnen door microben zijn afgebroken). Het (asvrije) drooggewicht van de overlevende larven per testvat wordt bepaald en op grond daarvan wordt het gemiddelde individuele drooggewicht per vat berekend. Het is nuttig om te bepalen in welk stadium de overlevende larven zich bevinden; dit kan door de breedte van het epicranium van elk individu te meten.

Analytische bepalingen

Concentratie van de teststof

38. Er moeten ten minste bij de hoogste en een lagere concentratie monsters van het bovenliggende water, het poriewater en het sediment worden geanalyseerd bij het begin (bij voorkeur een uur na inbrenging van de teststof) en eind van de test. Deze bepalingen van de concentratie van de teststof leveren informatie op over het gedrag en de verdeling van de teststof in het water-sedimentsysteem. Aangezien bemonstering van het sediment bij het begin van de test van invloed kan zijn op het testsysteem (bv. doordat de testlarven worden verwijderd), moeten voor de analytische bepalingen bij het begin van de test en tijdens de test zo nodig aanvullende testvaten worden gebruikt (zie punt 39). Als in een water/sedimentstudie onder vergelijkbare omstandigheden (bv. verhouding sediment/water, soort toepassing, organischekoolstofgehalte van het sediment) de verdeling van de teststof tussen het water en het sediment duidelijk is bepaald, kunnen metingen in het sediment niet noodzakelijk zijn.

39. Wanneer tussenliggende metingen worden verricht (bv. op dag 7) en voor de analyse grotere monsters nodig zijn die niet uit de testvaten kunnen worden genomen zonder het testsysteem te beïnvloeden, worden analytische bepalingen verricht op monsters uit aanvullende testvaten die op dezelfde wijze zijn behandeld (inclusief toevoeging van testorganismen), maar niet voor biologische waarnemingen zijn gebruikt.

40. Om het poriewater te isoleren, wordt aanbevolen te centrifugeren, bijvoorbeeld 30 min bij 10 000 g en een temperatuur van 4 °C. Filtratie kan ook aanvaardbaar zijn, mits aangetoond is dat de teststof niet aan filters adsorbeert. In sommige gevallen kan analyse van de concentraties in het poriewater onmogelijk zijn doordat het monster te klein is.

▼M4

Fysisch-chemische eigenschappen

41. De pH, het gehalte aan opgeloste zuurstof in het testwater en de temperatuur van de testvaten moeten op een geschikte wijze worden gemeten (zie punt 10). De hardheid en het ammoniagehalte moeten bij het begin en het eind van de test in de controlevaten en in één testvat worden gemeten bij de hoogste concentratie.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

42. Doel van deze test is het bepalen van het effect van de teststof op het ontwikkelingstempo en het totale aantal volledig uitgekomen mannelijke en vrouwelijke muggen, of bij de tiendaagse test de effecten op de overleving en het gewicht van de larven. Als er geen aanwijzingen zijn voor een statistisch verschil in gevoeligheid tussen de geslachten, kunnen de resultaten voor mannetjes en vrouwtjes worden samengevoegd voor statistische analysen. Het verschil in gevoeligheid tussen de geslachten kan statistisch worden beoordeeld met bv. een χ^2-r × 2 -toets. Zo nodig worden na tien dagen de overleving en het gemiddelde individuele drooggewicht per vat van de larven bepaald.

43. Bij voorkeur aan de hand van de bij het begin van de test gemeten concentraties (zie punt 38) worden effectconcentraties berekend, die als concentratie in het bovenliggende water worden uitgedrukt.

44. Voor de berekening van een puntschatting voor de EC_{50} of enige andere EC_x kunnen de gegevens per vat als echte replicaties worden gebruikt. Bij de berekening van een betrouwbaarheidsinterval voor elke EC_x moet rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen vaten, tenzij wordt aangetoond dat deze verwaarloosbaar is. Wanneer voor het model de kleinstekwadratenmethode wordt toegepast, worden de gegevens per vat getransformeerd om de homogeniteit van de variantie te vergroten. Voordat de EC_x-waarden worden berekend, moet de respons echter zijn teruggetransformeerd naar de oorspronkelijke waarde.

45. Wanneer de statistische analyse dient om de NOEC/LOEC te bepalen door toetsing van een hypothese, moet rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen vaten, bv. met een geneste ANOVA. Als de gebruikelijke ANOVA-aannamen niet opgaan, kunnen robuustere tests (21) wenselijk zijn.

Uitkomstquotiënt

46. Het uitkomstquotiënt betreft een binaire respons en kan, wanneer een monotone dosisrespons wordt verwacht en de gegevens consistent zijn met die verwachting, worden geanalyseerd met de toets van Cochran-Armitage, toegepast met stapjes omlaag. Als dit niet het geval is, kan de exacte toets van Fisher of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt, met volgens Bonferroni-Holm gecorrigeerde p-waarden. Als er aanwijzingen zijn dat de variabiliteit tussen duplo's met dezelfde concentratie groter is dan een binomiale verdeling zou uitwijzen (zogeheten „extrabinomiale" variantie), moet een robuuste toets van Cochran-Armitage of een exacte toets van Fisher, zoals voorgesteld in punt 21, worden gebruikt.

47. Het aantal uitgekomen muggen per vat, n_e, wordt bepaald en gedeeld door het aantal in het vat gestopte larven, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

waarbij:

ER = uitkomstquotiënt (emergence ratio);

n_e = aantal uitgekomen muggen per vat;

n_a = aantal larven dat in één vat is gestopt.

48. Bij wijze van alternatief, dat vooral voor grote monsters geschikt is, kan, wanneer een monotone dosisrespons wordt verwacht en de gegevens over het uitkomstquotiënt consistent zijn met die verwachting, het uitkomstquotiënt in geval van extrabinomiale variantie als een continue respons worden behandeld en kunnen procedures als de toets van Williams worden gebruikt. Wanneer er geen sprake is van een monotone dosisrespons, kan de toets van Dunnett geschikt zijn. Als „grote" monsters worden hier beschouwd monsters waarvan per duplo (vat) zowel het aantal uitgekomen als het aantal niet-uitgekomen muggen groter is dan vijf.

49. Voordat ANOVA-methoden worden toegepast, moeten de waarden van het uitkomstquotiënt eerst een hoektransformatie of een freeman-tukeytransformatie ondergaan om een approximatieve normale verdeling te verkrijgen en de variantie te egaliseren. Wanneer de absolute frequenties worden gebruikt, kan de toets van Cochran-Armitage, de exacte toets van Fisher (Bonferroni) of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt. De hoektransformatie wordt uitgevoerd door de arcsinus ($\sin^{-1}$) van de vierkantswortel van het uitkomstquotiënt te nemen.

50. Voor uitkomstquotiënten worden de EC_x-waarden berekend door middel van regressieanalyse (of bv. probit (22), logit, Weibull, geschikte commerciële software enz.). Als geen regressieanalyse mogelijk is (bv. als er minder dan twee partiële responsen zijn), worden andere niet-parametrische methoden, zoals voortschrijdend gemiddelde of eenvoudige interpolatie, gebruikt.

Ontwikkelingstempo

51. Met de gemiddelde ontwikkelingstijd wordt bedoeld de gemiddelde tijd tussen het moment waarop de larven in het vat worden gestopt (dag 0 van de test) en het moment waarop de experimentele cohort muggen uitkomt (voor de berekening van de werkelijke ontwikkelingstijd moet rekening worden gehouden met de leeftijd van de larven op het moment van inbrengen). Het ontwikkelingstempo is de reciproke waarde van de ontwikkelingstijd (eenheid: dag^{-1}) en staat voor het deel van de larvenontwikkeling dat per dag plaatsvindt. Het ontwikkelingstempo heeft de voorkeur voor de evaluatie van deze sedimenttoxiciteitsstudies, omdat deze in vergelijking met de ontwikkelingstijd een kleinere variantie en een grotere homogeniteit heeft en de normale verdeling beter benadert. Daarom kunnen sterke parametrische testprocedures beter op het ontwikkelingstempo dan op de ontwikkelingstijd worden toegepast. Voor het ontwikkelingstempo als continue respons kunnen EC_x = waarden worden geschat door middel van regressieanalyse (bv. (23)(24)).

52. Bij de volgende statistische tests wordt aangenomen dat het op inspectiedag x waargenomen aantal muggen is uitgekomen in het midden van het tijdsinterval tussen dag x en dag x-*l* (*l* = lengte van het inspectie-interval, doorgaans één dag). Het gemiddelde ontwikkelingstempo per vat ($\overline{x}$) wordt als volgt berekend:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

waarbij:

$\overline{x}$: gemiddeld ontwikkelingstempo per vat;

i: index van het inspectie-interval;

m: maximumaantal inspectie-intervallen;

▼M4

f_i: in inspectie-interval i uitgekomen aantal muggen;

n_e: totaal aantal uitgekomen muggen aan het eind van de proef ($\sum f_i$)

x_i: ontwikkelingstempo van de in interval i uitgekomen muggen;

$$x_i = 1 / \left(day_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

waarbij:

day_i: inspectiedag (dagen na aanbrengen);

l_i: lengte van inspectie-interval i (dagen, gewoonlijk één dag).

Testverslag

53. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische toestand en, indien relevant, fysisch-chemische kenmerken (oplosbaarheid in water, dampspanning, verdelingscoëfficiënt in de bodem (of in sediment, indien beschikbaar), stabiliteit in water enz.);

— identificatiegegevens van de stof (triviale naam, chemische naam, structuurformule, CAS-nummer enz.) met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van de teststof.

Diersoort:

— gebruikte proefdieren: soort, wetenschappelijke naam, bron van de organismen en kweekomstandigheden;

— informatie over de hantering van eipakketten en larven;

— leeftijd van de proefdieren op het moment waarop zij in de testvaten werden gestopt.

Testomstandigheden:

— gebruikt sediment, d.w.z. natuurlijk of kunstmatig sediment;

— voor natuurlijk sediment: de locatie en beschrijving van de sedimentmonsternemingsplaats inclusief, indien mogelijk, vervuilingsgeschiedenis; eigenschappen: pH, gehalte aan organische koolstof, C/N-verhouding en korrelgrootteverdeling (indien van toepassing);

— bereiding van het kunstmatige sediment: ingrediënten en eigenschappen (gehalte aan organische koolstof, pH, vocht enz. bij het begin van de test);

— bereiding van het testwater (bij gebruik van synthetisch water) en eigenschappen (zuurstofgehalte, pH, geleidbaarheid, hardheid enz. bij het begin van de test);

— dikte van de sedimentlaag en diepte van het bovenliggende water;

— volume van het bovenliggende en poriewater; gewicht van het natte sediment met en zonder poriewater;

— testvaten (materiaal en afmetingen);

— bereidingswijze van stamoplossingen en testconcentraties;

▼M4

— aanbrenging van de teststof: toegepaste testconcentraties, aantal duplo's en eventueel gebruik van oplosmiddel;

— incubatieomstandigheden: temperatuur, lichtcyclus en -intensiteit, belichting (frequentie en intensiteit);

— details over het voedsel, met inbegrip van soort voedsel, bereiding, hoeveelheid en voederregime.

Resultaten:

— de nominale testconcentraties, de gemeten testconcentraties en de resultaten van alle analysen die zijn verricht om de concentratie van de teststof in het testvat te bepalen;

— kwaliteit van het water in de testvaten, d.w.z. pH, temperatuur, opgeloste zuurstof, hardheid en ammonia;

— vervanging van verdampt testwater, indien van toepassing;

— aantal uitgekomen mannelijke en vrouwelijke muggen per vat en per dag;

— aantal niet tot mug ontwikkelde larven per vat;

— gemiddeld individueel drooggewicht van de larven per vat, en per stadium, indien van toepassing;

— percentage uitgekomen muggen per vat en testconcentratie (mannelijke en vrouwelijke muggen gecombineerd);

— gemiddeld ontwikkelingstempo van volledig uitgekomen muggen per duplo en behandeling (mannelijke en vrouwelijke muggen gecombineerd);

— schattingen van toxische eindpunten, bv. EC_x (met bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen), NOEC en/of LOEC, en de statistische methoden waarmee zij zijn bepaald;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van een eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen.

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Voor de toepassing van deze methode wordt verstaan onder:

Kunstmatig sediment (ook wel bereid, gereconstitueerd of synthetisch sediment genoemd): een mengsel van materialen waarmee de fysische bestanddelen van natuurlijk sediment worden nagebootst.

Bovenliggend water: het water dat in het testvat op het sediment wordt gegoten.

Poriewater (ook wel interstitieel water genoemd): het water in de ruimten tussen de sediment- en bodemdeeltjes.

Verrijkt water: testwater waaraan teststof is toegevoegd.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M4

Aanhangsel 2

Aanbevelingen voor de kweek van *Chironomus riparius*

1. Larven van *Chironomus* kunnen worden gekweekt in kristalliseerschalen of grotere houders. Op de bodem van de houder wordt een 5 tot 10 mm dikke laag fijn kwartszand gestrooid. Ook kiezelgoer (bv. Merck, Art 8117) is geschikt gebleken als substraat (in dat geval volstaat een dunnere laag van slechts enkele mm). Vervolgens wordt een enkele cm diepe laag geschikt water toegevoegd. Om verdampingsverliezen te compenseren en uitdroging te voorkomen, worden de waterniveaus zo nodig aangevuld. Indien nodig kan het water worden vervangen. Er wordt voorzichtige beluchting toegepast. De larvenkweekvaten worden in een geschikte kooi geplaatst, zodat de volwassen muggen niet kunnen ontsnappen. De kooi moet groot genoeg zijn om de uitgekomen volwassen muggen te laten zwermen, omdat anders mogelijk niet wordt gecopuleerd (ten minste ca. 30 × 30 × 30 cm).

2. De kooien worden op kamertemperatuur of in een kamer met een constant klimaat bij 20 ± 2 °C gehouden, met een lichtregime van 16 uur licht (intensiteit ca. 1 000 lux), 8 uur donker. Gerapporteerd is dat een relatieve luchtvochtigheid van minder dan 60 % de voortplanting kan belemmeren.

Verdunningswater

3. Elk geschikt natuurlijk of synthetisch water kan worden gebruikt. Gebruikelijk zijn bronwater, ontchloord kraanwater en kunstmatige media (bv. Elendt-media M4 en M7, zie hieronder). Voor gebruik moet het water worden belucht. Indien nodig kan het kweekwater worden ververst door voorzichtig het gebruikte water uit de kweekvaten te gieten of hevelen zonder de larvenhulzen te beschadigen.

Toediening van voedsel aan larven

4. De larven van *Chironomus* worden dagelijks gevoerd met ongeveer 250 mg visvoervlokken (TetraMin®, TetraPhyll® of een soortgelijk merk visvoer) per vat. Dit voer kan worden gegeven als droog gemalen poeder of als suspensie in water: aan 20 ml verdunningswater wordt 1,0 g voedervlokken toegevoegd en gemengd, zodat een homogeen mengsel ontstaat. Van dit mengsel kan ongeveer 5 ml per vat per dag worden gebruikt (schudden voor gebruik). Aan oudere larven kan meer voer worden gegeven.

5. Het voedsel wordt aangepast op basis van de waterkwaliteit. Als het kweekmedium troebel wordt, wordt de hoeveelheid voedsel verminderd. De toediening van voedsel moet zorgvuldig worden geobserveerd. Als te weinig voer wordt gegeven, zullen de larven naar de waterkolom uitwijken; als te veel voer wordt gegeven, neemt de microbiële activiteit toe en daalt het zuurstofgehalte. Beide condities kunnen tot lagere groeisnelheden leiden.

6. Wanneer nieuwe kweekvaten worden ingericht, kunnen ook enige cellen van groene algen (bv. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) worden toegevoegd.

Toediening van voedsel aan uitgekomen volwassen muggen

7. Enkele onderzoekers hebben erop gewezen dat een in een sacharoseoplossing gedrenkt wattenschijfje als voedsel kan dienen voor uitgekomen volwassen muggen.

▼M4

Uitkomst van muggen

8. In de larvenkweekvaten zullen zich bij 20 ± 2 °C na ongeveer 13-15 dagen volwassen muggen ontwikkelen. Mannetjes zijn gemakkelijk te herkennen aan hun veerachtige antennes.

Eipakketten

9. Zodra in de kweekkooi volwassen muggen aanwezig zijn, worden alle larvenkweekvaten drie keer per week gecontroleerd op afgezette geleiachtige eipakketten. Als eipakketten aanwezig zijn, worden zij voorzichtig verwijderd. Zij worden overgebracht naar een klein schaaltje met een monster van het kweekwater. De eipakketten worden gebruikt om een nieuw kweekvat te beginnen (bv. 2-4 eipakketten per vat) of worden voor toxiciteitstests gebruikt.

10. Larven in het eerste stadium moeten na twee-drie dagen uitkomen.

Inrichting van nieuwe kweekvaten

11. Zodra kweken zijn opgezet, moet het mogelijk zijn één keer per week, of minder vaak naargelang de testvoorschriften, een vers larvenkweekvat in te richten, waarbij de oudere vaten worden verwijderd nadat zich volwassen muggen hebben ontwikkeld. Dit systeem zorgt voor een regelmatige aanvoer van volwassen muggen met een minimum aan beheer.

Bereiding van de testoplossingen M4 en M7

12. Elendt (1990) heeft het medium M4 beschreven. Het medium M7 wordt op dezelfde wijze als M4 bereid, maar met een vier keer zo lage concentratie van de in tabel 1 vermelde stoffen. Er is een publicatie over het medium M7 in voorbereiding (persoonlijk medegedeeld door Elendt). De testoplossing mag niet volgens Elendt en Bias (1990) worden bereid, omdat de voor de stamoplossingen vermelde concentraties van $NaSiO_3$ $5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 en K_2HPO_4 niet geschikt zijn.

Bereiding van het medium M7

13. Elke stamoplossing (I) wordt apart bereid en met deze stamoplossingen (I) wordt een gecombineerde stamoplossing (II) bereid (zie tabel 1). Het medium M7 wordt bereid uit 50 ml gecombineerde stamoplossing (II) en de in tabel 2 vermelde hoeveelheden van elke stamoplossing van macronutriënten en tot 1 liter gedeïoniseerd water aangevuld. Een vitaminestamoplossing wordt bereid door overeenkomstig tabel 3 drie vitaminen toe te voegen aan gedeïoniseerd water; kort voor gebruik wordt 0,1 ml van de gecombineerde vitaminestamoplossing aan het definitieve medium M7 toegevoegd (de vitaminestamoplossing wordt in bevroren toestand in kleine porties bewaard.) Het medium wordt belucht en gestabiliseerd.

Tabel 1

Stamoplossingen van spoorelementen voor de media M4 en M7

Stamoplossingen (I)	Hoeveelheid (mg) aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water	Gecombineerde stamoplossing (II) bereiden door de volgende hoeveelheden (ml) van de stamoplossingen (I) te mengen en tot 1 liter gedeïoniseerd water aan te vullen		Uiteindelijke concentraties in testoplossingen (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Stamoplossingen (I)	Hoeveelheid (mg) aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water	Gecombineerde stamoplossing (II) bereiden door de volgende hoeveelheden (ml) van de stamoplossingen (I) te mengen en tot 1 liter gedeïoniseerd water aan te vullen		Uiteindelijke concentraties in testoplossingen (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Deze stoffen zijn verschillend voor M4 en M7, zoals hierboven is aangegeven.
(2) Deze oplossingen worden apart bereid, vervolgens samengevoegd en onmiddellijk in een autoclaaf behandeld.

Tabel 2

Stamoplossingen van macronutriënten voor de media M4 en M7

	Hoeveelheid aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water (mg)	Hoeveelheid stamoplossing van macronutriënten die wordt toegevoegd om de media M4 en M7 te bereiden (ml/l)	Uiteindelijke concentraties in de testoplossingen M4 en M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabel 3

Vitaminestamoplossing voor de media M4 en M7

De drie vitamineoplossingen worden tot één vitaminestamoplossing samengevoegd.

	Hoeveelheid aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water (mg)	Hoeveelheid vitaminestamoplossing die wordt toegevoegd om de media M4 en M7 te bereiden (ml/l)	Uiteindelijke concentraties in de testoplossingen M4 en M7 (mg/l)
Thiaminehydrochloride	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

LITERATUUR:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Aanhangsel 3

BEREIDING VAN KUNSTMATIG SEDIMENT

Samenstelling van het sediment

Het kunstmatige sediment wordt als volgt samengesteld:

Bestanddeel	Eigenschappen	% van het sediment (drooggewicht)
Turf	Veenmosturf, zo dicht mogelijk bij pH 5,5-6,0, zonder zichtbare plantenresten, fijngemalen (deeltjesgrootte ≤ 1 mm) en aan de lucht gedroogd	4-5
Kwartszand	Korrelgrootte: > 50 % van de deeltjes moet binnen het bereik 50-200 µm liggen	75-76
Kaolienklei	Met ≥ 30 % kaoliniet	20
Organische koolstof	Aangepast door toevoeging van turf en zand	2 (± 0,5)
Calciumcarbonaat	$CaCO_3$, poedervormig, chemisch zuiver	0,05-0,1
Water	Geleidbaarheid ≤ 10 µS/cm	30-50

Bereiding

De turf wordt aan de lucht gedroogd en tot een fijn poeder vermalen. Er wordt een suspensie van de vereiste hoeveelheid turfpoeder in gedeïoniseerd water bereid met een kwalitatief hoogwaardig homogeniseerapparaat. De pH van deze suspensie wordt met $CaCO_3$ aangepast tot 5,5 ± 0,5. De suspensie wordt ten minste twee dagen lang onder zachtjes roeren bij 20 ± 2 °C geconditioneerd om de pH te stabiliseren en een stabiele microbiële component te verkrijgen. De pH wordt opnieuw gemeten en moet nu 6,0 ± 0,5 bedragen. Vervolgens wordt de turfsuspensie met de andere bestanddelen (zand en kaolienklei) en gedeïoniseerd water vermengd om een homogeen sediment te verkrijgen met een watergehalte van 30-50 % van het drooggewicht van het sediment. De pH van het uiteindelijke mengsel wordt nogmaals gemeten en zo nodig met $CaCO_3$ tot 6,5-7,5 aangepast. Er worden monsters van het sediment genomen om het drooggewicht en het gehalte aan organische koolstof te bepalen. Aanbevolen wordt het kunstmatige sediment, voordat het in een test ter bepaling van de toxiciteit voor *Chironomidae* wordt gebruikt, zeven dagen te laten rusten onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen.

Opslag

De droge bestanddelen voor de bereiding van het kunstmatige sediment kunnen op een droge en koele plaats bij kamertemperatuur worden bewaard. Het kunstmatige (natte) sediment mag niet worden opgeslagen voordat het in de test wordt gebruikt. Het moet onmiddellijk na afloop van de zevendaagse conditioneringsperiode die de bereiding afsluit, worden gebruikt.

LITERATUUR:

Hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Aanhangsel 4

Chemische eigenschappen van aanvaardbaar verdunningswater

Stof	Concentraties
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Hardheid uitgedrukt als $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Restchloorgehalte	< 10 µg/l
Totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

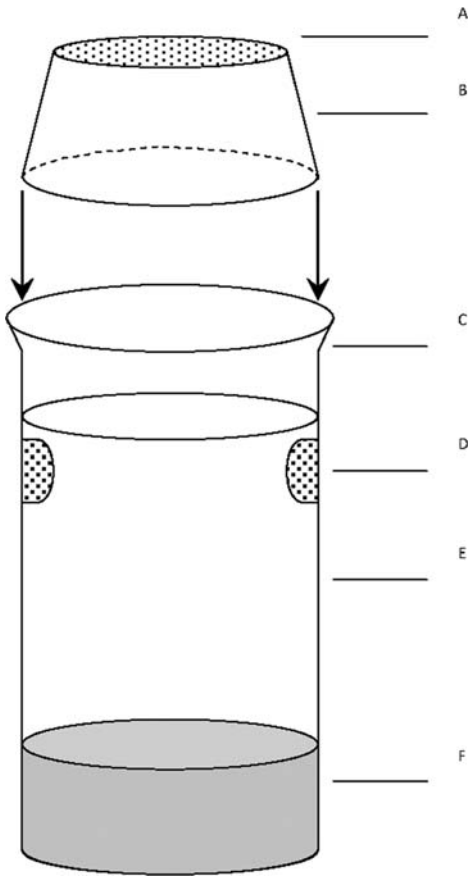
(*) Opgemerkt zij echter dat als er een interactie tussen de hardheidsionen en de teststof wordt vermoed, water met een lagere hardheid moet worden gebruikt (dan is Elendt-medium M4 dus ongeschikt).

▼M4

Aanhangsel 5

Richtsnoeren voor de monitoring van het uitkomen van larven van *Chiromidae*

Op de testglazen worden „emergence traps” geplaatst. Deze vallen zijn vanaf dag 20 tot het eind van de test nodig. Onderstaande tekening toont een voorbeeld van een gebruikte val:



A: nylon hor

B: omgekeerde kunststofbekers

C: bekerglas zonder tuit

D: openingen met hor voor wateruitwisseling

E: water

F: sediment

▼M4

C.29. GEMAKKELIJKE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID — CO_2 IN GESLOTEN VATEN (GASRUIMTETEST)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 310 (2006) van de OESO (TG 310). Deze testmethode is een schiftingsproef voor de beoordeling van de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid van chemische stoffen en biedt soortgelijke informatie als de zes testmethoden die in hoofdstuk C.4 A tot en met F van deze bijlage worden beschreven. Derhalve kan een chemische stof waarvoor bij deze testmethode positieve resultaten worden geregistreerd, worden beschouwd als gemakkelijk biologisch afbreekbaar en daarom ook als snel afbreekbaar in het milieu.

2. De erkende koolstofdioxidemethode (CO_2-methode) (1), op basis van de oorspronkelijke Sturm-test (2) voor het beoordelen van de biologische afbreekbaarheid van organische chemische stoffen, waarbij het door microbiële activiteit geproduceerde koolstofdioxide wordt gemeten, is gewoonlijk de eerste keuze voor het testen van slecht oplosbare chemische stoffen en sterk adsorberende stoffen. Deze test wordt ook gekozen voor oplosbare (maar niet vluchtige) chemische stoffen, aangezien de ontwikkeling van koolstofdioxide door velen wordt beschouwd als het enige ondubbelzinnige bewijs van microbiële activiteit. De verwijdering van opgeloste organische koolstof kan worden bereikt door fysisch-chemische processen — adsorptie, vervluchtiging, neerslaan, hydrolyse — evenals door microbiële activiteit. Ook vele niet-biologische reacties verbruiken zuurstof; slechts zelden wordt CO_2 op een abiotische manier geproduceerd uit organische chemische stoffen. In de oorspronkelijke en gewijzigde Sturm-test (1)(2) wordt CO_2 verwijderd uit de vloeibare fase naar de absorptievaten door middel van uitwassen (d.w.z. met luchtbellen die behandeld zijn om CO_2 uit het vloeibare medium te verwijderen), terwijl CO_2 in de versie van Larson (3)(4) wordt overgebracht van het reactievat naar de absorptievaten door CO_2-vrije lucht door de gasruimte te blazen en daarbij het testvat continu te schudden. Enkel in de gewijzigde versie van Larson wordt het reactievat geschud, terwijl roeren uitsluitend wordt gespecificeerd voor onoplosbare stoffen in ISO 9439 (5) en in de oorspronkelijke Amerikaanse versie (6), waarbij beide versies uitwassen in plaats van gasruimtevervanging specificeren. In een andere officiële Amerikaanse EPA-methode (7) op basis van de methode van Gledhill (8) wordt het reactievat geschud en afgesloten voor de atmosfeer. Het geproduceerde CO_2 wordt rechtstreeks uit de gasvormige fase verzameld in een interne alkalische afscheider, zoals in de klassieke respirometerkolven van Warburg/Barcroft.

3. Echter, aangetoond is dat anorganische koolstof (IC) zich ophoopt in het medium tijdens de toepassing van de standaard-, gewijzigde Sturm-test bij een aantal chemische stoffen (9). Een IC-concentratie van niet minder dan 8 mg/l werd aangetroffen tijdens de afbraak van 20 mg C/l aniline. Dit betekent dat de verzameling van CO_2 in de alkalische afscheiders geen waarheidsgetrouwe weerspiegeling was van de hoeveelheid CO_2 die op microbiologische wijze werd geproduceerd op tussentijdse momenten tijdens de afbraak. Bijgevolg zal de specificatie dat > 60 % van de theoretische maximale CO_2-productie ($ThCO_2$) moet worden verzameld binnen een „tiendagenvenster” (de tien dagen die onmiddellijk volgen op het bereiken van de biologische afbreekbaarheid van 10 %) om een teststof in te delen als gemakkelijk biologisch afbreekbaar, niet bereikt worden voor bepaalde chemische stoffen die die indeling wel zouden krijgen bij toepassing van de verwijderingsmethode met opgeloste organische koolstof (DOC).

4. Als het percentage afbraak lager is dan verwacht, is mogelijk sprake van opeenhoping van anorganische koolstof in de testoplossing. In dergelijke gevallen kan gebruik worden gemaakt van de andere tests op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.

▼M4

5. Andere nadelen van de Sturm-methodologie (omslachtig, tijdrovend, grotere kans op toevallige fouten en niet toepasbaar op vluchtige chemische stoffen) waren eerder aanleiding om te zoeken naar een techniek voor gesloten vaten, anders dan die van Gledhill, in plaats van doorblazen met gas (10)(11). Boatman *et al.* (12) hebben de vroegere methoden beoordeeld en gekozen voor een systeem met een gesloten gasruimte, waarin het CO_2 aan het eind van de incubatie door middel van aanzuren van het medium vrijkwam in de gasruimte. CO_2 werd gemeten door middel van gaschromatografie (GC)/IC-analyse in automatisch genomen monsters van de gasruimte, maar er werd geen rekening gehouden met opgeloste anorganische koolstof (DIC) in de vloeibare fase. Ook waren de gebruikte vaten zeer klein (20 ml) en bevatten ze slechts 10 ml medium, wat tot problemen leidde, bv. bij het toevoegen van de noodzakelijkerwijs zeer kleine hoeveelheden onoplosbare teststoffen. Ook is het mogelijk dat in het geënte medium onvoldoende of geen micro-organismen aanwezig waren die in staat waren om te zorgen voor de afbraak van de teststoffen.

6. Deze moeilijkheden zijn overwonnen door de onafhankelijke onderzoeken van Struijs en Stoltenkamp (13) en van Birch en Fletcher (14), waarbij laatstgenoemden geïnspireerd werden door hun ervaringen met apparatuur die was gebruikt in de test op anaerobe biologische afbreekbaarheid (15). In de eerstgenoemde methode (13) werd CO_2 gemeten in de gasruimte na aanzuren en equlibratie, terwijl in de laatstgenoemde methode (14) DIC werd gemeten in zowel de gas- als de vloeibare fase, zonder behandeling met teststof; meer dan 90 % van het geproduceerde IC was aanwezig in de vloeibare fase. Beide methoden hebben voordelen ten opzichte van de Sturm-test in de zin dat het testsysteem compacter en beter hanteerbaar is, ook vluchtige chemische stoffen getest kunnen worden en de mogelijkheid van vertraging in het meten van het geproduceerde CO_2 wordt voorkomen.

7. De twee methoden werden gecombineerd in de ISO-norm voor CO_2 in gasruimten (16), die werd onderworpen aan een ringtest (17), en dit is de norm die de basis vormt van de onderhavige testmethode. Zo ook zijn de twee methoden in de Amerikaanse EPA-methode (18) toegepast. Twee methoden voor het meten van CO_2 zijn aanbevolen, namelijk CO_2 in de gasruimte na aanzuren (13) en IC in de vloeibare fase na toevoeging van een overmaat alkali. De laatstgenoemde methode werd geïntroduceerd door Peterson tijdens de CONCAWE-ringtest (19) van deze gasruimtemethode, in een gewijzigde vorm om inherente biologische afbreekbaarheid te meten. De wijzigingen die zijn doorgevoerd in de herziening van 1992 (20) van de in hoofdstuk C.4 van deze bijlage over gemakkelijke biologische afbreekbaarheid beschreven methoden zijn in de onderhavige testmethode geïntegreerd, zodat de omstandigheden (medium, duur enz.) voor het overige dezelfde zijn als in de herziene Sturm-test (20). Birch en Fletcher (14) hebben aangetoond dat met deze gasruimtetest testresultaten werden bereikt die zeer vergelijkbaar waren met de resultaten die werden behaald met dezelfde chemische stoffen in de OESO-ringtest (21) van de herziene testmethoden.

PRINCIPE VAN DE TEST

8. De teststof, doorgaans 20 mg C/l, zijnde de enige bron van koolstof en energie, wordt geïncubeerd in een uit anorganische bufferzouten bestaand medium, dat geënt is met een gemengde populatie micro-organismen. De test wordt uitgevoerd in gesloten flessen met bovenin een gasruimte met lucht, die een reservoir van zuurstof voor aerobe biologische afbraak vormt. De CO_2-ontwikkeling die het gevolg is van de totale aerobe biologische afbraak van de teststof wordt bepaald door de overmaat aan IC te meten die wordt geproduceerd in de testflessen in vergelijking met de hoeveelheid IC die wordt geproduceerd in blanco vaten die uitsluitend geënt medium bevatten. De mate van afbraak wordt uitgedrukt als een percentage van de theoretische maximale productie van anorganische koolstof (ThIC), op basis van de hoeveelheid teststof (als organische koolstof) die in eerste instantie werd toegevoegd.

9. De verwijdering van DOC en/of de mate van primaire biologische afbraak van de teststof kan eveneens worden gemeten (20).

▼M4

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

10. Het gehalte aan organische koolstof (gewichtspercent) van de teststof moet bekend zijn, hetzij op basis van de chemische structuur ervan hetzij door het te meten, zodat de procentuele afbraak kan worden berekend. Voor vluchtige teststoffen is een gemeten of berekende constante van de wet van Henry nuttig voor het bepalen van een geschikte verhouding van de gasruimte tot het vloeistofvolume. Informatie over de toxiciteit van de teststof voor micro-organismen is nuttig voor het kiezen van de juiste testconcentratie en voor het interpreteren van resultaten die op slechte biologische afbreekbaarheid duiden: aanbevolen wordt om de inhibitietest uit te voeren, tenzij bekend is dat de teststof geen inhibitoir effect heeft op microbiële activiteiten (zie punt 24).

TOEPASBAARHEID VAN DE METHODE

11. De test is toepasbaar op in water oplosbare en onoplosbare teststoffen, hoewel een goede dispersie van de teststof moet worden gewaarborgd. Met gebruikmaking van de aanbevolen verhouding tussen gasruimte en vloeistofvolume van 1:2 kunnen vluchtige chemische stoffen met een constante van de wet van Henry van maximaal 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ worden getest, aangezien het aandeel van de teststof in de gasruimte niet meer zal zijn dan 1 % (13). Een kleinere gasruimte kan worden gebruikt voor het testen van chemische stoffen met een hogere vluchtigheid, maar hun biobeschikbaarheid kan beperkend zijn, met name indien ze slecht oplosbaar zijn in water. Echter, gebruikers moeten waarborgen dat de verhouding tussen de gasruimte en het vloeistofvolume en de teststofconcentratie dusdanig zijn dat voldoende zuurstof beschikbaar is om volledige aerobe biologische afbraak te kunnen doen plaatsvinden (d.w.z. vermijd het gebruik van een hoge substraatconcentratie en een klein gasruimtevolume). Richtsnoeren hiervoor zijn te vinden in (13)(23).

REFERENTIESTOFFEN

12. Ter controle van de testprocedure moet een referentiestof met een bekende biologische afbreekbaarheid tegelijkertijd worden getest. Hiervoor kunnen aniline, natriumbenzoaat of ethyleenglycol worden gebruikt bij het testen van in water oplosbare teststoffen en 1-octanol bij het testen van slecht oplosbare teststoffen (13). De biologische afbraak van deze stoffen moet binnen 14 dagen > 60 % ThIC bereiken.

REPRODUCEERBAARHEID

13. In de ISO-ringtest van de methode (17) werden de volgende resultaten behaald met gebruikmaking van de aanbevolen omstandigheden, met inbegrip van 20 mg C teststof/l.

Teststof	Gemiddelde procentuele biologische afbraak (28d)	Variatiecoëfficiënt (%)	Aantal laboratoria
Aniline	90	16	17
1-octanol	85	12	14

De intertestvariabiliteit (repliceerbaarheid), met gebruikmaking van aniline, was laag met variabiliteitscoëfficiënten van maximaal 5 % in bijna iedere uitvoering van de test. In de twee gevallen waarin de repliceerbaarheid slechter was, was de grotere variabiliteit waarschijnlijk te wijten aan een hoge IC-productie in de blanco vaten. De repliceerbaarheid was slechter met 1-octanol, maar was nog steeds minder dan 10 % voor 79 % van de test-uitvoeringen. Deze grotere intertestvariabiliteit kan veroorzaakt zijn door doseerfouten, aangezien een klein volume (3 tot 4 µl) 1-octanol in afgesloten testflessen moest worden gespoten. Het gebruik van lagere concentraties teststof zou hebben geresulteerd in hogere variantiecoëfficiënten, in het bijzonder bij concentraties van minder dan 10 mg C/l. Dit kon gedeeltelijk worden verholpen door de concentratie van de totale hoeveelheid anorganische koolstof (TIC) in het entmateriaal te verminderen.

▼M4

14. In een EU-ringtest (24) van vijf oppervlakteactieve stoffen die werden toegevoegd in een concentratie van 10 mg C/l werden de volgende resultaten behaald:

Teststof	Gemiddelde procentuele biologische afbraak (28d)	Variatiecoëfficiënt (%)	Aantal laboratoria
Tetrapropyleen Benzeensulfonaat	17	45	10
Di-iso-octylsulfo-succinaat (anionisch)	72	22	9
Hexadecyl-trimethyl (*) Ammoniumchloride (kationisch)	75	13	10
Isononylfenol-(ethoxylaat)$_9$ (niet-ionisch)	41	32	10
Cocoamidepropyl Dimethylhydroxy Sulfobetaïne (amfoteer)	60	23	11

(*) SiO_2 werd toegevoegd om de toxiciteit te neutraliseren.

Uit de resultaten blijkt in het algemeen dat de variabiliteit hoger was voor de minder goed afgebroken oppervlakteactieve stoffen. De intertestvariabiliteit was minder dan 15 % voor meer dan 90 % van de gevallen, met als hoogste 30-40 %.

NOOT: De meeste oppervlakteactieve stoffen zijn geen soorten die uit één molecuul bestaan, maar zijn mengsels van isomeren, homologen enz., die na verschillende vertragingsperioden worden afgebroken en met verschillende kinetische snelheden, wat resulteert in „vage”, uitgerekte curven, zodat de waarde van 60 % die nodig is om de test te doorstaan mogelijk niet gehaald wordt binnen „het tiendagenvenster”, ondanks het feit dat iedere individuele moleculaire soort binnen tien dagen > 60 % zou behalen, indien afzonderlijk getest. Dit kan ook worden waargenomen bij andere complexe mengsels.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

15. Gewone laboratoriumapparatuur en:

a) glazen serumflessen, afgesloten met stoppen van butylrubber en aluminium krimpsluitingen. De aanbevolen maat is „125 ml” met een totaal volume van ongeveer 160 ml (in dit geval moet het bekende volume van elke fles 160 ± 1 ml zijn). Een kleinere maat fles mag worden gebruikt, indien de resultaten voldoen aan de in de punten 66 en 67 omschreven voorwaarden;

b) koolstofanalyseapparaat of ander instrument (bv. gaschromatograaf) voor het meten van anorganische koolstof;

▼M4

c) hoogprecisie-injectienaalden voor gasvormige en vloeibare monsters;

d) rondschudapparaat in een omgeving met temperatuurregeling;

e) een voorraad CO_2-vrije lucht — deze kan worden verkregen door lucht door natriumkalkkorrels te leiden of door gebruik te maken van een gasmengsel bestaande uit 80 % N_2/20 % O_2 (facultatief) (zie punt 28);

f) membraanfiltratieapparaat met een porositeit van 0,20-0,45 μm (facultatief);

g) analyseapparaat voor organische koolstof (facultatief).

Reagentia

16. Er wordt steeds gebruikgemaakt van reagentia pro analysi.

Water

17. Gedestilleerd of gedeïoniseerd water moet worden gebruikt met daarin een concentratie van ≤ 1 mg/l als totale organische koolstof. Dit vertegenwoordigt ≤ 5 % van het initiële gehalte aan organische koolstof dat werd geïntroduceerd door de aanbevolen dosis van de teststof.

Stamoplossingen voor het uit anorganische zouten bestaande medium

18. De stamoplossingen en het uit anorganische zouten bestaande medium zijn vergelijkbaar met die in ISO 14593 (16) en de in C.4 beschreven tests op de „gemakkelijke biologische afbreekbaarheid" (20). Het gebruik van een hogere concentratie ammoniumchloride (2,0 g/l in plaats van 0,5 g/l) zou enkel in zeer uitzonderlijke gevallen nodig moeten zijn, bv. als de teststofconcentratie > 40 mg C/l is. Stamoplossingen moeten gekoeld worden bewaard en na zes maanden als afval worden verwijderd, tenzij bewijs van neerslaan of microbiële groei bestaat. De volgende stamoplossingen worden bereid:

a) kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4) 8,50 g

dikaliumwaterstoffosfaat (K_2HPO_4) 21,75 g

dinatriumwaterstoffosfaatdihydraat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

ammoniumchloride (NH_4Cl) 0,50 g

In water oplossen en tot 1 liter aanvullen. De pH van deze oplossing moet 7,4 (± 0,2) zijn. Als dit niet het geval is, moet een nieuwe oplossing worden bereid;

b) calciumchloridedihydraat ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

In water oplossen en tot 1 liter aanvullen;

c) magnesiumsulfaatheptahydraat ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

In water oplossen en tot 1 liter aanvullen;

d) ijzer(III)chloridehexahydraat ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

In water oplossen en tot 1 liter aanvullen en één druppel geconcentreerde HCl toevoegen.

Bereiding van anorganisch medium

19. 10 ml van oplossing a) wordt gemengd met ongeveer 800 ml water (punt 17), daaraan wordt vervolgens 1 ml van de oplossingen b), c) en d) toegevoegd en het geheel wordt met water aangevuld tot 1 liter (punt 17).

Andere reagentia

20. Geconcentreerd orthofosforzuur (H_3PO_4) (> 85 % massa per volume).

▼M4

Natriumhydroxideoplossing 7M

21. 280 g natriumhydroxide (NaOH) wordt opgelost in 1 liter water (punt 17). De concentratie DIC van deze oplossing wordt bepaald en deze waarde wordt in acht genomen bij het berekenen van het testresultaat (zie de punten 55 en 61), met name in het licht van het geldigheidscriterium in punt 66, onder b). Indien de concentratie DIC te hoog is, wordt een verse oplossing bereid.

Teststof

22. Er wordt een stamoplossing van een voldoende in water oplosbare teststof in water (punt 17) of in het testmedium (punt 19) bereid, in een concentratie die bij voorkeur 100 maal groter is dan de uiteindelijke concentratie die in de test zal worden gebruikt; het kan nodig zijn de pH van de stamoplossing aan te passen. De stamoplossing moet worden toegevoegd aan het anorganische medium om een definitieve concentratie organische koolstof tussen 2 en 40 mg C/l te bereiken, bij voorkeur 20 mg C/l. Als lagere concentraties worden gebruikt, kan de verkregen precisie onvoldoende zijn. Oplosbare en onoplosbare vloeibare chemische stoffen kunnen rechtstreeks aan de vaten worden toegevoegd met behulp van hoogprecisie-injectienaalden. Voor slecht oplosbare en onoplosbare teststoffen is mogelijk een speciale behandeling nodig (25). De keuzes zijn:

a) rechtstreeks toevoegen van bekende gewogen hoeveelheden;

b) ultrasone dispersie vóór toevoeging;

c) dispersie met behulp van emulgeermiddelen, waarvan vóór toevoeging vastgesteld moet worden of ze inhibitoire of stimulerende effecten hebben op microbiële activiteit;

d) adsorptie van vloeibare teststoffen of van een oplossing in een geschikt vluchtig oplosmiddel aan een inert medium of hulpmiddel (bv. glasvezelfilter), gevolgd door verdamping van het oplosmiddel, indien gebruikt, en rechtstreekse toevoeging van bekende hoeveelheden;

e) toevoeging van een bekend volume van een oplossing van de teststof in een zeer vluchtig oplosmiddel aan een leeg testvat, gevolgd door verdamping van het oplosmiddel.

Agentia of oplosmiddelen die in c), d) en e) worden gebruikt, moeten worden getest op een eventueel stimulerend of inhibitoir effect op microbiële activiteit (zie punt 42, onder b)).

Referentiestof

23. Een stamoplossing van de (oplosbare) referentiestof wordt bereid in water (punt 17) in een concentratie van bij voorkeur 100 maal de definitieve concentratie die zal worden gebruikt (20 mg C/l) in de test.

Inhibitiecontrole

24. Teststoffen vertonen vaak geen significante afbraak onder de omstandigheden die heersen bij beoordelingen van de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid. Een mogelijke oorzaak is dat de teststof in de in de test gebruikte concentratie een inhibitoir effect op het entmateriaal heeft. Een inhibitiecontrole kan in de testopzet worden opgenomen om de identificatie (achteraf) van inhibitie als een mogelijke oorzaak of bijdragende factor te vergemakkelijken. De inhibitiecontrole kan ook worden gebruikt om dergelijke interferenties uit te sluiten en aan te tonen dat de ontbrekende of geringe afbraak uitsluitend moet worden toegeschreven aan niet-vatbaarheid voor microbiële aanvallen onder de testomstandigheden. Om informatie te verkrijgen over de toxiciteit van de teststof voor (aerobe) micro-organismen wordt een oplossing bereid in het testmedium die de teststof en de referentiestof bevat (punt 19), elk in dezelfde respectieve concentraties als de toegevoegde concentraties (zie de punten 22 en 23).

▼M4

Entmateriaal

25. Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn: actief slib; (chloorvrij) behandeld water; oppervlaktewater en grond; of een mengsel daarvan (20). De afbraakactiviteit van de bron moet worden gecontroleerd door gebruik te maken van een referentiestof. Ongeacht de bron mogen micro-organismen die eerder aan de teststof zijn blootgesteld niet worden gebruikt, indien de procedure gebruikt wordt als een test op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.

Waarschuwing: Actief slib, rioolwater en behandeld water bevatten ziekteverwekkende organismen en moeten voorzichtig worden gehanteerd.

26. De ervaring leert dat het optimale volume voor het entmateriaal het volume is dat:

— voldoende is om te zorgen voor toereikende biologische afbraakactiviteit;

— de referentiestof afbreekt met het voorgeschreven percentage (zie punt 66);

— resulteert in 10^2 tot 10^5 kolonievormende eenheden per milliliter in het uiteindelijke mengsel;

— normaal resulteert in een concentratie van 4 mg/l gesuspendeerde vaste stoffen in het uiteindelijke mengsel bij het gebruik van actief slib; concentraties van maximaal 30 mg/l kunnen worden gebruikt, maar deze kunnen leiden tot een significant hogere productie van CO_2 in de blanco vaten (26);

— minder bijdraagt dan 10 % van de initiële concentratie van organische koolstof die door de teststof werd geïntroduceerd;

— in het algemeen 1-10 ml entmateriaal is voor 1 liter testoplossing.

Actief slib

27. Uit de beluchtingstank van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afval verwerkt, wordt vers actief slib verzameld. Indien nodig kunnen grove deeltjes door te zeven worden verwijderd (bv. door gebruik te maken van een zeef met mazen van 1 mm^2) en het slib moet aeroob worden gehouden, totdat het wordt gebruikt.

28. Ook kan het slib, na verwijdering van eventuele grove deeltjes, worden bezonken of gecentrifugeerd (bv. 1 100 × g gedurende 10 minuten). De bovendrijvende vloeistof wordt als afval verwijderd. Het slib kan worden gewassen in de oplossing van mineralen. Het geconcentreerde slib wordt in anorganisch medium gesuspendeerd tot een concentratie van 3-5 g gesuspendeerde vaste stof/l en vervolgens belucht tot het tijdstip van gebruik.

29. Slib moet afkomstig zijn van een correct werkende conventionele zuiveringsinstallatie. Als slib afkomstig is van een installatie met hoge omloopsnelheid, of geacht wordt remmers te bevatten, dient het te worden gewassen. Het opnieuw gesuspendeerde slib wordt na grondig mengen bezonken of gecentrifugeerd, de bovendrijvende vloeistof wordt als afval verwijderd en het gewassen slib wordt in een volgend volume anorganisch medium opnieuw gesuspendeerd. Deze procedure wordt herhaald totdat het slib geacht wordt vrij te zijn van overmaat substraat of remmer.

30. Nadat het slib volledig opnieuw is gesuspendeerd, of bij niet-behandeld slib direct, wordt vlak voor gebruik een monster genomen voor de bepaling van het drooggewicht aan gesuspendeerde vaste stoffen.

31. Een andere mogelijkheid is het homogeniseren van actief slib (3-5 g gesuspendeerde vaste stof per l). Het slib wordt twee minuten bij matige snelheid in een Waring-menger behandeld. Het gemengde slib wordt gedurende 30 minuten of zoveel langer als nodig bezonken en de vloeistof wordt gedecanteerd en gebruikt als entmateriaal in een hoeveelheid van 10 mg/l anorganisch medium.

▼M4

32. Een nog verdere vermindering van de blanco CO_2-ontwikkeling kan worden bereikt door het slib een nacht te beluchten met CO_2-vrije lucht. 4 mg/l vaste stof in het actief slib wordt gebruikt als de concentratie van het entmateriaal in deze test (13).

Secundair effluent van zuiveringsinstallaties

33. Het entmateriaal kan ook worden betrokken van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Het monster moet onder aerobe omstandigheden worden bewaard en moet worden gebruikt op de dag van verzameling of, indien nodig, worden gepreconditioneerd. Het effluent moet worden gefilterd met een grove filter om grove deeltjes te verwijderen en de pH-waarde wordt gemeten.

34. Om het gehalte aan IC te verminderen, wordt het filtraat gedurende één uur uitgewassen met CO_2-vrije lucht (punt 15, onder e)), waarbij de pH wordt gehandhaafd op 6,5 met gebruikmaking van orthofosforzuur (punt 20). De pH-waarde wordt met natriumhydroxide (punt 21) teruggebracht op de oorspronkelijke waarde en na ongeveer één uur bezinken wordt een geschikt volume van de bovendrijvende vloeistof genomen voor het enten. Deze uitwasprocedure vermindert het gehalte aan IC van het entmateriaal. Indien bijvoorbeeld het aanbevolen maximale volume van gefilterd, uitgewassen effluent (100 ml) per liter als entmateriaal werd gebruikt, bedroeg de hoeveelheid IC in de blanco controlevaten tussen 0,4 en 1,3 mg/l (14), wat overeenkomt met 2-6,5 % van teststof C in een concentratie van 20 mg C/l en 4-13 % in een concentratie van 10 mg C/l.

Oppervlaktewater

35. Uit daarvoor geschikt oppervlaktewater wordt een monster genomen. Dit moet onder aerobe omstandigheden worden bewaard en worden gebruikt op de dag waarop het verzameld is. Indien nodig wordt het monster geconcentreerd door het te filteren of centrifugeren. Het volume van het in elk testvat te gebruiken entmateriaal moet voldoen aan de in punt 26 vermelde criteria.

Grond

36. Op een diepte van maximaal 20 cm onder het grondoppervlak wordt een geschikt grondmonster genomen. Stenen, plantresten en ongewervelde dieren moeten worden verwijderd uit het grondmonster, waarna het wordt gezeefd door zeefmazen van 2 mm (als het monster te nat is om onmiddellijk te zeven, eerst gedeeltelijk aan de lucht laten drogen om het zeven te vergemakkelijken). Het monster moet onder aerobe omstandigheden worden bewaard en worden gebruikt op de dag waarop het werd genomen (als het monster wordt vervoerd in een niet helemaal dichtgeknoopte zwarte zak van polyethyleen, kan het bij 2 tot 4 °C maximaal een maand in de zak worden bewaard).

Preconditionering van het entmateriaal

37. Entmateriaal kan op de proefomstandigheden worden gepreconditioneerd, maar mag niet vooraf aan de teststof worden aangepast. Preconditionering kan de blanco CO_2-ontwikkeling verminderen. Preconditionering bestaat in het beluchten van actief slib na verdunning in testmedium tot 30 mg/l met vochtige CO_2-vrije lucht gedurende vijf-zeven dagen bij testtemperatuur.

TESTPROCEDURE

Aantal flessen

38. Het aantal flessen (punt 15, onder a)) dat nodig is voor een test, is afhankelijk van de analysefrequentie en de duur van de test.

39. Aanbevolen wordt om flessen in drievoud te analyseren met een voldoende aantal tussenpozen, zodat het tiendagenvenster herkend kan worden. Ook moeten ten minste vijf testflessen (punt 15, onder a)) uit de sets a), b) en c) (zie punt 42) aan het eind van de test worden geanalyseerd om betrouwbaarheidsintervallen van 95 % te kunnen berekenen voor de gemiddelde procentuele biologische afbraak.

▼M4

Geënt medium

40. Het entmateriaal wordt gebruikt in een concentratie van 4 mg/l droge vaste stoffen in actief slib. Onmiddellijk voor het gebruik wordt voldoende geënt medium bereid door, bijvoorbeeld, 2 ml op passende wijze behandeld actief slib (punten 27 tot en met 32) in een concentratie van 2 000 mg/l toe te voegen aan 1 liter uit anorganische zouten bestaand medium (punt 19). Bij het gebruik van secundair effluent wordt maximaal 100 ml effluent (punt 33) toegevoegd aan 900 ml uit anorganische zouten bestaand medium (punt 19) en tot 1 liter verdund met medium.

Flessen prepareren

41. Bekende hoeveelheden van het geënte medium worden verdeeld over duplo-flessen om een verhouding tussen gasruimte en vloeistof te bereiken van 1:2 (bv. 107 ml toevoegen aan flessen met een inhoud van 160 ml). Andere verhoudingen kunnen ook worden gebruikt, maar houd hierbij rekening met de waarschuwing in punt 11. Ongeacht het type entmateriaal dat wordt gebruikt, moet het geënte medium voldoende worden gemengd om te waarborgen dat het gelijk over de testflessen wordt verdeeld.

42. Er worden flessensets (punt 15, onder a)) met de volgende inhoud voorbereid:

a) testvaten (aangeduid als F_T) met daarin de teststof;

b) blanco controlevaten (aangeduid als F_B) met daarin uitsluitend het testmedium plus het entmateriaal; eventuele chemische stoffen, oplosmiddelen, agentia of glasvezelfilters die nodig zijn om de teststof in de testvaten te brengen, moeten ook worden toegevoegd;

c) vaten (aangeduid als F_C) met de referentiestof voor het controleren van de procedure;

d) indien nodig, vaten (aangeduid als F_I) met daarin zowel de teststof als de referentiestof in dezelfde concentraties (punt 24) als in respectievelijk de flessen F_T en F_C, voor het controleren van een eventueel inhibitoir effect van de teststof;

e) vaten (aangeduid als F_S) voor het controleren van mogelijke abiotische afbraak, als a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ of op enige andere manier gesteriliseerd (bv. in een autoclaaf).

43. In water oplosbare teststoffen en referentiestoffen worden toegevoegd als waterige stamoplossingen (punten 22, 23 en 24) om een concentratie van 10 tot 20 mg C/l te bereiken.

44. Onoplosbare teststoffen en onoplosbare referentiestoffen worden op verschillende manieren (zie punt 22, onder a)-e)) aan flessen toegevoegd in overeenstemming met de aard van de teststof, hetzij voor hetzij na toevoeging van het geënte medium, afhankelijk van de behandelingsmethode van de teststof. Indien een van de in punt 22, onder a)-e), beschreven procedures wordt toegepast, moeten de blanco flessen F_B (punt 42, onder b)) op een soortgelijke manier worden behandeld, maar zonder de teststof en de referentiestof.

45. Vluchtige teststoffen moeten worden geïnjecteerd in gesloten flessen (punt 47) met behulp van een micro-injectienaald. De dosis wordt berekend op basis van het geïnjecteerde volume en de dichtheid van de teststof.

46. Indien nodig moet water aan de vaten worden toegevoegd om in ieder vat hetzelfde vloeistofvolume te hebben. Er moet worden gewaarborgd dat de verhouding tussen gasruimte en vloeistof (gewoonlijk 1:2) en de concentratie van de teststof zodanig zijn dat voldoende zuurstof in de gasruimte aanwezig is om volledige biologische afbraak mogelijk te maken.

▼M4

47. Alle flessen worden vervolgens afgesloten, bijvoorbeeld met septa van butylrubber en aluminium doppen. Vluchtige teststoffen moeten in deze fase worden toegevoegd (punt 45). Voor het monitoren van de vermindering van de concentratie DOC in de testoplossing en voor het uitvoeren van tijdstip-nulanalysen voor de initiële concentratie IC (steriele controles, punt 42, onder e)) of andere determinanten wordt een daarvoor geschikt monster uit het testvat genomen. Het testvat en de inhoud ervan worden als afval verwijderd.

48. De gesloten flessen worden op een rondschudapparaat geplaatst (punt 15, onder d)), met een schudsnelheid die voldoende is om de inhoud van de flessen goed te mengen en gesuspendeerd te houden (bv. 150 tot 200 tpm), en worden vervolgens in het donker geïncubeerd bij een temperatuur van 20 °C, die niet meer mag afwijken dan ± 1 °C.

Monstername

49. Het patroon van de monstername is afhankelijk van de vertragingstijd en de kinetische snelheid van de biologische afbraak van de teststof. Flessen worden op de dag van de monstername weggenomen voor de analyse, die ten minste wekelijks of frequenter (bv. tweemaal per week) moet worden uitgevoerd indien een volledige afbraakcurve vereist is. Het vereiste aantal duplofflessen wordt uit het schudapparaat genomen, overeenkomend met F_T, F_B en F_C en, indien ze gebruikt worden, F_I en F_S (zie punt 42). De test duurt gewoonlijk 28 dagen. Indien de curve voor de biologische afbraak aangeeft dat een plateau is bereikt voordat de 28 dagen voorbij zijn, moet de test eerder dan na 28 dagen worden afgerond. De vijf flessen die voor de 28e dag van de test zijn gereserveerd, worden bemonsterd en de resultaten worden gebruikt om de betrouwbaarheidslimieten of de variatiecoëfficiënt van de procentuele biologische afbreekbaarheid te berekenen. De flessen die zijn bedoeld voor de controles op inhibitie en voor abiotische afbraak hoeven niet zo frequent te worden bemonsterd als de andere flessen; bemonstering op dag 1 en dag 28 is voldoende.

Analyse van anorganische koolstof (IC)

50. De CO_2-productie in de flessen wordt bepaald door de toename in de concentratie van anorganische koolstof (IC) tijdens incubatie te meten. Er zijn twee aanbevolen methoden beschikbaar voor het meten van de hoeveelheid in de test geproduceerde IC en deze worden hieronder beschreven. Aangezien de methoden enigszins verschillende resultaten kunnen opleveren, dient slechts één ervan in een testuitvoering te worden gebruikt.

51. Methode a) wordt aanbevolen in gevallen waarin de kans bestaat dat het medium overblijfselen bevat van bijvoorbeeld glasvezelpapier en/of onoplosbare teststof. Indien een koolstofanalyseapparaat niet beschikbaar is, kan deze analyse worden uitgevoerd met een gaschromatograaf. Het is belangrijk dat de flessen (bijna) de testtemperatuur hebben, wanneer het gas in de gasruimte wordt geanalyseerd. Methode b) is mogelijk gemakkelijker voor laboratoria die koolstofanalyseapparaten gebruiken om IC te meten. Het is belangrijk dat de natriumhydroxideoplossing (punt 21) die wordt gebruikt om CO_2 om te zetten in carbonaat vers bereid is of dat het IC-gehalte ervan bekend is, zodat hiermee rekening kan worden gehouden bij het berekenen van de testresultaten (zie punt 66, onder b)).

Methode a): aanzuren tot pH < 3

52. Vóór iedere reeks analysen wordt het IC-analyseapparaat gekalibreerd met behulp van een geschikte IC-standaard (bv. 1 gewichtspercent CO_2 in N_2). Geconcentreerd fosforzuur (punt 20) wordt geïnjecteerd door het septum van iedere bemonsterde fles om de pH van het medium te verlagen tot < 3 (bv. 1 ml toevoegen aan 107 ml testmedium). De flessen worden teruggeplaatst op het schudapparaat. Nadat de flessen gedurende één uur bij testtemperatuur zijn geschud, worden ze van het schudapparaat genomen, waarna bekende hoeveelheden (bv. 1 ml) gas aan de gasruimte worden onttrokken en geïnjecteerd in het IC-analyseapparaat. De gemeten IC-concentraties worden geregistreerd als mg C/l.

▼M4

53. Het principe van deze methode is dat na aanzuring tot pH < 3 en equilibratie bij 20 °C, de evenwichtsconstante voor de verdeling van CO_2 over de vloeibare en gasvormige fasen in de testflessen 1,0 is, indien gemeten als een concentratie (13). Dit moet voor het testsysteem minimaal eenmaal worden aangetoond, en wel als volgt:

Flessen met daarin 5 en 10 mg/l als IC, met gebruikmaking van een oplossing van watervrij natriumcarbonaat (Na_2CO_3) in CO_2-vrij water dat is bereid door water aan te zuren tot pH 6,5 met geconcentreerd orthofosforzuur (punt 20), worden gedurende een nacht uitgewassen met CO_2-vrije lucht en de pH wordt met alkali verhoogd tot neutraal. Er moet worden gewaarborgd dat de verhouding tussen het gasruimtevolume en het vloeistofvolume dezelfde is als in de tests (bv. 1:2). Vervolgens worden het aanzuren en de equilibratie uitgevoerd als beschreven in punt 52 en wordt de IC-concentratie van zowel de gasruimte als de vloeibare fasen gemeten. Er wordt gecontroleerd of de twee concentraties dezelfde zijn binnen de marge voor toevallige fouten. Zo niet, moet de gebruiker de procedures herzien. Deze controle op de verdeling van IC over de vloeibare en gasvormige fasen hoeft niet bij iedere uitvoering van de test te worden verricht, maar kan indien mogelijk tijdens het kalibreren worden verricht.

54. Indien de verwijdering van DOC moet worden gemeten (uitsluitend teststoffen die in water oplosbaar zijn), moeten monsters worden genomen van de vloeibare fase uit afzonderlijke (niet aangezuurde) flessen, met een membraan worden gefilterd en worden geïnjecteerd in het DOC-analyseapparaat. Indien nodig kunnen deze flessen voor andere analysen worden gebruikt om de primaire biologische afbreekbaarheid te meten.

Methode b): omzetting van CO_2 in carbonaat

55. Voor iedere reeks analysen wordt het IC-analyseapparaat gekalibreerd met behulp van een geschikte standaard, bijvoorbeeld een oplossing van natriumbicarbonaat ($NaHCO_3$) in CO_2-vrij water (zie punt 53) binnen het bereik van 0 tot 20 mg/l, als IC. Een oplossing van natriumhydroxide (7M, punt 21) (bv. 1 ml op 107 ml medium) wordt geïnjecteerd door het septum van iedere bemonsterde fles en de flessen worden gedurende één uur bij testtemperatuur geschud. Gebruik dezelfde NaOH-oplossing voor alle flessen die op een bepaalde dag worden geanalyseerd, maar niet noodzakelijkerwijs bij alle monsternamen tijdens een test. Indien absolute blanco IC-waarden benodigd zijn bij alle monsternamen, moet het IC-gehalte van de NaOH-oplossing iedere keer wanneer deze wordt gebruikt, worden bepaald. De flessen worden van het schudapparaat genomen en men laat de inhoud bezinken. Geschikte volumes (bv. 50 tot 1 000 µl) worden met een injectienaald onttrokken aan de vloeibare fase in ieder vat. De monsters worden in het IC-analyseapparaat geïnjecteerd en de concentraties IC worden geregistreerd. Er moet worden gewaarborgd dat het gebruikte analyseapparaat geschikt is om de alkalinemonsters die bij deze methode geproduceerd worden, te verwerken.

56. Het principe van deze methode is dat de concentratie IC na de toevoeging van alkali en het schudden verwaarloosbaar is. Dit moet voor het testsysteem ten minste eenmaal worden gecontroleerd door met gebruikmaking van IC-standaarden alkali toe te voegen en te laten equilibreren en vervolgens de concentratie IC in zowel de gasruimte als de vloeibare fasen te meten (zie punt 53). De concentratie in de gasruimte moet in de buurt van nul liggen. Deze controle op de nagenoeg volledige absorptie van CO_2 hoeft niet bij iedere uitvoering van de test te worden verricht.

57. Indien de verwijdering van DOC moet worden gemeten (uitsluitend teststoffen die in water oplosbaar zijn), moeten monsters worden genomen van de vloeibare fase uit afzonderlijke flessen (zonder toegevoegd alkali), waarna ze met een membraan worden gefilterd en worden geïnjecteerd in het DOC-analyseapparaat. Indien nodig kunnen deze flessen voor andere analysen worden gebruikt om de primaire biologische afbreekbaarheid te meten.

▼M4

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Berekening van de resultaten

58. Uitgaande van een mineralisatie van de teststof in CO_2 van 100 %, is de overmaat aan ThIC die is geproduceerd in vergelijking met de ThIC die in de blanco controlevaten is geproduceerd gelijk aan de TOC die is toegevoegd aan iedere testfles aan het begin van de test, dat wil zeggen:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}$$

De totale massa (mg) anorganische koolstof (TIC) in elke fles is:

$$\text{TIC} = (\text{mg C in de vloeistof} + \text{mg C in de gasruimte}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Vergelijking [1]}$$

waarbij

V_L = volume van vloeistof in de fles (liter);

CL = concentratie van IC in de vloeistof (mg/l als koolstof);

VH = volume van de gasruimte (liter);

CL = concentratie van IC in de gasruimte (mg/l als koolstof).

De berekeningen van TIC voor de twee analysemethoden die worden gebruikt voor het meten van IC in deze test, worden in de onderstaande punten 60 en 61 beschreven. De procentuele biologische afbraak (*% D*) is in alle gevallen het resultaat van:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Vergelijking [2]}$$

waarbij

TIC_t = mg TIC in testfles op moment t;

TIC_b = gemiddelde mg TIC in blanco flessen op moment t;

TOC = mg TOC in eerste instantie toegevoegd aan het testvat.

De procentuele biologische afbraak % D wordt berekend voor de test (F_T), referentie (F_C) en, indien van toepassing, de controleflessen voor de inhibitiemonitoring (F_I) op basis van de respectieve hoeveelheden TIC die zijn geproduceerd tot aan het moment van iedere monstername.

59. Indien het TIC-gehalte van de steriele controles (F_S) tijdens de testperiode significant is gestegen, kan worden geconcludeerd dat abiotische afbraak van de teststof opgetreden is en moet hiermee rekening worden gehouden bij de berekening van D in vergelijking [2].

Aanzuren tot pH < 3

60. Aangezien het aanzuren tot pH < 3 en de equilibratie resulteert in een gelijke verdeling van de concentratie TIC in de vloeibare en gasvormige fasen, hoeft alleen de concentratie IC in de gasvormige fase te worden gemeten. Derhalve geldt op basis van vergelijking [1]: $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, waarbij V_B = volume van de serumfles.

Omzetting van CO_2 in carbonaat

61. In deze methode worden de berekeningen verricht als in vergelijking [1], maar de verwaarloosbare hoeveelheid IC in de gasvormige fase wordt genegeerd, dat wil zeggen.$V_H \times C_H = 0$ en $\text{TIC} = V_L \times C_L$.

▼M4

Uitdrukking van de resultaten

62. Een curve voor biologische afbraak wordt verkregen door de procentuele biologische afbraak, D, uit te zetten tegen de incubatietijd en indien mogelijk worden de aanloopfase, de biologischeafbraakfase, het tiendagenvenster en de plateaufase, dat wil zeggen de fase waarin de maximale afbraak bereikt is en de curve voor biologische afbraak afgevlakt is, aangegeven. Indien vergelijkbare resultaten worden behaald voor tegelijkertijd geteste testvaten F_T (< 20 % afwijking), wordt een curve voor het gemiddelde getekend (zie aanhangsel 2, figuur 1); zo niet, wordt voor ieder vat een curve getekend. De gemiddelde waarde van de procentuele biologische afbraak in de plateaufase wordt bepaald of de hoogste waarde wordt genomen (bv. indien de curve in de plateaufase afneemt), maar in het laatste geval is het belangrijk om na te gaan of de waarde geen uitbijter is. Dit maximale niveau van biologische afbreekbaarheid moet in het testverslag als „mate van biologische afbraak van de teststof" worden vermeld. Indien het aantal testvaten onvoldoende was om een plateaufase aan te geven, worden de meetgegevens van de laatste dag van de test gebruikt om een gemiddelde waarde te berekenen. Deze laatste waarde, het gemiddelde van vijf duplovaten, dient als indicatie van de precisie waarmee de procentuele biologische afbreekbaarheid is bepaald. Ook moet de waarde die gemeten wordt aan het eind van het tiendagenvenster, worden gerapporteerd.

63. Op dezelfde manier wordt een curve voor de referentiestof, F_C, uitgezet en, indien van toepassing, voor de abiotische eliminatiecontrole, F_S, en de inhibitiecontrole, F_I.

64. De hoeveelheden TIC die in de blanco controlevaten (F_B) aanwezig zijn, worden vastgelegd evenals de hoeveelheden in de kolven F_S (abiotische controle), voor zover deze vaten in de test werden opgenomen.

65. Voor de vaten F_I wordt D berekend, op basis van de theoretische IC-opbrengst die wordt verwacht van alleen het referentiebestanddeel van het mengsel. Indien op dag 28 $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25\,\%$, kan worden aangenomen dat de teststof een inhibitoir effect op de activiteit van het entmateriaal heeft gehad en dit kan een verklaring zijn voor de lage waarden van D_{FT} die zijn verkregen onder de testomstandigheden. In dit geval kan de test worden herhaald met een lagere testconcentratie en met bij voorkeur een vermindering van de DIC in het entmateriaal en de in de blanco controlevaten gevormde TIC, aangezien de lagere concentratie anders de nauwkeurigheid van de methode nadelig beïnvloedt. Als alternatief kan ander entmateriaal worden gebruikt. Indien in fles F_S (abiotisch) een significante stijging (> 10 %) in de hoeveelheid TIC wordt waargenomen, zijn er mogelijk abiotische afbraakprocessen opgetreden.

Geldigheid van de resultaten

▼M7

66. Een test wordt geacht geldig te zijn, indien:

a) de gemiddelde procentuele afbraak in de vaten F_C met daarin de referentiestof > 60 % is op de 14e dag van de incubatie, en

b) de gemiddelde hoeveelheid TIC die aanwezig is in de blanco controlevaten F_B aan het eind van de test < 3mg C/l is.

Als deze grenswaarden niet worden gehaald, moet de test worden herhaald met een uit een andere bron afkomstig entmateriaal en/of moeten de procedures worden herzien. Indien bijvoorbeeld hoge IC-productie in de blanco vaten een probleem is, moet de in de punten 27 tot en met 32 beschreven procedure worden gevolgd.

(1) De procentuele afbraak in vaten F_C met daarin de referentiestof.
(2) De procentuele afbraak in vaten F_I.

▼M4

67. Indien de teststof 60 % ThIC niet haalt en aangetoond is dat de teststof geen inhibitoir effect heeft (punt 65), kan de test worden herhaald met een hogere concentratie van het entmateriaal (maximaal 30 mg/l actief slib en 100 ml effluent/l) of entmaterialen uit andere bronnen, in het bijzonder indien de afbraak binnen het bereik van 20 tot 60 % lag.

Interpretatie van de resultaten

68. Biologische afbraak > 60 % ThIC binnen het tiendagenvenster in deze test toont aan dat de teststof gemakkelijk biologisch afbreekbaar is onder aerobe omstandigheden.

69. Als de waarde voor het doorstaan van de test van 60 % ThIC niet wordt gehaald, moet de pH-waarde worden bepaald in media in flessen waaraan geen zuur of alkaline is toegevoegd; een waarde lager dan 6,5 zou duiden op het optreden van nitrificatie. In een dergelijk geval moet de test worden herhaald met een bufferoplossing met een hogere concentratie.

Testverslag

70. Een tabel wordt opgesteld met % D voor iedere testfles (F_T), referentiefles (F_C) en, indien van toepassing, inhibitiecontrolefles (F_I) voor iedere monsternamedag. Indien vergelijkbare resultaten worden verkregen voor duplolessen, wordt een curve van gemiddelde % D uitgezet tegen de tijd. De hoeveelheid TIC in de blanco vaten (F_B) wordt vastgelegd, alsmede de hoeveelheid DOC in de steriele controlevaten (F_S) en/of andere determinanten en hun procentuele verwijdering.

71. De gemiddelde waarde van % D in de plateaufase wordt bepaald of de hoogste waarde wordt gebruikt als de curve voor biologische afbraak in de plateaufase afneemt; deze waarde wordt gerapporteerd als de „mate van biologische afbraak van de teststof”. Het is belangrijk om in het laatstgenoemde geval te waarborgen dat de hoogste waarde geen uitbijter is.

72. In het tesverslag worden de volgende gegevens opgenomen:

Teststof:

— de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof.

Testomstandigheden:

— verwijzing naar deze testmethode;

— een beschrijving van het gebruikte testsysteem (bv. volume van het vat, verhouding tussen gasruimte en vloeistof, roermethode enz.);

— de manier waarop de teststof en de referentiestof aan het testsysteem zijn toegevoegd: de gebruikte testconcentratie en de hoeveelheid koolstof die als dosis aan elke testfles is toegevoegd, eventueel gebruik van oplosmiddelen;

— nadere gegevens van het gebruikte entmateriaal, eventuele voorbehandeling en preconditionering;

— incubatietemperatuur;

— validering van de principes van IC-analyse;

— belangrijkste kenmerken van het gebruikte IC-analyseapparaat (en eventuele andere toegepaste analysemethoden);

— aantal duplobepalingen.

Resultaten:

— ruwe gegevens en berekende waarden van de biologische afbraak in tabelvorm;

▼M4

— de grafiek van de procentuele afbraak uitgezet tegen de tijd voor de test- en referentiestof, de aanloopfase, de afbreekfase, het tiendagenvenster en de richtingscoëfficiënt;

— de procentuele verwijdering in de plateaufase, aan het eind van de test en na het tiendagenvenster;

— eventuele redenen om de testresultaten te verwerpen;

— eventuele andere omstandigheden die relevant zijn voor de gevolgde procedure;

— een bespreking van de resultaten.

LITERATUUR:

(1) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid — CO_2-ontwikkelingstest (methode C.4-C).

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid.

(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) Hoofdstuk C.11 van deze bijlage, Test op de remming van de ademhaling van actief slib.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Aanhangsel 1

AFKORTINGEN EN DEFINITIES

IC: anorganische koolstof.

$ThCO_2$: theoretische hoeveelheid kooldioxide (mg) is de hoeveelheid kooldioxide die volgens berekening uit het bekende of gemeten koolstofgehalte van de teststof wordt geproduceerd, wanneer deze volledig wordt gemineraliseerd; wordt ook uitgedrukt als mg ontwikkelde kooldioxide per mg teststof.

DOC: opgeloste organische koolstof is de organische koolstof die in de oplossing aanwezig is of die of door een filter van 0,45 µm gaat of na centrifugeren bij ongeveer 4 000 g (ongeveer 40 000 m s^{-2}) gedurende 15 minuten in de bovenstaande vloeistof overblijft.

DIC: opgeloste anorganische koolstof.

ThIC: theoretische hoeveelheid anorganische koolstof.

TIC: totale hoeveelheid anorganische koolstof.

Gemakkelijk biologisch afbreekbaar: een arbitraire indeling van chemische stoffen die bepaalde schiftingsproeven op totale biologische afbreekbaarheid hebben doorstaan; deze proeven zijn zo streng dat geacht wordt dat dergelijke chemische stoffen in aquatisch milieu onder aerobe omstandigheden snel en volledig biologisch worden afgebroken.

Tiendagenvenster: de periode van tien dagen onmiddellijk na het bereiken van 10 % biologische afbraak.

Inherente biologische afbreekbaarheid: een indeling van chemische stoffen waarvoor elke test op biologische afbreekbaarheid een ondubbelzinnig bewijs van (primaire of totale) biologische afbraak levert.

Totale aerobe biologische afbraak: de mate van afbraak die wordt verkregen wanneer de teststof volledig door micro-organismen wordt omgezet tot kooldioxide, water, anorganische zouten en nieuwe microbiële celbestanddelen (biomassa).

Mineralisatie: mineralisatie is de volledige ontleding van een organische chemische stof in CO_2 en H_2O onder aerobe omstandigheden en in CH_4, CO_2 en H_2O onder anaerobe omstandigheden.

Aanloopfase: de tijdsduur vanaf de aanvang van de test totdat acclimatisering en/of adaptatie van de afbrekende micro-organismen heeft plaatsgevonden en de biologische afbraak van een teststof of organisch materiaal tot een detecteerbaar niveau is gestegen (bv. 10 % van de theoretische maximale biologische afbraak, of lager, afhankelijk van de nauwkeurigheid van de meettechniek).

Afbreekfase: de tijd van het eind van de aanloopperiode tot het tijdstip waarop 90 % van de maximale afbraak is bereikt.

Plateaufase: de plateaufase is de fase waarin de maximale afbraak is bereikt en de curve voor de biologische afbreekbaarheid afgevlakt is.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

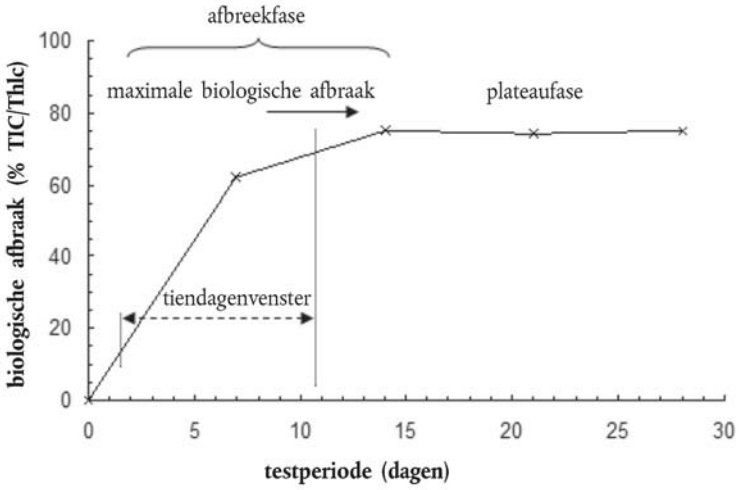
▼M4

Aanhangsel 2

Voorbeeld van een curve voor biologische afbreekbaarheid

Figuur 1

Biologische afbraak van 1-octanol in de CO_2-gasruimtetest



Legenda:

biologische afbraak

afbreekfase

maximale biologische afbraak

plateaufase

tiendagenvenster

testperiode (dagen)

▼M4

C.30. BIOACCUMULATIE IN TERRESTRISCHE *OLIGOCHAETAE*

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn 317 (2010) van de OESO (TG 317). Testmethoden met betrekking tot het uiteindelijke lot in het milieu zijn onder meer Bioconcentratie: doorstroomtest met vissen (hoofdstuk C.13 van deze bijlage (49)) en de test voor „bioaccumulatie in in het sediment levende bentische *Oligochaetae*" (53), die in respectievelijk 1996 en 2008 werden gepubliceerd. Het is moeilijk, zo niet onmogelijk, om gegevens inzake aquatische bioaccumulatie te extrapoleren naar terrestrische organismen zoals regenwormen. Modelberekeningen op basis van de lipofiliciteit van een teststof, bv. (14)(37), worden op dit moment gebruikt voor de beoordeling van bioaccumulatie van chemische stoffen in de bodem, zoals bv. in de technische leidraad van de EU (19). Er is al ingegaan op de noodzaak van een compartimentspecifieke testmethode, zie bv. (55). Een dergelijke methode is met name belangrijk voor de evaluatie van secundaire vergiftiging in terrestrische voedselketens (4). Er zijn diverse nationale testmethoden voor bioaccumulatie in andere organismen dan vissen, bv. (2) en (72). Een methode voor het meten van bioaccumulatie uit verontreinigde grond in regenwormen (*Eisenia fetida*, Savigny) en potwormen is ontwikkeld door de American Society for Testing and Materials (3). Een internationaal erkende methode voor de bepaling van bioaccumulatie in verrijkte grond zal de risicoanalyse voor chemische stoffen in terrestrische ecosystemen verbeteren, bv. (25)(29).

2. Ongewervelde dieren die grond opnemen, worden blootgesteld aan de chemische stoffen die zich in de grond bevinden. Onder deze dieren spelen terrestrische *Oligochaetae* (regenwormen) een belangrijke rol in de structuur en functie van grond (15)(20). Terrestrische *Oligochaetae* leven in de bodem en hoofdzakelijk aan het bodemoppervlak (met name in de strooisellaag); in biomassa uitgedrukt zijn ze vaak de meest voorkomende soort (54). Door bioturbatie van de bodem en door als prooi te dienen kunnen deze dieren een grote invloed hebben op de biobeschikbaarheid van chemische stoffen voor andere organismen zoals ongewervelde dieren (bv. roofmijten en kevers; bv. (64)) of gewervelde roofdieren (bv. vossen en meeuwen) (18)(62). In aanhangsel 5 zijn een aantal van de momenteel in ecotoxicologische tests gebruikte soorten terrestrische *Oligochaetae* beschreven.

3. De ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) bevat vele essentiële en nuttige nadere gegevens met betrekking tot de uitvoering van de onderhavige testmethode ter bepaling van de bioaccumulatie in de bodem. Andere documenten waarnaar in deze testmethode wordt verwezen, zijn hoofdstuk C.13 van deze bijlage, Bioconcentratie: doorstroomtest met vissen (49) en TG 315 van de OESO: *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates* (53). Praktijkervaring met onderzoek naar bioaccumulatie in de bodem en publicaties uit de literatuur, bv. (1)(5)(11)(12)(28)(40)(43)(45)(57)(59)(76)(78)(79), zijn eveneens belangrijke bronnen van informatie voor deze testmethode.

4. Deze testmethode is voornamelijk van toepassing op stabiele, neutrale organische stoffen, die neigen naar adsorptie aan de grond. Deze testmethode kan worden gebruikt om te testen op bioaccumulatie van stabiele metallo-organische verbindingen die zich aan grond hechten. De methode kan tevens worden toegepast op metalen en andere spoorelementen.

VOORWAARDE

5. Tests voor het meten van de bioaccumulatie van een chemische stof in terrestrische *Oligochaetae* zijn uitgevoerd met zware metalen (zie bv. (63)) en persistente, organische stoffen met bekende log K_{ow}-waarden tussen 3,0 en 6,0, bv. (40). Dergelijke tests kunnen ook worden toegepast op:

— chemische stoffen met een log K_{ow} van meer dan 6,0 (superhydrofobe chemische stoffen);

▼M4

— chemische stoffen die behoren tot een klasse van organische stoffen waarvan bekend is dat ze kunnen bioaccumuleren in levende organismen, bv. oppervlakteactieve stoffen of stoffen met een hoog adsorptievermogen;

— chemische stoffen met structuurkenmerken die wijzen op bioaccumulatiepotentieel, bv. analogen van stoffen waarvan het bioaccumulatiepotentieel bekend is, en

— metalen.

6. Vóór het begin van de studie moet informatie over de teststof worden verzameld, zoals de triviale naam, de chemische naam (bij voorkeur de IUPAC-naam), de structuurformule, het CAS-registratienummer, de zuiverheid, voorzorgsmaatregelen, passende opslagomstandigheden en de analysemethoden. Daarnaast moet de volgende informatie bekend zijn:

a) oplosbaarheid in water;

b) verdelingscoëfficiënt octanol/water, K_{ow};

c) verdelingscoëfficiënt grond/water, uitgedrukt als K_{oc};

d) dampspanning;

e) afbreekbaarheid (bv. in grond, water);

f) bekende metabolieten.

7. Er kan gebruik worden gemaakt van radioactief gelabelde of niet radioactief gelabelde teststoffen. Om de analyse te vergemakkelijken wordt echter het gebruik van een radioactief gelabelde teststof aanbevolen. Deze keuze wordt gemaakt op basis van de aantoonbaarheidsgrenswaarden of een vereiste om de oorspronkelijke teststof en metabolieten te meten. Indien een radioactief gelabelde teststof wordt gebruikt en de totale hoeveelheid radioactieve residuen wordt gemeten, is het belangrijk dat de radioactief gelabelde residuen in zowel de grond als de testorganismen worden gekenmerkt op basis van de percentages van de oorspronkelijke teststof en de gelabelde niet-oorspronkelijke stof, bv. in monsters die zijn genomen in stationaire toestand of aan het eind van de opnamefase, zodat een bioaccumulatiefactor (BAF) kan worden berekend voor de oorspronkelijke teststof en voor de desbetreffende grondmetabolieten (zie punt 50). Mogelijk moet de hier beschreven methode worden aangepast, bv. om voor voldoende biomassa te zorgen, voor het meten van niet-radioactief gelabelde organische teststoffen of metalen. Indien de totale hoeveelheid radioactieve residuen wordt gemeten (door vloeistofscintillatietelling na extractie, verbranding of weefselsolubilisatie), wordt de bioaccumulatiefactor gebaseerd op de oorspronkelijke teststof en metabolieten. De berekening van de BAF moet bij voorkeur worden gebaseerd op de concentratie van de oorspronkelijke teststof in de organismen en de totale hoeveelheid radioactieve residuen. Vervolgens moet de voor het vetgehalte van de worm en het gehalte aan organische koolstof (OC) in de bodem genormaliseerde biota-grondaccumulatiefactor (BSAF) worden berekend op basis van de BAF, zodat de resultaten van verschillende bioaccumulatietests met elkaar kunnen worden vergeleken.

8. De toxiciteit van de teststof voor de in de test gebruikte soort moet bekend zijn, bv. een effectconcentratie (EC_x) of letale concentratie (LC_x) voor de tijd van de opnamefase (bv. (19)). De geselecteerde concentratie van de teststof moet bij voorkeur ongeveer 1 % bedragen van de acute asymptotische LC_{50} en ten minste tien keer zo hoog zijn als de aantoonbaarheidsgrens van de stof in grond voor de gebruikte analysemethode. De voorkeur moet worden gegeven aan toxiciteitswaarden die zijn afgeleid uit langetermijnonderzoek naar subletale eindpunten (51)(52), voor zover beschikbaar. Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, geeft een test op acute toxiciteit nuttige informatie (zie bv. (23)).

▼M4

9. Er moet een geschikte analysemethode met een bekende juistheid, precisie en gevoeligheid voor de kwantificering van de chemische stof in de testoplossingen, in de bodem en in het biologische materiaal beschikbaar zijn, alsook nadere gegevens met betrekking tot monsterbereiding en -opslag en veiligheidsinformatiebladen voor materialen. De analytische aantoonbaarheidsgrenzen van de teststof in de bodem en het wormweefsel moeten eveneens bekend zijn. Indien een met ^{14}C gelabelde teststof wordt gebruikt, moeten de specifieke radioactiviteit (d.w.z. Bq mol^{-1}) en het percentage van de met onzuiverheden verbonden radioactiviteit bekend zijn. De specifieke radioactiviteit van de teststof moet hoog genoeg zijn om analyse mogelijk te maken en de gebruikte testconcentraties mogen geen toxische effecten veroorzaken.

10. De test kan worden uitgevoerd met kunstmatige grond of met natuurlijke grond. Informatie over kenmerken van de gebruikte natuurlijke grond, bv. de oorsprong van de grond of de bestanddelen ervan, de pH-waarde, het gehalte aan organische koolstof, de deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei) en het waterhoudend vermogen (WHC), moet bekend zijn vóór de start van de test (3)(48).

PRINCIPE VAN DE TEST

11. De parameters die kenmerkend zijn voor de bioaccumulatie van een teststof zijn onder meer de bioaccumulatiefactor (BAF), de opnamesnelheidsconstante (k_s) en de eliminatiesnelheidsconstante (k_e). Definities worden gegeven in aanhangsel 1.

12. De test bestaat uit twee fasen: de opnamefase (blootstelling) en de eliminatiefase (na blootstelling). Tijdens de opnamefase worden duplogroepen wormen blootgesteld aan grond die verrijkt is met de teststof. Naast deze testdieren worden groepen controlewormen onder identieke omstandigheden zonder de teststof gehouden. Het drooggewicht en het vetgehalte van de testorganismen worden gemeten. Dit kan worden gedaan met behulp van de wormen van de controlegroep. Analytische nuleffectmetingen (blanco) kunnen worden uitgevoerd door monsters van de controlewormen en -grond te analyseren. Voor de eliminatiefase worden de wormen overgebracht naar grond die vrij is van de teststof. Een eliminatiefase is altijd vereist, tenzij de opname van de teststof tijdens de blootstellingsfase niet significant was. Een eliminatiefase levert informatie op over de snelheid waarmee de teststof door de testorganismen wordt uitgescheiden (bv. (27)). Indien tijdens de opnamefase geen stationaire toestand is bereikt, moet de bepaling van de kinetische parameters — kinetische bioaccumulatiefactor BAF_k, opname- en eliminatiesnelheidsconstante(n) — bij voorkeur gebaseerd zijn op simultane fitting van de resultaten van de opname- en de eliminatiefasen. De concentratie van de teststof in/op de wormen wordt gedurende beide fasen gemonitord.

13. Tijdens de opnamefase worden metingen verricht op bemonsteringstijdstippen tot 14 dagen („Enchytraeidae”) of 21 dagen (regenwormen) totdat de stationaire toestand is bereikt (11)(12)(67). De stationaire toestand treedt op wanneer de tegen de tijd uitgezette concentratie in wormen evenwijdig loopt aan de tijdas en drie opeenvolgende concentratieanalysen van monsters die genomen zijn met intervallen van ten minste twee dagen, niet meer dan ± 20 % van elkaar variëren op basis van statistische vergelijkingen (bv. analyse van variantie, regressieanalyse).

14. De eliminatiefase bestaat uit het overbrengen van de testorganismen naar vaten met hetzelfde substraat zonder de teststof. Tijdens de eliminatiefase worden metingen verricht op bemonsteringstijdstippen gedurende 14 dagen („Enchytraeidae”) of 21 dagen (regenwormen), tenzij uit eerdere analytische bepaling een vermindering van 90 % van de teststofresiduen in wormen is gebleken. De concentratie van de teststof in de wormen aan het eind van de

▼M4

eliminatiefase wordt gerapporteerd als niet-geëlimineerde residuen. De bioaccumulatiefactor in stationaire toestand (BAF_{SS}) wordt bij voorkeur berekend op twee manieren: als de verhouding tussen de concentratie in wormen (C_a) en in de bodem (C_s) bij een kennelijke stationaire toestand, en als een kinetische bioaccumulatiefactor, BAF_K, zijnde de verhouding tussen de snelheidsconstante van opname uit de bodem (k_s) en de eliminatiesnelheidsconstante (k_e) (zie aanhangsel 1 voor definities), uitgaande van een eersteordekinetiek (zie aanhangsel 2 voor berekeningen). Indien eersteordekinetiek duidelijk niet van toepassing is, moeten andere modellen worden gebruikt.

15. De opnamesnelheidsconstante, de eliminatiesnelheidsconstante (of -constanten, indien andere modellen gebruikt worden), de kinetische bioaccumulatiefactor (BAF_K) en, indien mogelijk, de betrouwbaarheidsgrenzen van elk van deze parameters worden berekend met behulp van gecomputeriseerde modelvergelijkingen (zie aanhangsel 2 voor richtsnoeren). De kwaliteit van de fitting van ieder model dat wordt gebruikt, kan worden bepaald aan de hand van bijvoorbeeld de correlatiecoëfficiënt of de determinatiecoëfficiënt (coëfficiënten die in de buurt van één liggen, duiden op een goede fitting) of chi-kwadraattest. Ook kan de grootte van de standaardfout of betrouwbaarheidsgrens rond de geschatte parameters een indicatie zijn van de kwaliteit van de fitting van het model.

16. Ter vermindering van de variabiliteit in de testresultaten voor teststoffen met een hoge lipofiliciteit moeten de bioaccumulatiefactoren worden uitgedrukt in verhouding tot het vetgehalte en het gehalte aan organische koolstof (kg organische koolstof in de bodem (OC) kg^{-1} vetgehalte van worm). Deze aanpak is gebaseerd op het feit dat voor bepaalde chemische klassen een duidelijk verband bestaat tussen het bioaccumulatiepotentieel en de lipofiliciteit; dit is duidelijk vastgesteld voor vissen (47). Er is een verband tussen het vetgehalte van vissen en de bioaccumulatie van dergelijke stoffen. Voor bentische organismen zijn soortgelijke correlaties gevonden, bv. (30)(44). Ook voor terrestrische *Oligochaetae* is deze correlatie aangetoond, bv. (5)(6)(7)(14). Indien voldoende wormweefsel beschikbaar is, kan het vetgehalte van de testdieren op hetzelfde biologische materiaal worden bepaald als het materiaal dat gebruikt is om de concentratie van de teststof te bepalen. Als alternatief kunnen controledieren worden gebruikt om het vetgehalte te meten.

GELDIGHEID VAN DE TEST

17. Voor een geldige test moeten zowel de controle- als de testgroepen aan de volgende criteria voldoen:

— aan het eind van de test mag de totale sterfte tijdens de opname- en eliminatiefase niet hoger zijn dan 10 % (regenwormen) of 20 % („Enchytraeidae”) van het totale aantal ingebrachte wormen;

— voor *Eisenia fetida* en *Eisenia andrei* mag het gemiddelde massaverlies, gemeten aan het eind van de opnamefase en aan het eind van de eliminatiefase, niet hoger zijn dan 20 % in vergelijking met het versgewicht aan het begin van iedere fase.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Diersoort

18. Diverse soorten terrestrische *Oligochaetae* worden aanbevolen voor tests op bioaccumulatie. In aanhangsel 5 zijn de meest gebruikte soorten beschreven, namelijk *Eisenia fetida* of *Eisenia andrei* („Lumbricidae”), of *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* of *Enchytraeus luxuriosus* („Enchytraeidae”).

▼M4

Apparatuur

19. Voor alle onderdelen van de apparatuur moet het gebruik van materialen die de teststof kunnen oplossen of adsorberen of andere stoffen kunnen logen en die een schadelijk effect op de testdieren hebben, worden vermeden. Er kunnen rechthoekige of cilindervormige standaardvaten met een passend volume van een chemisch inert materiaal worden gebruikt, die geschikt zijn voor de densiteit, d.w.z. het aantal testwormen. Roestvrij staal, kunststof of glas kan worden gebruikt voor apparatuur die in contact komt met de testmedia. De testvaten moeten dusdanig zijn afgedekt dat de wormen niet kunnen ontsnappen, terwijl ze van voldoende lucht worden voorzien. Voor stoffen met een hoge adsorptiecoëfficiënt, zoals synthetische pyretroïden, kan het noodzakelijk zijn gesilaniseerd glas te gebruiken. In deze situaties moet de apparatuur na gebruik als afval worden verwijderd (49). Voorkomen moet worden dat radioactief gelabelde teststoffen en vluchtige chemische stoffen ontsnappen. Er moeten afscheiders (bv. gaswasflessen van glas) met geschikte absorptiemiddelen worden gebruikt om eventuele residuen die uit de testvaten verdampen, op te vangen.

Grond

20. De testgrond moet van een dusdanige kwaliteit zijn dat de testorganismen kunnen overleven en, bij voorkeur, zich kunnen voortplanten gedurende de acclimatiserings- en testperioden, zonder een abnormaal uiterlijk te hebben of abnormaal gedrag te vertonen. De wormen moeten boortunnels in de grond maken.

21. De kunstmatige grond die in hoofdstuk C.8 van deze bijlage (48) wordt beschreven, is het aanbevolen substraat in de tests. Aanhangsel 4 beschrijft de voorbereiding van de kunstmatige grond voor gebruik in de bioaccumulatietests en geeft aanbevelingen voor de opslag van kunstmatige grond. Luchtgedroogde kunstmatige grond kan bij kamertemperatuur tot gebruik worden bewaard.

22. Natuurlijke grond van niet-verontreinigde terreinen kan echter ook als test- en/of kweeksubstraat dienen. Natuurlijke grond moet worden gekarakteriseerd met ten minste de oorsprong (plaats van verzameling), pH, gehalte aan organische koolstof, deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei), het maximale waterhoudende vermogen (WHC_{max}) en het procentuele watergehalte (3). Analyse van de grond of de bestanddelen ervan op microverontreinigingen vóór gebruik levert in dit verband nuttige informatie op. Indien grond van landbouwvelden wordt gebruikt, mag de grond gedurende ten minste één jaar niet met gewasbeschermingsproducten of met mest van behandelde dieren en gedurende ten minste zes maanden vóór de monstername niet met organische meststoffen behandeld zijn (50). Manipulatieprocedures voor natuurlijke grond vóór het gebruik ervan in ecotoxicologische tests met *Oligochaetae* in het laboratorium zijn beschreven in (3). Voor natuurlijke grond moet de opslagtijd in het laboratorium zo kort mogelijk worden gehouden.

Het aanbrengen van de teststof

23. De teststof wordt in de grond gebracht. De fysisch-chemische eigenschappen van de teststof moeten in aanmerking worden genomen. Een in water oplosbare teststof moet volledig in water opgelost zijn voordat de stof met de grond wordt vermengd. Als verrijkingsprocedure voor moeilijk in water oplosbare teststoffen wordt aanbevolen een laag teststof aan te brengen op één of meer bestanddelen van de (kunstmatige) grond. Zo kan (een deel van) het kwartszand worden doordrenkt met een oplossing van de teststof in een geschikt organisch oplosmiddel, dat vervolgens langzaam wordt ingedampt.

▼M4

Vervolgens kan het met een laag van de teststof bedekte deel met de vochtige grond worden gemengd. Het grote voordeel van deze procedure is dat geen oplosmiddel in de grond terechtkomt. Bij gebruik van natuurlijke grond kan de teststof op de hierboven voor kunstmatige grond beschreven wijze worden toegevoegd aan een luchtgedroogd deel van de grond of door de vochtige grond worden geroerd, met vervolgens verdamping indien een solubilisator wordt gebruikt. In het algemeen moet zo veel mogelijk worden vermeden dat de vochtige grond in contact komt met oplosmiddelen. Er moet rekening worden gehouden met de volgende overwegingen (3):

— indien een ander oplosmiddel dan water wordt gebruikt, moet dit een middel zijn dat mengbaar is met water en/of kan worden afgedreven (bijvoorbeeld verdampt), waardoor alleen de teststof op de grond achterblijft;

— indien een oplosmiddelcontrolegroep wordt gebruikt, is een negatieve controle niet nodig. De oplosmiddelcontrolegroep moet de hoogste concentratie oplosmiddel bevatten die aan de grond is toegevoegd en het gebruikte oplosmiddel moet afkomstig zijn van dezelfde partij die voor het bereiden van de stamoplossing is gebruikt. De toxiciteit en vluchtigheid van het oplosmiddel alsmede de oplosbaarheid van de teststof in het gekozen oplosmiddel moeten de voornaamste criteria zijn op basis waarvan een geschikte solubilisator wordt gekozen.

24. Voor chemische stoffen die slecht in water en in organische oplosmiddelen oplosbaar zijn, kan, bijvoorbeeld met behulp van een vijzel en stamper, 2,0-2,5 g fijn gemalen kwartszand per testvat worden gemengd met de hoeveelheid teststof die nodig is om de gewenste testconcentratie te verkrijgen. Het mengsel van kwartszand en teststof wordt toegevoegd aan de vooraf bevochtigde grond en grondig gemengd met een passende hoeveelheid gedeïoniseerd water om het vereiste vochtgehalte te verkrijgen. Het uiteindelijke mengsel wordt over de testvaten verdeeld. De procedure wordt voor iedere testconcentratie herhaald en tevens wordt een passende controlegroep met 2,0-2,5 g fijn gemalen kwartszand per testvat bereid.

25. De concentratie van de teststof in de grond moet na verrijking worden bepaald. De homogene verdeling van de teststof in de grond moet worden gecontroleerd voordat de testorganismen worden toegevoegd. De verrijkingsmethode en de redenen voor het kiezen van een specifieke verrijkingsprocedure moeten worden gerapporteerd (24).

26. Idealiter moet een evenwicht tussen de grond- en de poriënwaterfase zijn bereikt voordat de organismen worden toegevoegd; een periode van vier dagen bij 20 °C wordt aanbevolen. Voor vele slecht in water oplosbare organische stoffen kan de tijd die nodig is om een echt evenwicht tussen geadsorbeerde en opgeloste fracties te bereiken, worden geteld in dagen of maanden. Afhankelijk van het doel van de studie, bijvoorbeeld wanneer de milieuomstandigheden moeten worden nagebootst, kan de verrijkte grond gedurende een langere periode „gerijpt” worden, bv. voor metalen drie weken bij 20 °C (22).

Kweken van de testorganismen

27. Wormen moeten bij voorkeur in een permanente laboratoriumcultuur worden gehouden. Richtsnoeren voor de laboratoriumkweekmethoden voor *Eisenia fetida* en *Eisenia andrei* en voor soorten „Enchytraeidae” zijn opgenomen in aanhangsel 5 (zie ook (48)(51)(52)).

28. De in de tests gebruikte wormen moeten vrij zijn van waarneembare ziekten, abnormaliteiten en parasieten.

UITVOERING VAN DE TEST

29. De testorganismen worden tijdens de opnamefase aan de teststof blootgesteld. De opnamefase duurt 14 dagen („Enchytraeidae”) of 21 dagen (regenwormen), tenzij aangetoond is dat een stationaire toestand is bereikt.

▼M4

30. Voor de eliminatiefase worden de wormen overgebracht naar grond die vrij is van teststof. Het eerste monster moet 4 tot 24 uur na het begin van de eliminatiefase worden genomen. Voorbeelden van bemonsteringsschema's voor een opnamefase van 21 dagen en een eliminatiefase van 21 dagen zijn opgenomen in aanhangsel 3.

Testorganismen

31. Voor vele soorten terrestrische „Enchytraeidae" is het individuele gewicht zeer laag (bv. 5-10 mg natgewicht voor *Enchytraeus albidus* en minder voor *Enchytraeus crypticus* of *Enchytraeus luxuriosus*); om de gewichtsmetingen en chemische analyse uit te voeren, kan het nodig zijn om de wormen van de duplotestvaten in een gezamenlijke groep te bundelen (d.w.z. alle wormen in een duplovat worden gebruikt om één analytisch meetresultaat voor het weefsel te verkrijgen). 20 individuele „Enchytraeidae" worden aan ieder duplovat toegevoegd en ten minste drie duplovaten moeten worden gebruikt. Als de analytische aantoonbaarheidsgrens van de teststof hoog is, zijn mogelijk meer wormen nodig. Voor testsoorten met een hoger individueel gewicht (*Eisenia fetida* en *Eisenia andrei*) kunnen duplovaten met één individu worden gebruikt.

32. De regenwormen die in een test worden gebruikt, moeten een vergelijkbaar gewicht hebben (bv. *Eisenia fetida* en *Eisenia andrei* moeten een individueel gewicht hebben van 250-600 mg). „Enchytraeidae" (bv. *Enchytraeus albidus*) moeten een lengte hebben van ongeveer 1 cm. Alle wormen die in een bepaalde test worden gebruikt, moeten van dezelfde bron afkomstig zijn en moeten volwassen dieren met een clitellum zijn (zie aanhangsel 5). Aangezien het gewicht en de leeftijd van een dier een effect kunnen hebben op de BAF-waarden (bv. vanwege een variërend vetgehalte en/of de aanwezigheid van eieren), moeten deze parameters nauwkeurig geregistreerd worden en in aanmerking worden genomen bij het interpreteren van de resultaten. Daarnaast kunnen tijdens de blootstellingsperiode cocons worden gevormd, die eveneens van invloed zullen zijn op de BAF-waarden. Het verdient aanbeveling vóór de test een deelsteekproef van de testwormen te wegen om een schatting van het gemiddelde nat- en drooggewicht te verkrijgen.

33. Om de afname van de teststofconcentratie in de grond tijdens de opnamefase te beperken, moet een grote grond-wormverhouding worden toegepast. Voor *Eisenia fetida* en *Eisenia andrei* wordt een minimale hoeveelheid van 50 g drooggewicht aan grond per worm aanbevolen en voor „Enchytraeidae" minimaal 10-20 g drooggewicht per testvat. De vaten moeten een grondlaag van 2-3 cm („Enchytraeidae") of 4-5 cm (regenwormen) bevatten.

34. De in een test gebruikte wormen worden uit de cultuur verwijderd („Enchytraeidae" bijvoorbeeld met behulp van een juwelierspincet). Volwassen dieren worden overgebracht naar onbehandelde testgrond om te acclimatiseren en worden gevoed (zie punt 36). Als de testomstandigheden verschillen van de cultuuromstandigheden, moet een acclimatiseringsfase van 24-72 uur volstaan om de wormen aan de testomstandigheden te laten wennen. Na acclimatisering worden de regenwormen gespoeld door ze naar glazen schalen (bv. petrischalen) met schoon water over te brengen, waarna ze worden gewogen en aan de testgrond worden toegevoegd. Voordat ze worden gewogen, moet overtollig water van de wormen worden verwijderd door ze voorzichtig tegen de rand van het schaaltje te houden of door ze voorzichtig droog te deppen met een licht bevochtigd papieren doekje.

35. Het graafgedrag van de testorganismen moet worden geobserveerd en geregistreerd. In tests met regenwormen beginnen de dieren (controle- en testgroep) gewoonlijk binnen enkele uren tunnels te graven; dit moet binnen 24 uur na inbrenging van de wormen in de testvaten worden gecontroleerd.

▼M4

Indien de regenwormen geen tunnels in de grond graven (bv. meer dan 10 % gedurende meer dan de helft van de opnamefase), duidt dit erop dat de testomstandigheden niet passend zijn of dat de testorganismen niet gezond zijn. In een dergelijk geval moet de test worden stopgezet en herhaald. „Enchytraeidae" leven voornamelijk in de interstitiële poriën van de grond en vaak komt hun integument slechts gedeeltelijk in aanraking met het omringende substraat; de blootstelling van gravende en niet gravende „Enchytraeidae" wordt verondersteld equivalent te zijn en indien de „Enchytraeidae" niet graven, wil dat niet noodzakelijkerwijs zeggen dat de test moet worden herhaald.

Voeding

36. Als grond met een laag totaal gehalte aan organische koolstof wordt gebruikt, moet worden overwogen voeding toe te dienen. Bij gebruik van kunstmatige grond wordt een wekelijks rantsoen (d.w.z. de wormen moeten eenmaal per week worden gevoed) van 7 mg gedroogde mest per g grond (drooggewicht) voor regenwormen en een wekelijks rantsoen van 2-2,5 mg gemalen havervlokken per g grond (drooggewicht) voor „Enchytraeidae" aanbevolen (11). Het eerste rantsoen moet net voordat de testorganismen worden toegevoegd, met de grond worden vermengd. Bij voorkeur moet dezelfde soort voeding worden gebruikt als de voeding die in de culturen wordt gebruikt (zie aanhangsel 5).

Licht en temperatuur

37. De tests moeten worden uitgevoerd bij een gecontroleerde cyclus van 16 uur licht en 8 uur donker, met bij voorkeur 400 tot 800 lux in het gebied van de testvaten (3). De testtemperatuur moet gedurende de gehele test 20 ± 2 °C zijn.

Testconcentraties

38. Er wordt gebruikgemaakt van één concentratie. Situaties waarin één of meer aanvullende concentraties nodig zijn, moeten worden gemotiveerd. Indien de toxiciteit (EC_x) van de teststof dicht bij de analytische aantoonbaarheidsgrens ligt, verdient het aanbeveling om een radioactief gelabelde teststof met een hoge specifieke radioactiviteit te gebruiken. Voor metalen moet de concentratie hoger zijn dan het achtergrondniveau in weefsel en grond.

Duplo's

39. Voor de kinetische metingen (opname- en eliminatiefase) moeten er per bemonsteringspunt minimaal drie behandelde duplovaten zijn. Het totale aantal bereide duplo's moet voldoende zijn voor alle bemonsteringstijdstippen tijdens de opname- en eliminatiefase.

40. Voor de biologische waarnemingen en metingen (bv. de verhouding tussen nat- en drooggewicht, het vetgehalte) en voor de analyse van achtergrondconcentraties in wormen en grond moeten ten minste twaalf duplovaten van een negatieve controlegroep (vier monsternamen aan het begin, vier aan het eind van de opnamefase en vier aan het eind van de eliminatiefase) beschikbaar zijn, indien geen ander oplosmiddel dan water wordt gebruikt. Indien een solubilisator wordt gebruikt om de teststof aan te brengen, moet in aanvulling op de met teststof behandelde duplo's een oplosmiddelcontrole worden uitgevoerd (vier duplovaten moeten aan het begin worden bemonsterd, vier aan het eind aan de opnamefase en vier aan het eind van de eliminatiefase) waarbij alle bestanddelen behalve de teststof worden gebruikt. In dat geval kan ook worden gezorgd voor vier aanvullende duplovaten van een negatieve controlegroep (geen oplosmiddel) voor facultatieve monstername aan het eind van de opnamefase. Deze duplo's kunnen biologisch worden vergeleken met de oplosmiddelcontrolegroep om informatie te verkrijgen over een mogelijk effect van het oplosmiddel op de testorganismen. Het verdient aanbeveling te zorgen voor een voldoende aantal aanvullende reserveduplovaten (bv. acht) voor zowel de testgroep als de controlegroep(en).

▼M4

Frequentie van de metingen van de grondkwaliteit

41. Aan het begin en aan het eind van de opname- en eliminatiefase worden de pH van de grond, het vochtgehalte van de grond en de temperatuur (continu) in de testruimte gemeten. Eenmaal per week wordt het vochtgehalte van de grond gecontroleerd door de testvaten te wegen en de meetwaarden met het initiële gewicht aan het begin van de test te vergelijken. Waterverliezen moeten worden gecompenseerd door gedeïoniseerd water toe te voegen.

Bemonstering en analyse van de wormen en de grond

42. Een voorbeeld van een schema voor de opname- en eliminatiefasen van bioaccumulatietests met regenwormen en „Enchytraeidae" is opgenomen in aanhangsel 3.

43. De grond in de testvaten wordt bemonsterd om de concentratie teststof vóór toevoeging van de wormen en tijdens de opname- en eliminatiefasen te bepalen. Tijdens de test worden de concentraties teststof in de wormen en de grond bepaald. In het algemeen worden totale grondconcentraties gemeten. Facultatief kunnen concentraties in poriënwater worden gemeten; in dat geval moeten voor aanvang van het onderzoek een motivering en passende methoden worden opgegeven, die tevens in het verslag worden opgenomen.

44. De wormen en grond worden tijdens de opname- en eliminatiefasen op minimaal zes momenten bemonsterd. Indien de stabiliteit van een teststof is aangetoond, kan het aantal grondanalysen worden verminderd. Het verdient aanbeveling om ten minste drie duplo's aan het begin en aan het eind van de opnamefase te analyseren. Als de concentratie in de grond die aan het eind van de opnamefase wordt gemeten, meer dan 30 % afwijkt van de initiële concentratie, moeten de grondmonsters die op andere dagen zijn genomen ook worden geanalyseerd.

45. De wormen van een duplo moeten bij iedere monstername uit de grond worden verwijderd (bv. door de grond van een duplovat over een ondiepe schaal te verspreiden en de wormen met een zacht juwelierspincet op te pakken) en vervolgens snel met water worden gespoeld in een ondiepe glazen of stalen schaal. Overtollig water moet worden verwijderd (zie punt 34). De wormen worden vervolgens voorzichtig overgebracht naar een van tevoren gewogen vat en onmiddellijk gewogen, inclusief darminhoud.

46. De regenwormen (*Eisenia* spp.) ontlasten vervolgens 's nachts hun darmen, bv. op een vochtig stuk filterpapier in een afgedekte petrischaal (zie punt 34). Nadat de wormen hun darmen hebben ontlast, wordt het gewicht van de wormen bepaald om een eventuele vermindering van biomassa tijdens de test te beoordelen (zie geldigheidscriteria in punt 17). Het wegen en de weefselanalyse van „Enchytraeidae" wordt uitgevoerd zonder dat de dieren hun darmen hebben ontlast, aangezien dit in technisch opzicht moeilijk is vanwege de geringe omvang van deze wormen. Nadat het uiteindelijke gewicht is bepaald, moeten de wormen onverwijld worden gedood door middel van de meest passende methode (bv. met gebruikmaking van vloeibare stikstof of door bevriezen bij temperaturen onder – 18 °C).

47. Tijdens de eliminatiefase vervangen de wormen verontreinigde darminhoud met schone grond. Dit betekent dat onmiddellijk vóór de eliminatiefase genomen monsters van wormen die zich niet hebben ontlast („Enchytraeidae" in dit geval) verontreinigde darminhoud bevatten. Voor aquatische *Oligochaetae* wordt aangenomen dat het merendeel van de verontreinigde darminhoud na de eerste 4 tot 24 uur van de eliminatiefase door schoon sediment is vervangen, zie bv. (46). In studies naar de accumulatie van radioactief gelabeld cadmium en zink zijn vergelijkbare bevindingen voor regenwormen gerapporteerd (78). In de „Enchytraeidae" die zich niet hebben ontlast, kan de concentratie van dit eerste monster van de eliminatiefase worden beschouwd als de weefselconcentratie na ontlasting van de darm. Om rekening te houden met de verdunning van de teststofconcentratie door opname van niet-verontreinigde grond tijdens de eliminatiefase, kan het gewicht van de darminhoud worden geschat op basis van de verhouding natgewicht/asgewicht van de worm of de verhouding drooggewicht/asgewicht van de worm.

▼M4

48. De grond- en wormmonsters moeten bij voorkeur onmiddellijk na verwijdering (d.w.z. binnen één-twee dagen) worden geanalyseerd om ontbinding of andere verliezen te voorkomen en het verdient aanbeveling om de opname- en eliminatiesnelheden bij benadering te berekenen naarmate de test vordert. Als de analyse met vertraging plaatsvindt, moeten de monsters op passende wijze worden bewaard, bv. diepgevroren (≤ – 18 °C).

49. Gecontroleerd moet worden of de precisie en reproduceerbaarheid van de chemische analyse alsmede de recovery van de teststof uit de grond- en wormmonsters toereikend zijn voor de gebruikte methode; de extractie-efficiëntie, de aantoonbaarheidsgrens (LOD) en de bepaalbaarheidsgrens (LOQ) moeten worden gerapporteerd. Ook moet worden gecontroleerd of de teststof in de controlevaten niet detecteerbaar is in hogere concentraties dan de achtergrondconcentratie. Indien bij de controlewormen de concentratie van de teststof in het testorganisme $C_a > 0$, moet hiermee rekening worden gehouden bij de berekening van de kinetische parameters (zie aanhangsel 2). Alle monsters moeten tijdens de gehele test dusdanig worden gehanteerd dat verontreiniging en verlies (bv. ten gevolge van adsorptie van de teststof aan het bemonsteringshulpmiddel) tot een minimum worden beperkt.

50. Bij gebruik van radioactief gelabelde teststoffen is het mogelijk om de oorspronkelijke stof en de metabolieten te analyseren. Kwantificering van de oorspronkelijke teststof en de metabolieten in stationaire toestand of aan het eind van de opnamefase levert belangrijke informatie op. De monsters worden vervolgens „opgeschoond”, zodat de oorspronkelijke teststof afzonderlijk kan worden gekwantificeerd. Indien individuele metabolieten een radioactiviteit van meer dan 10 % van de totale radioactiviteit hebben, wordt aanbevolen deze metabolieten te identificeren.

51. De totale recovery en de teststofrecovery in wormen, grond en, indien gebruikt, in afscheiders met absorptiemiddelen om verdampte teststof op te vangen, moeten worden geregistreerd en gerapporteerd.

52. Bundeling van de bemonsterde individuen uit een bepaald testvat is aanvaardbaar voor „Enchytraeidae” die kleiner zijn dan regenwormen. Indien door de bundeling het aantal duplo’s afneemt, beperkt dit de statistische procedures die op de gegevens kunnen worden toegepast. Indien het nodig is een specifieke statistische procedure toe te passen of een bepaald statistisch onderscheidingsvermogen te bereiken, moet de test, rekening houdend met die bundeling, die procedure en dat onderscheidingsvermogen, met een voldoende aantal duplotestvaten worden uitgevoerd.

53. Het verdient aanbeveling om de BAF uit te drukken als functie van het totale drooggewicht en, indien nodig (d.w.z. voor zeer hydrofobe chemische stoffen), als functie van het vetgehalte. Er moeten geschikte methoden worden toegepast om het vetgehalte te bepalen (sommige bestaande methoden — bv. (31)(58) — moeten hiervoor worden aangepast). Bij deze methoden wordt gebruikgemaakt van een chloroform/methanol-extractietechniek. Om het gebruik van gechloreerde oplosmiddelen te vermijden, moet echter een aangepaste versie van de methode van Bligh en Dyer (9), als beschreven in (17), worden gebruikt. Aangezien de verschillende methoden verschillende resultaten kunnen opleveren, is het van belang dat bijzonderheden over de gebruikte methode worden verstrekt. De vetanalyse moet, indien mogelijk, d.w.z. als voldoende wormweefsel voorhanden is, worden uitgevoerd op hetzelfde monster of extract als voor de analyse van de teststof wordt gebruikt — de vetten moeten immers meestal toch worden verwijderd alvorens het extract chromatografisch kan worden geanalyseerd (49). Als alternatief kunnen controledieren worden gebruikt om het vetgehalte te meten, dat vervolgens gebruikt kan worden om de BAF-waarden te normaliseren. Deze laatstgenoemde aanpak vermindert de verontreiniging van apparatuur met de teststof.

▼M4

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

54. De opnamecurve van de teststof wordt verkregen door de concentratie in/op de wormen tijdens de opnamefase uit te zetten tegen de tijd in een lineair coördinatenstelsel. Wanneer de curve een plateau, of stationaire toestand, heeft bereikt (zie definities in aanhangsel 1), wordt de bioaccumulatiefactor in stationaire toestand, BAF_{ss}, berekend op basis van:

$$\frac{C_a \text{ in stationaire toestand of aan het eind van de opnamefase (gemiddeld)}}{C_s \text{ in stationaire toestand of aan het eind van de opnamefase (gemiddeld)}}$$

C_a is de concentratie van teststof in het testorganisme

C_s is de concentratie van teststof in de grond

55. Indien geen stationaire toestand wordt bereikt, moet in plaats van de BAF_{ss} de BAF_K op basis van de snelheidsconstanten worden bepaald, en wel als volgt:

— de accumulatiefactor (BAF_K) wordt bepaald als de verhouding k_s/k_e;

— de opname- en eliminatiesnelheden worden bij voorkeur tegelijkertijd bepaald (zie vergelijking [11] in aanhangsel 2);

— de eliminatiesnelheidsconstante (k_e) wordt gewoonlijk bepaald op basis van de eliminatiecurve (d.w.z. de uitgezette concentratie van de teststof in de wormen tijdens de eliminatiefase). De opnamesnelheidsconstante k_s wordt vervolgens berekend met de bekende k_e en een waarde van C_a die wordt afgeleid van de opnamecurve — zie aanhangsel 2 voor een beschrijving van deze methoden. Het verdient de voorkeur BAF_K en de snelheidsconstanten k_s en k_e te berekenen met behulp van een gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechniek. Als de eliminatie duidelijk niet van de eerste orde is, moeten complexere modellen worden toegepast.

Testverslag

56. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— alle beschikbare informatie met betrekking tot acute toxiciteit of toxiciteit op lange termijn (bv. EC_x, LC_x, NOEC) van de teststof voor in de bodem levende *Oligochaetae*;

— zuiverheid, fysische aard en fysisch-chemische eigenschappen, bv. log K_{ow}, oplosbaarheid in water;

— chemische identificatiegegevens, bron van de teststof, identiteit en concentratie van eventueel gebruikte oplosmiddelen;

— indien radioactief gelabelde teststof wordt gebruikt, de precieze positie van de gelabelde atomen, de specifieke radioactiviteit en de radiochemische zuiverheid.

Diersoort:

— wetenschappelijke naam, stam, oorsprong, eventuele voorafgaande behandeling, acclimatisatie, leeftijd, grootte-interval enz.

▼M4

Testomstandigheden:

— gebruikte testprocedure;

— aard en kenmerken van de gebruikte verlichting en de fotoperiode(s);

— testopzet (bv. aantal en grootte van de testvaten, grondmassa en hoogte van de grondlaag, aantal duplo's, aantal wormen per duplo, aantal testconcentraties, duur van de opname- en de eliminatiefase, frequentie van de bemonstering);

— motivering van de keuze van het testvatmateriaal;

— methode voor het bereiden en aanbrengen van de teststof en de redenen voor het kiezen van een specifieke methode;

— de nominale testconcentraties, de gemiddelden en standaardafwijkingen van de in de testvaten gemeten waarden en de methode waarmee deze waarden zijn bepaald;

— bron van de bestanddelen van de kunstmatige grond of — bij gebruik van natuurlijke media — oorsprong van de grond, beschrijving van eventuele voorbehandeling, resultaten van de controles (overleven, biomassaontwikkeling, voortplanting), grondkenmerken (pH, totale gehalte aan organische koolstof, deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei), het maximale waterhoudende vermogen (WHC_{max}), het procentuele watergehalte aan het begin en aan het eind van de test en eventuele andere verrichte metingen);

— gedetailleerde informatie over de verwerking van grond- en wormmonsters, met inbegrip van details van de bereiding, opslag, verrijkingsprocedures, extractie en analyseprocedures (en -precisie) voor de teststof in wormen en grond alsmede het vetgehalte (indien gemeten) en de recovery van de teststof.

Resultaten:

— sterfte van de controlewormen en de wormen in elk testvat alsmede ieder waargenomen abnormaal gedrag (bv. vermijding van de grond, uitblijven van voortplanting in een bioaccumulatietest met „Enchytraeidae");

— de verhouding tussen drooggewicht en natgewicht van de grond en de testorganismen (nuttig voor normalisatie);

— het natgewicht van de wormen op ieder bemonsteringstijdstip; voor regenwormen, het natgewicht bij het begin van de test en op ieder bemonsteringstijdstip voor en na het ontlasten van de darm;

— het vetgehalte van de testorganismen (indien bepaald);

— grafieken van de opname- en eliminatiekinetiek van de teststof in de wormen en van de tijd tot de stationaire toestand;

— C_a en C_s (met standaardafwijking en bereik, indien van toepassing) voor alle bemonsteringstijdstippen (C_a uitgedrukt in g kg^{-1} nat- en drooggewicht van het hele lichaam, C_s uitgedrukt in g kg^{-1} nat- en drooggewicht van de grond). Indien een biota-grondaccumulatiefactor (BSAF) nodig is (bv. om de resultaten van twee of meer tests die met dieren met een ander vetgehalte zijn uitgevoerd, te kunnen vergelijken), kan C_a aanvullend worden uitgedrukt in g kg^{-1} vetgehalte van het organisme en kan C_s worden uitgedrukt in g kg^{-1} organische koolstof (OC) van de grond;

— BAF (uitgedrukt in kg grond·kg^{-1} worm), de grondopnamesnelheidsconstante k_s (uitgedrukt in g grond kg^{-1} van worm dag^{-1}) en de eliminatiesnelheidsconstante k_e (uitgedrukt in dag^{-1}); BSAF (uitgedrukt in kg OC in de grond kg^{-1} vetgehalte van de worm) kan aanvullend worden gerapporteerd;

▼M4

— indien gemeten: percentages van de oorspronkelijke stof, metabolieten en gebonden residuen (d.w.z. het percentage van de teststof dat niet geëxtraheerd kan worden met normale extractiemethoden) die in grond en testdieren zijn aangetoond;

— methoden die zijn gebruikt voor de statistische analyse van gegevens.

Evaluatie van de resultaten:

— overeenstemming van de resultaten met de in punt 17 vermelde geldigheidscriteria;

— onverwachte of ongewone resultaten, bv. onvolledige eliminatie van de teststof uit de testdieren.

LITERATUUR:

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlijn Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Parijs, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd, Nederland, pp. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Verordening (EG) nr. 1907/2006 van het Europees Parlement en de Raad van 18 december 2006 inzake de registratie en beoordeling van en de autorisatie en beperkingen ten aanzien van chemische stoffen (REACH), tot oprichting van een Europees Agentschap voor chemische stoffen, houdende wijziging van Richtlijn 1999/45/EG en houdende intrekking van Verordening (EEG) nr. 793/93 van de Raad en Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie alsmede Richtlijn 76/769/EEG van de Raad en de Richtlijnen 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG en 2000/21/EG van de Commissie (PB L 396 van 30.12.2006, blz. 1).

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Kan worden gedownload op: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼**M4**

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berliin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen.

(49) Hoofdstuk C.13 van deze bijlage, Bioconcentratie: doorstroomtest met vissen.

(50) Hoofdstuk C.21 van deze bijlage, Micro-organismen in de bodem: bepaling van de omzetting van stikstof.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93-100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557-2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation — Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, maart 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structureactivity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼M4

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Bioaccumulatie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme ten opzichte van de concentratie van de teststof in het omringende medium. Bioaccumulatie is het gevolg van zowel bioconcentratie- als biomagnificatieprocessen (zie hieronder).

Bioconcentratie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme ten gevolge van de opname van de chemische stof uit uitsluitend het omringende medium (d.w.z. via het lichaamsoppervlak en ingenomen grond) ten opzichte van de concentratie van de teststof in het omringende medium.

Biomagnificatie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme ten gevolge van voornamelijk de opname van verontreinigde voeding of prooi ten opzichte van de concentratie van de teststof in de voeding of prooi. Biomagnificatie kan leiden tot een overdracht of accumulatie van de teststof binnen voedselketens.

De **eliminatie** van een teststof is het verlies van die stof uit het weefsel van het testorganisme door actieve of passieve processen die optreden ongeacht of de teststof in het omringende medium aanwezig is.

De **bioaccumulatiefactor** (BAF) op enig moment van de opnamefase van deze bioaccumulatietest, is de verhouding tussen de concentratie van de teststof in of op het testorganisme (C_a in g kg^{-1} drooggewicht van worm) en de concentratie van die stof in het omringende medium (C_s in g kg^{-1} drooggewicht van grond); de BAF heeft als eenheden kg grond·kg^{-1} worm.

De **bioaccumulatiefactor in stationaire toestand** (BAF_{ss}) is de BAF in stationaire toestand en ondergaat gedurende langere tijd geen significante wijzigingen als de concentratie van de teststof in het omringende medium (C_s in g kg^{-1} drooggewicht van grond) constant blijft tijdens deze periode.

Bioaccumulatiefactoren die rechtstreeks op basis van de verhouding tussen de grondopnamesnelheidsconstante en de eliminatiesnelheidsconstante (k_s en k_e, zie hieronder) worden berekend, worden aangeduid met de term kinetische bioaccumulatiefactor (BAF_K).

De **biota-grondaccumulatiefactor** (BSAF) is de verhouding tussen de voor vetgehalte genormaliseerde concentratie van de teststof in of op het testorganisme en de voor organische koolstof genormaliseerde concentratie van de teststof in de grond in stationaire toestand. C_a wordt vervolgens uitgedrukt als g kg^{-1} vetgehalte van het organisme en C_s als g kg^{-1} organisch materiaal in de grond; de BSAF heeft als eenheden kg OC·kg^{-1} vet.

Een **plateau** of **stationaire toestand** wordt gedefinieerd als het evenwicht tussen de opname- en eliminatieprocessen die gelijktijdig optreden tijdens de blootstellingsfase. De stationaire toestand wordt bereikt wanneer in een grafiek van de BAF als functie van de tijd de curve evenwijdig gaat lopen met de tijdas en drie opeenvolgende bepalingen van BAF op monsters die met tussenpozen van ten minste twee dagen worden genomen, niet meer dan 20 % van elkaar verschillen en er bovendien geen statistisch significant verschil bestaat tussen de waarden verkregen op de drie bemonsteringstijdstippen. Voor teststoffen die langzaam worden opgenomen, verdient het de voorkeur om intervallen van zeven dagen te gebruiken (49).

De **organischekoolstof-water-verdelingscoëfficiënt** (K_{oc}) is de verhouding tussen de concentratie van een stof in of op de fractie organische koolstof van een substraat en de concentratie van die stof in water in een toestand van evenwicht.

De **octanol-water-verdelingscoëfficiënt** (K_{ow}) is de verhouding tussen de oplosbaarheid van een stof in n-octanol en water bij evenwicht; deze verhouding wordt soms ook uitgedrukt als P_{ow}. Het logaritme van K_{ow} (log K_{ow}) wordt gebruikt als een indicatie van het bioaccumulatiepotentieel van een chemische stof door in het water levende organismen.

▼M4

De **blootstellings- of opnamefase** is de periode gedurende welke de testorganismen aan de teststof worden blootgesteld.

De **grondopnamesnelheidsconstante** (k_s) is de numerieke waarde die aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in of op de testorganismen toeneemt ten gevolge van de opname uit de grondfase. k_s wordt uitgedrukt in g grond kg^{-1} van worm d^{-1}.

De **eliminatiefase** is de periode die begint op het moment waarop de testorganismen van een medium dat de teststof bevat worden overgebracht naar een medium dat die stof niet bevat, en gedurende welke de eliminatie (of het nettoverlies) van de teststof uit het testorganisme wordt bestudeerd.

De **eliminatiesnelheidsconstante** (k_e) is de numerieke waarde die de snelheid aangeeft waarmee de concentratie van de teststof in of op het testorganisme afneemt na overbrenging van de testorganismen uit een medium dat de teststof bevat naar een medium dat de teststof niet bevat; k_e wordt uitgedrukt in d^{-1}.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M4

Aanhangsel 2

Berekening van opname- en eliminatieparameters

Het belangrijkste eindpunt van een bioaccumulatietest is de bioaccumulatiefactor, BAF. De gemeten BAF kan worden berekend door de concentratie in het testorganisme, C_a, te delen door de concentratie in de grond, C_s, in stationaire toestand. Indien de stationaire toestand tijdens de opnamefase niet wordt bereikt, wordt de BAF_K berekend op basis van de snelheidsconstanten in plaats van BAF_{SS}. Er dient echter opgetekend te worden of de BAF al dan niet gebaseerd is op concentraties in stationaire toestand.

De gangbare manier voor het verkrijgen van de kinetische bioaccumulatiefactor (BAF_K), de grondopnamesnelheidsconstante (k_s) en de eliminatiesnelheidsconstante (k_e) is om gebruik te maken van gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechnieken, bv. op basis van de in (68) beschreven modellen. Op basis van de aan de tijd gerelateerde concentratiegegevens en modelvergelijkingen:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(Vergelijking [1])}$$

of

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(Vergelijking [2])}$$

waarbij

C_a = concentratie van de chemische stof in wormen [g kg^{-1} nat- of drooggewicht];

k_s = opnamesnelheidsconstante in weefsel [g grond kg^{-1} worm d^{-1}];

C_s = concentratie van de chemische stof in grond [g kg^{-1} nat- of drooggewicht];

k_e = eliminatiesnelheidsconstante [d^{-1}];

t_c = tijd aan het eind van de opnamefase,

berekenen deze computerprogramma's waarden voor BAF_K, k_s en k_e.

Indien de achtergrondconcentratie in de niet-blootgestelde wormen bijvoorbeeld op dag 0 significant afwijkt van nul (dit kan bv. het geval zijn voor metalen), moet met deze achtergrondconcentratie ($C_{a,0}$) rekening worden gehouden in deze vergelijkingen, zodat ze aldus luiden:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(Vergelijking [3])}$$

en

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(Vergelijking [4])}$$

In gevallen waarin een significante afname van concentratie van de teststof in de grond wordt waargenomen gedurende het verloop van de opnamefase, kunnen de volgende modellen worden gebruikt, bv. (67)(79):

$$C_s = C_0(e^{-k0}{}^{t}) \qquad \text{(Vergelijking [5])}$$

▼M4

waarbij

C_s = concentratie van de chemische stof in grond [g kg^{-1} nat- of drooggewicht];

k_0 = afbraaksnelheidsconstante in grond [d^{-1}];

C_0 = initiële concentratie van de chemische stof in grond [g kg^{-1} nat- of droog-gewicht];

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(Vergelijking [6])}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{(Vergelijking [7])}$$

waarbij

C_a = concentratie van de chemische stof in wormen [g kg^{-1} nat- of drooggewicht];

k_s = opnamesnelheidsconstante in weefsel [g grond kg^{-1} worm d^{-1}];

k_0 = afbraaksnelheidsconstante in grond [d^{-1}];

k_e = eliminatiesnelheidsconstante [d^{-1}];

t_c = tijd aan het eind van de opnamefase.

Indien de stationaire toestand wordt bereikt tijdens de opnamefase (d.w.z. $t = \infty$), kan vergelijking [1]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(Vergelijking [1])}$$

worden gereduceerd tot:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

of

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{(Vergelijking [8])}$$

Hierbij benadert $k_s/k_e \times C_s$ de concentratie van de teststof in het wormweefsel in stationaire toestand ($C_{a,ss}$).

De biota-grondaccumulatiefactor (BSAF) kan als volgt worden berekend:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{(Vergelijking [9])}$$

waarbij f_{oc} de fractie organische koolstof in de grond is en f_{lip} de fractie wormvet, beide bij voorkeur bepaald op monsternamen tijdens de test en op basis van respectievelijk droog- of natgewicht.

De eliminatiekinetiek kan worden gemodelleerd met gebruikmaking van de gegevens uit de eliminatiefase en door de volgende modelvergelijking en een gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingsmethode toe te passen. Als de tegen de tijd uitgezette gegevens wijzen op een constante exponentiële afname van de concentratie van de teststof in de dieren, kan een een-compartimentmodel (vergelijking [9]) worden gebruikt om het tijdverloop van de eliminatie te beschrijven.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{(Vergelijking [10])}$$

▼M4

Eliminatieprocessen lijken soms uit twee fasen te bestaan in de zin dat ze tijdens de eerste fasen een snelle afname van C_a vertonen, waarna dit verandert in een langzamer verlies van teststoffen in de latere fasen van de eliminatie, bv. (27)(68). De twee fasen kunnen worden verklaard aan de hand van de aanname dat er twee verschillende compartimenten in het organisme zijn, waaruit de teststof met verschillende snelheden verloren gaat. In deze gevallen moet specifieke literatuur worden bestudeerd, bv. (38)(39)(40)(78).

Met gebruikmaking van de bovenstaande modelvergelijkingen kunnen de kinetische parameters (k_s en k_e) ook worden berekend in één uitvoering van de test door het eersteordekinetiekmodel op alle gegevens van zowel de opname- als de eliminatiefase tegelijk toe te passen. Voor een beschrijving van een methode die een dergelijke gecombineerde berekening van opname- en eliminatiesnelheidsconstanten mogelijk maakt, kunnen (41), (73) en (70) worden geraadpleegd.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_e)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{(Vergelijking [11])}$$

Noot: Bij gelijktijdige schatting van de opname- en eliminatieparameters op basis van de gecombineerde opname- en eliminatiegegevens is „m” in vergelijking [11] een descriptor waarmee het computerprogramma de deeltermen van de vergelijking kan toewijzen aan de datasets van de desbetreffende fase en de vergelijking correct kan uitvoeren (m = 1 voor opnamefase; m = 2 voor eliminatiefase).

Deze modelvergelijkingen moeten echter met voorzichtigheid worden gebruikt, in het bijzonder indien tijdens de test de biobeschikbaarheid van de teststof verandert of (biologische) afbraak optreedt (zie bv. (79)).

▼M4

Aanhangsel 3

VOORBEELDEN VAN SCHEMA'S VOOR TESTS OP BIOACCUMULATIE IN DE BODEM

Regenwormtest

a) Opnamefase met 8 bemonsteringsdata die voor de berekening van de kinetiek worden gebruikt

Dag	Activiteit
– 6	Voorbereide grond gedurende 48 uur conditioneren.
– 4	De grondfractie verrijken met de oplossing met de teststof; eventueel oplosmiddel verdampen; grondbestanddelen vermengen; grond over de testvaten verdelen; equilibratie bij testomstandigheden gedurende vier dagen (drie weken voor met metaal verrijkte grond).
– 3 tot – 1	Testorganismen uit de cultuur nemen voor acclimatisering; grondbestanddelen bereiden en bevochtigen.
0	Temperatuur en pH van de grond meten; grondmonsters uit testvaten en oplosmiddelcontrolevaten nemen om de concentratie van de teststof te bepalen; voedingsrantsoen toevoegen; wormen wegen en gerandomiseerd over de testvaten verdelen; voldoende deelmonsters van wormen achterhouden voor de bepaling van analytische achtergrondwaarden, nat- en drooggewicht en vetgehalte; alle testvaten wegen om het vochtgehalte in de grond te controleren; luchttoevoer regelen indien een gesloten testsysteem wordt gebruikt.
1	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren, grond- en wormmonsters nemen om de concentratie van de teststof te bepalen.
2	Zelfde als dag 1.
3	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren.
4	Zelfde als dag 1.
5-6	Zelfde als dag 3.
7	Zelfde als dag 1; voedingsrantsoen toevoegen, vochtgehalte van de grond regelen door de testvaten opnieuw te wegen en verdampt water te compenseren.
8-9	Zelfde als dag 3.
10	Zelfde als dag 1.
11-13	Zelfde als dag 3.
14	Zelfde als dag 1; voedingsrantsoen toevoegen, vochtgehalte van de grond regelen door de testvaten opnieuw te wegen en verdampt water te compenseren.
15-16	Zelfde als dag 3.
17	Zelfde als dag 1.
18-20	Zelfde als dag 3.

▼**M4**

Dag	Activiteit
21	Zelfde als dag 1; temperatuur en pH van de grond meten; vochtgehalte regelen door de testvaten opnieuw te wegen; opnamefase beëindigen; wormen van resterende blootgestelde duplo's overbrengen naar vaten met schone grond voor de eliminatiefase (geen ontlasting van de darm); grond- en wormmonsters uit de oplosmiddelcontrolevaten nemen.
	Bij de planning van activiteiten die aan de blootstelling voorafgaan (equilibratiefase), moet rekening worden gehouden met de eigenschappen van de teststof.
	De voor dag 3 beschreven activiteiten moeten dagelijks worden uitgevoerd (althans op werkdagen).

b) Eliminatiefase

Dag	Activiteit
– 6	Grondbestanddelen bereiden en bevochtigen; bereide grond gedurende 48 uur conditioneren.
– 4	Grondbestanddelen mengen; grond over de testvaten verdelen; incubatie bij testomstandigheden gedurende vier dagen.
0 (eind van de opnamefase)	Temperatuur en pH van de grond meten; wormen wegen en gerandomiseerd over de testvaten verdelen; voedingsrantsoen toevoegen; wormen uit resterende blootgestelde duplo's overbrengen naar vaten met schone grond; na 4-6 uur grond- en wormmonsters nemen om de concentratie van de teststof te bepalen.
1	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren, grond- en wormmonsters nemen om de concentratie van de teststof te bepalen.
2	Zelfde als dag 1.
3	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren.
4	Zelfde als dag 1.
5-6	Zelfde als dag 3.
7	Zelfde als dag 1; voedingsrantsoen toevoegen, vochtgehalte van de grond regelen door de testvaten opnieuw te wegen en verdampt water te compenseren.
8-9	Zelfde als dag 3.
10	Zelfde als dag 1.
11-13	Zelfde als dag 3.
14	Zelfde als dag 1; voedingsrantsoen toevoegen, vochtgehalte van de grond regelen door de testvaten opnieuw te wegen en verdampt water te compenseren.
15-16	Zelfde als dag 3.
17	Zelfde als dag 1.

▼M4

Dag	Activiteit
18-20	Zelfde als dag 3.
21	Zelfde als dag 1; temperatuur en pH van de grond meten, vochtgehalte van de grond regelen door de testvaten opnieuw te wegen; grond- en wormmonsters uit oplosmiddelcontrolevaten nemen.
	De grond wordt voor aanvang van de eliminatiefase op dezelfde manier voorbereid als voor de opnamefase.
	De voor dag 3 beschreven activiteiten moeten dagelijks worden uitgevoerd (althans op werkdagen).

„Enchytraeidae”-test

a) Opnamefase met 8 bemonsteringsdata die voor de berekening van de kinetiek worden gebruikt

Dag	Activiteit
– 6	Voorbereide grond gedurende 48 uur conditioneren.
– 4	De grondfractie verrijken met de oplossing met de teststof; eventueel oplosmiddel verdampen; grondbestanddelen vermengen; grond over de testvaten verdelen; equilibratie bij testomstandigheden gedurende vier dagen (drie weken voor met metaal verrijkte grond).
– 3 tot – 1	Testorganismen uit de cultuur nemen voor acclimatisering; grondbestanddelen bereiden en bevochtigen.
0	Temperatuur en pH van de grond meten; grondmonsters uit testvaten en oplosmiddelcontrolevaten nemen om de concentratie van de teststof te bepalen; voedingsrantsoen aan de grond toevoegen; wormen wegen en gerandomiseerd over de testvaten verdelen; voldoende deelmonsters van wormen achterhouden voor de bepaling van analytische achtergrondwaarden, nat- en drooggewicht en vetgehalte; alle testvaten wegen om het vochtgehalte in de grond te controleren; luchttoevoer regelen indien een gesloten testsysteem wordt gebruikt.
1	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren, grond- en wormmonsters nemen om de concentratie van de teststof te bepalen.
2	Zelfde als dag 1.
3	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren.
4	Zelfde als dag 1.
5-6	Zelfde als dag 3.
7	Zelfde als dag 1; voedingsrantsoen aan de grond toevoegen, vochtgehalte van de grond regelen door de testvaten opnieuw te wegen en verdampt water te compenseren.
9	Zelfde als dag 1.
10	Zelfde als dag 3.

▼**M4**

Dag	Activiteit
11	Zelfde als dag 1.
12-13	Zelfde als dag 3.
14	Zelfde als dag 1; voedingsrantsoen aan de grond toevoegen; temperatuur en pH van de grond meten; vochtgehalte van de grond regelen door de testvaten opnieuw te wegen; opnamefase beëindigen; wormen van resterende blootgestelde duplo's overbrengen naar vaten met schone grond voor de eliminatiefase (geen ontlasting van de darm); grond- en wormmonsters uit de oplosmiddelcontrolevaten nemen.
	Bij de planning van activiteiten die aan de blootstelling voorafgaan (equilibratiefase), moet rekening worden gehouden met de eigenschappen van de teststof.
	De voor dag 3 beschreven activiteiten moeten dagelijks worden uitgevoerd (althans op werkdagen).

▼M4

Aanhangsel 4

Kunstmatige grond — Aanbevelingen voor de voorbereiding en opslag

Aangezien natuurlijke grond uit een bepaalde bron mogelijk niet het hele jaar beschikbaar is en inheemse organismen alsook de aanwezigheid van microverontreinigingen de test kunnen beïnvloeden, wordt de in hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen (48), beschreven kunstmatige grond aanbevolen voor gebruik in deze test. In deze grond kunnen meerdere testsoorten overleven, groeien en zich voortplanten en er wordt gezorgd voor maximale standaardisatie en intra- en interlaboratoriumvergelijkbaarheid van test- en cultuuromstandigheden.

Grondbestanddelen:

Turf:	10 %	veenmosturf, overeenkomstig OESO-richtlijn 207 (48);
Kwartszand:	70 %	industrieel kwartszand (luchtgedroogd); korrelgrootte: meer dan 50 % van de deeltjes moet in het bereik 50-200 μm zijn, maar alle deeltjes moeten ≤ 2 mm zijn;
Kaolienklei:	20 %	met kaoliengehalte ≥ 30 %;
Calciumcarbonaat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, verpulverd, chemisch zuiver.

Desgewenst kan het gehalte organische koolstof van de kunstmatige grond worden verlaagd, bv. door het turfgehalte te verminderen tot 4-5 % van de droge grond en de hoeveelheid zand dienovereenkomstig te verhogen. Door een dergelijke verlaging van het gehalte organische koolstof kan de hechting van de teststof aan de grond (organische koolstof) afnemen en kan de beschikbaarheid van de teststof voor de wormen toenemen (74). Aangetoond is dat *Enchytraeus albidus* en *Eisenia fetida* kunnen voldoen aan de geldigheidscriteria voor de voortplanting bij tests in veldgrond met een lager gehalte organische koolstof, bv. 2,7 % (33)(61), en de ervaring leert dat dit ook bereikt kan worden in kunstmatige grond met 5 % turf.

Voorbereiding

De droge bestanddelen van de grond worden grondig gemengd (bv. in een grote laboratoriummenger). Dit moet ongeveer één week voor aanvang van de test worden gedaan. De gemengde droge grondbestanddelen moeten ten minste 48 uur voordat de teststof wordt aangebracht, worden bevochtigd met gedeïoniseerd water om de zuurgraad te equilibreren/stabiliseren. Voor de bepaling van de pH moet een mengsel van grond en een oplossing van 1 M KCl in een verhouding van 1:5 worden gebruikt. Indien de pH-waarde niet binnen het vereiste bereik (6,0 ± 0,5) valt, wordt een voldoende hoeveelheid $CaCO_3$ aan de grond toegevoegd of wordt een nieuwe partij grond voorbereid.

Het maximale waterhoudende vermogen (WHC) van de kunstmatige grond wordt bepaald overeenkomstig ISO 11268-2 (35). Minimaal twee dagen voor aanvang van de test wordt de droge kunstmatige grond bevochtigd door genoeg gedeïoniseerd of synthetisch water toe te voegen om ongeveer de helft van het uiteindelijke watergehalte te verkrijgen. Het uiteindelijke watergehalte moet tussen 40 % en 60 % van het maximale waterhoudende vermogen (WHC) liggen. Bij aanvang van de test wordt de voorbevochtigde grond verdeeld in zoveel porties als het aantal testconcentraties en controles die voor de test gebruikt worden en wordt het vochtgehalte aangepast tot 40-60 % van WHC_{max} door de oplossing van de teststof te gebruiken en/of gedeïoniseerd of synthetisch water toe te voegen. Het vochtgehalte wordt aan het begin en aan het eind van de test (bij 105 °C) bepaald. Het moet optimaal zijn voor de behoeften van de diersoort (het vochtgehalte kan ook als volgt worden gecontroleerd: wanneer men de grond lichtjes in de hand knijpt, moeten kleine druppels water tussen de vingers verschijnen).

▼M4

Opslag

De droge bestanddelen van de kunstmatige grond kunnen tot gebruik bij kamertemperatuur worden bewaard. De voorbereide, voorbevochtigde grond kan voorafgaand aan de verrijking maximaal drie dagen op een koele plaats worden bewaard; hierbij moet de verdamping van water tot een minimum worden beperkt. Grond die met de teststof verrijkt is, moet onverwijld worden gebruikt, tenzij informatie beschikbaar is die erop duidt dat de grond in kwestie bewaard kan worden zonder dat dit van invloed is op de toxiciteit en biobeschikbaarheid van de teststof. Monsters van verrijkte grond kunnen vervolgens tot de analyse onder de voor de desbetreffende teststof aanbevolen omstandigheden worden bewaard.

▼M4

Aanhangsel 5

Aanbevolen soorten terrestrische *Oligochaetae* voor tests op bioaccumulatie in de bodem

Regenwormen

De aanbevolen testsoort is *Eisenia fetida* (Savigny 1826), die behoort tot de familie „Lumbricidae". Deze soort wordt sinds 1972 onderverdeeld in twee ondersoorten (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (10)). Volgens Jaenicke (36) gaat het om twee echte, afzonderlijke soorten. *Eisenia fetida* is gemakkelijk herkenbaar dankzij zijn felgele strepen tussen de segmenten, terwijl *Eisenia andrei* een egale, donkerrode kleur heeft. Oorspronkelijk zijn ze waarschijnlijk afkomstig uit het gebied rond de Zwarte Zee, maar tegenwoordig zijn ze wereldwijd verspreid, in het bijzonder in door de mens aangepaste habitats zoals composthopen. Beide soorten kunnen voor zowel ecotoxicologische als bioaccumulatietests worden gebruikt.

Eisenia fetida en *Eisenia andrei* zijn in de handel verkrijgbaar, bv. als visaas. In vergelijking met andere lumbricidenregenwormen hebben ze een korte levenscyclus en bereiken ze volwassenheid binnen ca. twee-drie maanden (bij kamertemperatuur). Hun optimale temperatuur is ongeveer 20-24 °C. Ze geven de voorkeur aan relatief vochtige substraten met een nagenoeg neutrale pH en een hoog gehalte aan organisch materiaal. Aangezien deze soorten al 25 jaar veelvuldig worden gebruikt in gestandaardiseerde ecotoxicologische tests, zijn hun kweekmethoden uitvoerig beschreven (48)(77).

Beide soorten kunnen worden gekweekt in een grote diversiteit aan dierlijke afvalstoffen. Het door de ISO (35) aanbevolen kweekmedium is een 50:50-mengsel van paarden- of rundermest en turf. Het medium moet een pH-waarde van ongeveer 6 tot 7 hebben (gereguleerd met calciumcarbonaat), een lage ionische geleidbaarheid (minder dan 6 mS/cm of minder dan 0,5 % zoutconcentratie) en mag niet overmatig verontreinigd zijn met ammonia of dierlijke urine. Tevens kan in de handel verkrijgbare tuinaarde die vrij is van additieven of kunstmatige grond overeenkomstig OESO (48) of een mengsel van beide in een verhouding van 50:50 worden gebruikt. Het substraat dient vochtig maar niet te nat te zijn. Kweekbakken met een volume van 10 tot 50 liter zijn geschikt.

Om wormen met een standaardleeftijd en -massa te verkrijgen kan de kweek het beste worden begonnen met cocons. Daartoe worden volwassen wormen in een kweekbak met vers substraat gestopt om cocons te produceren. De praktijk wijst uit dat een populatiedichtheid van ongeveer 100 volwassen wormen per kg substraat (natgewicht) tot goede voortplantingssnelheden leidt. Na 28 dagen worden de volwassen wormen verwijderd. De uit de cocons gekomen regenwormen worden na minimaal twee maanden, maar minder dan twaalf maanden, wanneer ze volwassen zijn, voor de tests gebruikt.

Wormen van de hierboven beschreven soorten kunnen als gezond worden beschouwd als ze zich door het substraat voortbewegen, niet proberen om het substraat te verlaten en zich voortdurend voortplanten. Zeer traag voortbewegen of een geel uiteinde aan de achterkant van de worm (in het geval van *Eisenia fetida*) duidt op uitputting van het substraat. In dat geval wordt vers substraat en/of een kleiner aantal dieren per bak aanbevolen.

Selectie van aanvullende literatuur

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology — from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

„Enchytraeidae"

De aanbevolen testsoort is *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (witte potworm). *Enchytraeus albidus* is een van de grootste soorten (tot 15 mm) van de tot de gelede wormen behorende *Oligochaetae*-familie van de „Enchytraeidae" en is wereldwijd verspreid, bv. (8). *Enchytraeus albidus* wordt aangetroffen in mariene, limnische en terrestrische habitats, hoofdzakelijk in ontbindend organisch materiaal (zeewier, compost) en zelden in weiden (42). Deze brede ecologische tolerantie en een aantal morfologische variaties duiden erop dat er mogelijk verschillende rassen voor deze soort bestaan.

Enchytraeus albidus is in de handel verkrijgbaar als voeding voor vissen. Gecontroleerd dient te worden of de cultuur verontreinigd is door andere, gewoonlijk kleinere soorten (60). Indien verontreiniging optreedt, moeten alle wormen met water worden gewassen in een petrischaal. Grote volwassen exemplaren van *Enchytraeus albidus* worden vervolgens geselecteerd (met behulp van een stereomicroscoop) om een nieuwe cultuur te beginnen. Alle andere wormen worden verwijderd. De levenscyclus van de worm is kort, aangezien volwassenheid wordt bereikt tussen 33 dagen (bij 18 °C) en 74 dagen (bij 12 °C). Enkel culturen die zonder problemen gedurende ten minste vijf weken (één generatie) in het laboratorium zijn gehouden, mogen voor een test worden gebruikt.

Andere soorten van het geslacht *Enchytraeus* zijn ook geschikt, in het bijzonder *Enchytraeus luxuriosus*. Deze soort is een echte bodembewoner, zoals recentelijk is beschreven in (65). Indien andere soorten van het geslacht *Enchytraeus* worden gebruikt, moeten ze duidelijk worden geïdentificeerd en moet de motivering van de keuze van de soort worden gerapporteerd.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) is een soort die tot dezelfde groep behoort als *Enchytraeus luxuriosus*. Het staat niet vast dat deze soort in het veld voorkomt, aangezien de soort alleen in regenwormculturen en composthopen is beschreven (Römbke 2003). De oorspronkelijk ecologische behoeften van de soort zijn derhalve onbekend. Recent laboratoriumonderzoek met diverse veldsubstraten heeft echter bevestigd dat deze soort een ruime tolerantie heeft voor grondeigenschappen als pH en textuur (Jänsch *et al.* 2005). In de afgelopen jaren is deze soort vaak gebruikt in ecotoxicologische studies vanwege de eenvoud van kweken en testen, bv. Kuperman *et al.* 2003. De soort is echter klein (3-12 mm; gemiddeld 7 mm (Westheide & Müller 1996)) en dit maakt de hantering moeilijker in vergelijking met *Enchytraeus albidus*. Bij gebruik van deze soort in plaats van *Enchytraeus albidus* kan de omvang van het testvat kleiner zijn, maar dat hoeft niet. Daarnaast moet in overweging worden genomen dat deze soort zich zeer snel voortplant met een generatietijd van minder dan 20 dagen bij 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) en zelfs sneller bij hogere temperaturen.

„Enchytraeidae" van de soort *Enchytraeus albidus* (alsmede andere *Enchytraeus*-soorten) kunnen worden gekweekt in grote plastic bakken (bv. 30 × 60 × 10 cm of voor een cultuur van kleine wormen 20 × 12 × 8 cm) die gevuld zijn met een mengsel van kunstmatige grond en in de handel verkrijgbare, niet verontreinigde tuinaarde zonder additieven. Compostmateriaal moet worden vermeden, aangezien dat toxische stoffen zoals zware metalen zou kunnen bevatten. Voordat de kweekgrond wordt gebruikt, moet fauna eruit worden verwijderd door driemaal diepvriezen. Zuiver kunstmatige grond kan ook worden gebruikt, maar de voortplantingssnelheid zou langzamer kunnen zijn in vergelijking met gemengde substraten. Het substraat moet een pH van 6,0 ± 0,5 hebben. De cultuur wordt bij een temperatuur van 15 °C ± 2 °C bewaard in een kweekbak zonder licht. In ieder geval moet een hogere temperatuur dan 23 °C worden vermeden. De kunstmatige/natuurlijke grond moet vochtig zijn, maar niet nat. Wanneer zachtjes met de hand in de grond wordt geknepen, zouden slechts kleine waterdruppels moeten verschijnen. In ieder geval moeten anoxische omstandigheden worden vermeden (als bijvoorbeeld een deksel wordt gebruikt, moet het aantal gaten in het deksel groot genoeg zijn om voldoende luchtverversing te waarborgen). De kweekgrond moet worden belucht door de grond eenmaal per week zorgvuldig te mengen.

▼M4

De wormen moeten minimaal eenmaal per week ad libitum worden gevoederd met havervlokken die in een holte in het grondoppervlak worden geplaatst en met grond worden bedekt. Indien voedsel van het laatste voedertijdstip in de bak achterblijft, moet de hoeveelheid voedsel dienovereenkomstig worden aangepast. Als er schimmels op het achtergebleven voedsel groeien, moet het worden vervangen door een nieuwe hoeveelheid havervlokken. Om de voortplanting te stimuleren kunnen de havervlokken om de twee weken worden verrijkt met in de handel verkrijgbaar proteïnepoeder met toegevoegde vitaminen. Na drie maanden worden de dieren overgebracht naar een vers voorbereide cultuur of kweeksubstraat. De havervlokken, die in een afgesloten verpakking moeten worden bewaard, moeten voor gebruik in een autoclaaf worden gesteriliseerd of verhit om infecties door meelmijten (bv. *Glycyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) of roofmijten (bv. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*) te voorkomen. Na desinfectie wordt het voedsel vermalen, zodat het gemakkelijk op het grondoppervlak kan worden verspreid. Andere mogelijke voedingsbronnen zijn bakkersgist of het visvoer TetraMin®.

In het algemeen zijn de cultuuromstandigheden toereikend als de wormen niet proberen het substraat te verlaten, zich snel door de grond voortbewegen, een glanzend buitenoppervlak hebben waaraan geen gronddeeltjes kleven en een min of meer wittige kleur hebben en als wormen van verschillende leeftijden zichtbaar zijn. In feite kunnen wormen als gezond worden beschouwd als ze zich voortdurend voortplanten.

Selectie van aanvullende literatuur

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitroheterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

C.31. TEST MET TERRESTRISCHE PLANTEN: OPKOMST EN GROEI VAN ZAAILINGEN

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 208 (2006) van de OESO. Testmethoden worden periodiek herzien in het licht van de wetenschappelijke vooruitgang en om aan de regelgeving te kunnen blijven voldoen. Deze bijgewerkte testmethode is bedoeld om de potentiële effecten van chemische stoffen op de opkomst en groei van zaailingen te bepalen. De methode als zodanig heeft geen betrekking op chronische effecten en effecten op de voortplanting (d.w.z. zaadzetting, bloemvorming, vruchtrijping). De blootstellingsomstandigheden en de eigenschappen van de chemische stof zijn bepalende factoren bij het kiezen van de juiste testmethoden (bij het testen van metalen/metaalverbindingen moet bijvoorbeeld rekening worden gehouden met effecten van de pH en de desbetreffende tegenionen (1). Deze testmethode heeft geen betrekking op planten die aan dampen van chemische stoffen worden blootgesteld. De testmethode is geschikt voor het testen van algemene chemische stoffen, biociden en gewasbeschermingsmiddelen (ook bekend als plantenbeschermingsmiddelen of pesticiden). De methode is ontwikkeld op basis van bestaande methoden (2) (3) (4) (5) (6) (7). Ook andere literatuur over plantentests is in aanmerking genomen (8) (9) (10). De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

2. Met de test worden de effecten op de opkomst van zaailingen en de vroege groei van hogere planten bepaald na blootstelling aan de teststof in de grond (of een geschikte grondmatrix). Zaden worden in contact gebracht met grond die is behandeld met de teststof, en worden 14 tot 21 dagen na opkomst van 50 % van de zaailingen in de controlegroep op effecten onderzocht. De gemeten eindpunten zijn visuele vaststelling van de zaailingenopkomst, het drooggewicht van de scheuten (of versgewicht van de scheuten) en in bepaalde gevallen de hoogte van de scheuten, alsook een beoordeling van zichtbare schadelijke effecten op verschillende delen van de plant. Deze metingen en observaties worden vergeleken met die gedaan aan onbehandelde controleplanten.

3. Afhankelijk van de verwachte blootstellingsroute wordt de teststof hetzij opgenomen in de grond (of eventueel een kunstmatige grondmatrix) of aangebracht op het oppervlak van de grond. Voor opname in de grond wordt een grote hoeveelheid grond behandeld. Deze wordt vervolgens in potten gedaan, waarna zaden van de betreffende plant in de grond worden geplant. Aanbrenging op het oppervlak gebeurt op grond in potten waarin de zaden al zijn geplant. De testeenheden (controlepotten en potten met behandelde grond, plus zaden) worden vervolgens onder omstandigheden geplaatst die bevorderlijk zijn voor de kieming/groei van de planten.

4. De test kan worden opgezet met het doel de dosis-responscurve te bepalen of kan in één concentratie/dosering worden uitgevoerd als een limiettest, naargelang van het doel van het onderzoek. Als de resultaten van de test met één concentratie/dosering een bepaald toxiciteitsniveau overschrijden (bv. wanneer er effecten groter dan x % worden waargenomen), kan een bereikbepalingstest worden uitgevoerd om de boven- en ondergrens voor de toxiciteit te bepalen, gevolgd door een test met meerdere concentraties/doseringen om een dosis-responscurve te verkrijgen. Er wordt een passende statistische analyse uitgevoerd om de effectieve concentratie EC_x of de effectieve toepassingsdosering ER_x (bv. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) voor de meest gevoelige gemeten parameter(s) te verkrijgen. Bij deze test kunnen ook de concentratie zonder waargenomen effect (NOEC) en de laagste concentratie met waargenomen effect (LOEC) worden berekend.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

5. De volgende informatie is nuttig voor het vaststellen van de verwachte route van blootstelling aan de chemische stof en het ontwerpen van de

▼M6

test: structuurformule, zuiverheid, wateroplosbaarheid, oplosbaarheid in organische oplosmiddelen, 1-octanol/water-verdelingscoëfficiënt, sorptiegedrag van de grond, dampspanning, chemische stabiliteit in water en licht, en biologische afbreekbaarheid.

GELDIGHEID VAN DE TEST

6. Voor een geldige test moet in de controles aan de volgende prestatiecriteria worden voldaan:

— ten minste 70 % van de zaailingen moet opkomen;

— de zaailingen mogen geen zichtbare tekenen van fytotoxische effecten vertonen (bv. chlorose, necrose, verwelking, blad- en stengelmisvormingen) en de planten mogen alleen de variatie in groei en uiterlijk vertonen die voor die specifieke soort normaal is;

— de gemiddelde overleving van opgekomen controlezaailingen aan het eind van de onderzoeksperiode moet minstens 90 % zijn;

— de omgevingsomstandigheden voor alle planten van een bepaalde soort moeten identiek zijn en de groeimedia moeten dezelfde hoeveelheid grondmatrix, hulpmedium of substraat bevatten uit dezelfde bron.

REFERENTIESTOF

7. Met regelmatige tussenpozen kan een referentiestof worden getest om te verifiëren dat de prestaties van de test, de respons van de betreffende testplanten en de testomstandigheden niet beduidend zijn veranderd in de loop van de tijd. De prestaties van het testsysteem in een bepaald laboratorium kunnen ook worden beoordeeld aan de hand van historische metingen van de biomassa of groei van controleplanten, en op deze manier kan de kwaliteit binnen een laboratorium worden bewaakt..

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Natuurlijke grond — kunstmatig substraat

8. Planten kunnen in potten worden gekweekt in zanderige leemgrond, lemige zandgrond of zanderige kleileemgrond die ten hoogste 1,5 % organische koolstof bevat (circa 3 % organisch materiaal). In de handel verkrijgbare potgrond of een kunstmatig grondmengsel met ten hoogste 1,5 % organische koolstof kan eveneens worden gebruikt. Kleigrond is niet geschikt indien van de teststof bekend is dat deze een hoge affiniteit voor klei heeft. Bodemgrond moet gezeefd worden over een zeef met mazen van 2 mm om de grond te homogeniseren en grove korrels te verwijderen. Van de uiteindelijk bereide grond moeten de soort, de textuur, het percentage organische koolstof, de pH, het zoutgehalte en de elektrische geleidbaarheid worden gerapporteerd. De grond moet worden ingedeeld volgens een standaardclassificatiediagram (11). Om het effect van bodempathogenen te beperken kan de grond gepasteuriseerd worden of met hitte worden behandeld.

9. Het gebruik van natuurlijke grond kan de interpretatie van de resultaten bemoeilijken en de variabiliteit ervan vergroten door variërende fysischchemische eigenschappen en microbiële populaties. Deze variabelen zijn van invloed op het vochtvasthoudend vermogen, het vermogen om chemische stoffen te binden, de luchtdoorlatendheid en het gehalte aan nutriënten en spoorelementen. Naast de variaties in fysische factoren zullen er ook variaties in chemische eigenschappen zijn, zoals de pH en redoxpotentiaal, die invloed kunnen hebben op de biologische beschikbaarheid van de teststof (12) (13) (14).

10. Kunstmatige substraten worden doorgaans niet voor het testen van gewasbeschermingsmiddelen gebruikt; ze kunnen wel van nut zijn voor het testen van algemene chemische stoffen of wanneer het wenselijk is de variabiliteit die kenmerkend is voor natuurlijke grond te minimaliseren en de vergelijkbaarheid van de testresultaten te vergroten. Substraten dienen uit inerte materialen te bestaan die minimale interactie met de teststof, het als drager

▼M6

fungerende oplosmiddel, of beide, vertonen. Zuurgewassen kwartszand, minerale wol en glaskorrels (bv. 0,35 tot 0,85 mm in diameter) zijn geschikte inerte materialen die de teststof (15) nauwelijks absorberen, zodat de stof maximaal beschikbaar is voor opname door de zaailing via de wortel. Ongeschikte substraten zijn onder meer vermiculiet, perliet en andere sterk absorberende materialen. Er moeten nutriënten voor de groei van de plant worden toegevoegd om stress door nutriëntentekorten te voorkomen, en waar mogelijk moet dit worden beoordeeld door middel van biochemische analyses of visuele beoordeling van controleplanten.

Criteria voor het selecteren van soorten voor de test

11. De selectie van soorten moet redelijk breed zijn, bv. wat betreft taxonomische diversiteit in het plantenrijk, verspreiding, abundantie, soortspecifieke levenscycluskenmerken en habitat, zodat uiteenlopende responsen worden verkregen (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Bij de selectie moeten de volgende kenmerken in aanmerking worden genomen:

— de soort heeft uniforme zaden die gemakkelijk verkrijgbaar zijn bij een of meer betrouwbare standaard zaadbronnen en vertoont consistente, betrouwbare en gelijkmatige kieming en een gelijkvormige groei van de zaailingen.

— de plant leent zich voor laboratoriumtests en kan betrouwbare resultaten opleveren die reproduceerbaar zijn binnen één testfaciliteit en tussen verschillende testfaciliteiten;

— de gevoeligheid van de geteste soort is in overeenstemming met de respons van planten die worden aangetroffen in de omgeving die blootstaat aan de chemische stof;

— ze zijn in enige mate gebruikt in eerdere toxiciteitstests, en uit hun gebruik in bijvoorbeeld herbicide-bioassays, screening op zware metalen, tests op zout- of mineralenstress of allelopathiestudies is gebleken dat ze gevoelig zijn voor een grote verscheidenheid van stressoren;

— ze kunnen groeien onder de groeiomstandigheden van de testmethode;

— ze voldoen aan de geldigheidscriteria van de test.

Aanhangsel 2 bevat een beperkte lijst van soorten die van oudsher het meest worden gebruikt, en aanhangsel 3 een lijst van mogelijke niet-gewassoorten.

12. Hoeveel soorten er getest moeten worden hangt af van de toepasselijke wettelijke voorschriften, en daarom wordt dit niet gespecificeerd in deze testmethode.

Aanbrenging van de teststof

13. De chemische stof moet in een geschikte drager (bv. water, aceton, ethanol, polyethyleenglycol, Arabische gom, zand) worden aangebracht. Ook mengsels (geformuleerde producten of formuleringen) met werkzame en diverse toevoegingsstoffen kunnen getest worden.

Verwerking in grond/kunstmatig substraat

14. Chemische stoffen die in water oplosbaar of suspendeerbaar zijn, worden aan water toegevoegd waarna de oplossing met een geschikt mengapparaat wordt vermengd met grond. Dit type test kan geschikt zijn als de blootstelling via grond of poriënwater plaatsvindt en er bezorgdheid is over opname via de wortels. Het watervasthoudend vermogen van de grond mag niet worden overschreden door de toevoeging van de teststof. Voor elke testconcentratie moet hetzelfde volume water worden toegevoegd, maar om klontering van de grond tot agglomeraten te voorkomen mag dit volume niet te groot zijn.

▼M6

15. Slecht in water oplosbare stoffen water moeten in een geschikt vluchtig oplosmiddel (bv. aceton, ethanol) worden opgelost en met zand worden vermengd. Het oplosmiddel kan dan met een luchtstroom onder voortdurend mengen uit het zand worden verwijderd. Het behandelde zand wordt vermengd met de experimentele grond. Aan een tweede controle worden alleen zand en oplosmiddel toegevoegd. Er worden gelijke hoeveelheden zand, behandeld met oplosmiddel dat weer verwijderd is, aan alle dosisniveaus en de tweede controle toegevoegd. Voor vaste, onoplosbare teststoffen worden droge grond en de chemische stof in een geschikt mengapparaat vermengd. Hierna wordt de grond in potten gedaan en worden de zaden direct gezaaid.

16. Wanneer in plaats van grond een kunstmatig substraat wordt gebruikt, kunnen wateroplosbare stoffen vlak voor de test in de nutriëntenoplossing worden opgelost. Stoffen die onoplosbaar zijn in water, maar die in water kunnen worden gesuspendeerd door een oplosmiddel als drager te gebruiken, moeten met de drager aan de nutriëntenoplossing worden toegevoegd. Niet in water oplosbare chemische stoffen waarvoor geen niet-toxische wateroplosbare drager beschikbaar is, moeten in een geschikt vluchtig oplosmiddel worden opgelost. De oplossing wordt vermengd met zand of glaskorrels en vervolgens in een rotatieverdamper verdampt, waardoor een gelijkmatige laag van de stof achterblijft op het zand of de korrels. Voordat de potten worden gevuld moet een gewogen deel van de korrels met hetzelfde organische oplosmiddel worden geëxtraheerd en het gehalte aan chemische stof worden bepaald.

Aanbrenging op het oppervlak

17. Voor gewasbeschermingsmiddelen wordt de teststof vaak aangebracht door het grondoppervlak te bespuiten met de testoplossing. Alle apparatuur die bij het uitvoeren van de tests wordt gebruikt, met inbegrip van apparatuur voor de bereiding en toediening van de chemische stof, moet een zodanige kwaliteit en capaciteit hebben dat de tests op een nauwkeurige wijze kunnen worden uitgevoerd en een reproduceerbare bedekking wordt verkregen. De bedekking moet voor alle grondoppervlakken hetzelfde zijn. Omstandigheden waarbij stoffen aan apparatuur kunnen adsorberen of ermee kunnen reageren moeten worden vermeden (bv. het gebruik van plastic slangen bij lipofiele chemische stoffen of stalen onderdelen en elementen). De manier waarop de teststof op het grondoppervlak wordt gespoten is een nabootsing van typische spuittanktoepassingen. De spuitvolumes moeten in het algemeen overeenkomen met die in de normale landbouwpraktijk en dienen gerapporteerd te worden (hoeveelheid water enz.). Er moet een type straalpijp worden gekozen dat een gelijkmatige bedekking van het grondoppervlak geeft. Wanneer oplosmiddelen en dragers worden gebruikt, moet een tweede groep van controleplanten worden opgezet die alleen oplosmiddel/drager krijgen. Dit is niet nodig voor gewasbeschermingsmiddelen die als formuleringen worden getest.

Verificatie van de concentratie/dosering van de teststof

18. De toegepaste concentraties/doseringen moeten op passende wijze geverifieerd worden. Voor oplosbare chemische stoffen kan verificatie van alle testconcentraties/-doseringen plaatsvinden door de hoogste in de test gebruikte concentratie testoplossing te analyseren waarbij de verdere verdunning wordt gedocumenteeerd en er gekalibreerde toepassingsapparatuur wordt gebruikt (bv. gekalibreerd analytisch glaswerk, kalibratie van spuitapparatuur). Voor onoplosbare chemische stoffen moet bij de verificatie het gewicht van de aan de grond toegevoegde teststof worden vermeld. Een analyse van de grond kan nodig zijn indien de homogeniteit moet worden aangetoond.

PROCEDURE

Testopzet

19. Zaden van dezelfde soort worden in potten geplant. Hoeveel zaden er per pot worden geplant is afhankelijk van de soort, grootte van de potten en duur van de test. Het aantal planten per pot moet zodanig zijn dat de groeiomstandigheden adequaat zijn en de potten in de loop van de test niet overvol raken. De maximale plantdichtheid is ongeveer 3-10 zaden per 100 cm^2, afhankelijk van de grootte van de zaden. Voorbeelden van aanbevolen aantallen zijn: voor maïs, soja, tomaat, komkommer en suikerbiet 1 à 2 planten per pot van 15 cm, voor koolzaad en erwt 3 planten per

▼M6

pot van 15 cm, en voor ui, tarwe en andere soorten met kleine zaden 5 à 10 planten per pot van 15 cm. Het aantal zaden en replicaatpotten (een replicaat is gedefinieerd als een pot; planten in dezelfde pot zijn dus geen replicaten) moet optimale statistische analyse mogelijk maken (21). Er moet worden opgemerkt dat de variabiliteit groter zal zijn voor soorten waarbij een kleiner aantal grote zaden per pot (replicaat) wordt gebruikt dan voor soorten waarbij per pot een groter aantal kleine zaden kan worden gebruikt. Deze variabiliteit kan worden beperkt door in elke pot evenveel zaden te planten.

20. Het gebruik van controlegroepen moet waarborgen dat de waargenomen effecten samenhangen met of zijn toe te schrijven aan blootstelling aan de teststof. De controlegroep dient in elk opzicht identiek te zijn aan de testgroep, behalve wat betreft blootstelling aan de teststof. Binnen een test moeten alle planten, ook de controles, afkomstig zijn uit dezelfde bron. Voor vertekening te voorkomen moeten de test- en controlepotten willekeurig worden ingedeeld.

21. Zaden omhuld met een dunne laag insecticide of fungicide (d.w.z. gecoate zaden) moeten worden vermeden. Het gebruik van bepaalde niet-systemische contactfungiciden (bv. captan, thiram) wordt door sommige regelgevende instanties echter wel toegestaan (22). Bij bezorgdheid over zaadoverdraagbare pathogenen kunnen de zaden kort in een oplossing met een lage concentratie (5 %) natriumhypochloriet worden geweekt, gevolgd door grondig spoelen onder stromend water en drogen. Herstelbehandeling met een ander gewasbeschermingsmiddel is niet toegestaan.

Testomstandigheden

22. De testomstandigheden moeten de omstandigheden die vereist zijn voor normale groei van de geteste soorten en variëteiten benaderen (aanhangsel 4 bevat voorbeelden van testomstandigheden). De opkomende planten moeten volgens goede tuinbouwpraktijken in klimaatkamers, fytotrons of kassen worden gekweekt. Bij het gebruik van kweekfaciliteiten omvatten deze praktijken meestal het reguleren en voldoende frequent (bv. dagelijks) registreren van de temperatuur, vochtigheid, koolstofdioxideconcentratie, licht (intensiteit, golflengte, fotosynthetisch actieve straling) en lichtperiode, manier van bewatering enz. om een goede groei te waarborgen, die wordt afgelezen aan de controleplanten van die specifieke soort. De kastemperatuur moet gereguleerd worden met ventilatie-, verwarmings- en/of koelingssystemen. Voor in kassen uitgevoerde tests worden in het algemeen de volgende omstandigheden aanbevolen:

— temperatuur: 22 °C ± 10 °C;

— vochtigheid: 70 % ± 25 %;

— fotoperiode: minimaal 16 uur licht

— lichtintensiteit: 350 ± 50 μE/m2/s. Extra verlichting kan nodig zijn als de intensiteit lager wordt dan 200 μE/m2/s, in het golflengtebereik 400-700 nm, behalve voor bepaalde soorten die minder licht nodig hebben.

Tijdens het onderzoek moeten de omgevingsomstandigheden worden gemonitord en gerapporteerd. De planten worden in niet-poreuze plastic of glazen potten gekweekt, met onder de pot een bak of schotel. De potten

▼M6

kunnen periodiek worden verplaatst om de variabiliteit in de groei van de planten (door verschillen in testomstandigheden binnen de kweekfaciliteit) te minimaliseren. De potten moeten groot genoeg zijn om normale groei mogelijk te maken.

23. Er kunnen extra nutriënten aan de grond worden toegevoegd voor zover dat nodig is om een goede groeikracht te behouden. Of en op welk moment dit moet gebeuren kan worden beoordeeld door observatie van de controleplanten. Het wordt aanbevolen de planten van onderaf te bewateren (bv. gebruikmakend van pitten van glasvezels). In eerste instantie mag wel van bovenaf worden bewaterd om de zaadkieming te stimuleren en om op het oppervlak aangebrachte teststof sneller in de grond te laten dringen.

24. De specifieke kweekomstandigheden dienen te worden afgestemd op de geteste soort en de onderzochte teststof. Controle- en behandelde planten moeten onder dezelfde omgevingsomstandigheden worden gehouden, waarbij wel passende maatregelen moeten worden genomen om (bv. bij een vluchtige teststof) kruisblootstelling tussen verschillende behandelingen en van controles aan de teststof te voorkomen.

Tests met één concentratie/dosering

25. Om te bepalen welke concentratie/dosering van de chemische stof geschikt is voor het uitvoeren van een test met één concentratie of dosering (challenge test/limiettest), moet rekening worden gehouden met een aantal factoren. Voor algemene chemische stoffen zijn onder meer de fysisch-chemische eigenschappen van belang. Voor gewasbeschermingsmiddelen moet gekeken worden naar de fysisch-chemische eigenschappen en het gebruikspatroon van de chemische stof, de maximale concentratie of toepassingsdosering, het aantal toepassingen per seizoen en/of de persistentie van de teststof. Om vast te stellen of een algemene chemische stof fytotoxische eigenschappen heeft, kan het zinvol zijn om bij de maximale concentratie van 1 000 mg/kg droge grond te testen.

Bereikbepalingstest

26. Indien nodig kan een bereikbepalingstest worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de concentraties/doseringen die in het definitieve dosis-responsonderzoek moeten worden getest. De testconcentraties/-doseringen voor een bereikbepalingstest moeten ruim uit elkaar liggen (bv. 0,1, 1,0, 10, 100 en 1 000 mg/kg droge grond). Voor gewasbeschermingsmiddelen kunnen de concentraties/doseringen gebaseerd worden op de aanbevolen of maximale concentratie of toepassingsdosering, bv. 1/100, 1/10, 1/1 van de aanbevolen/maximale concentratie of toepassingsdosering.

Tests met meerdere concentraties/doseringen

27. Een test met meerdere concentraties/doseringen wordt uitgevoerd om een dosis-responsrelatie vast te stellen en een EC_x of ER_x-waarde te bepalen voor opkomst, biomassa en/of zichtbare effecten, in vergelijking met niet-blootgestelde controles, zoals vereist door regelgevende instanties.

28. Het aantal en de onderlinge afstand van de concentraties of doseringen moeten zodanig zijn dat een betrouwbare dosis-responsrelatie en regressievergelijking worden verkregen en de $EC_{x.}$ of $ER_{x.}$ kan worden geschat. De gekozen concentraties/doseringen moeten de te bepalen EC_x of ER_xwaarden omvatten. Als bijvoorbeeld een EC_{50}-waarde moet worden bepaald, is het wenselijk de test uit te voeren met doseringen die 20 tot 80 % effect veroorzaken. Om dit te bereiken worden bij voorkeur ten minste vijf testconcentraties/-doseringen gebruikt in een meetkundige reeks met een reden van

▼M6

ten hoogste 3, plus een onbehandelde controle. Voor elke dosisgroep en de controlegroep moet het aantal replicaten ten minste vier zijn en het totale aantal zaden ten minste 20. Bij bepaalde planten met een laag kiemingspercentage of een variabel groeigedrag zijn wellicht meer replicaten nodig om de statistische power te vergroten. Als een groter aantal testconcentraties/-doseringen wordt gebruikt, kan met minder replicaten worden volstaan. Als schatting van de NOEC nodig is, zijn mogelijk meer replicaten nodig om de gewenste statistische power te verkrijgen (23).

Observaties

29. Gedurende de observatieperiode, d.w.z. 14 tot 21 dagen na opkomst van 50 % van de controleplanten (dit kunnen ook oplosmiddelcontroles zijn), worden de planten regelmatig geobserveerd (ten minste wekelijks en zo mogelijk dagelijks) op opkomst, zichtbare tekenen van fytotoxiciteit en sterfte. Aan het eind van de test moeten het opkomstpercentage en de biomassa van overlevende planten worden geregistreerd, alsook zichtbare schadelijke effecten op verschillende delen van de plant. Het kan hierbij gaan om een afwijkend uiterlijk van de opgekomen zaailingen, dwerggroei, chlorose, verkleuring, sterfte en effecten op de ontwikkeling van de plant. De biomassa aan het eind kan gemeten worden als het uiteindelijke gemiddelde drooggewicht van de scheuten, door de scheuten vanaf het grondoppervlak te oogsten en tot een constant gewicht te drogen bij 60 °C. De biomassa aan het eind kan ook gemeten worden als het versgewicht van de scheuten. De hoogte van de scheuten kan een ander eindpunt zijn als de regelgeving dat vereist. Er moet een uniform scoringssysteem voor zichtbare schade worden gebruikt om de waarneembare toxische reponsen te evalueren. Voorbeelden van kwalitatieve en kwantitatieve visuele beoordelingen zijn te vinden in literatuur (23) (24).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Statistische analyse

Test met één concentratie/dosering

30. De gegevens voor elke plantensoort moeten met behulp van een passende statistische methode worden geanalyseerd (21). Het niveau van het effect bij de testconcentratie/dosering, of de waarneming dat een bepaald effect niet wordt bereikt bij de testconcentratie/dosering, moet gerapporteerd worden (bv. < *x%* effect waargenomen bij *y* concentratie of dosering).

Test met meerdere concentraties/doseringen

31. Er wordt een dosis-responsrelatie vastgesteld in de vorm van een regressievergelijking. Er kunnen verschillende modellen worden gebruikt. Voor het schatten van EC_x of ER_x (bv. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) en de bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen voor de opkomst van zaailingen als een binaire respons kunnen de logit-, probit-, Weibull-, Spearman-Karber-, getrimde Spearman-Karber-methode enz. geschikt zijn. Voor de groei van de zaailingen (gewicht en hoogte) als continue eindpunten kunnen de EC_x of ER_x en de bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen worden geschat door middel van geschikte regressieanalyse (bv. niet-lineaire regressieanalyse volgens Bruce-Versteeg (25)). Waar mogelijk moet de R^2 0,7 of hoger zijn voor de meest gevoelige soort en moeten de gebruikte testconcentraties/-doseringen het gebied tussen 20 % tot 80 % effect omvatten. Als de NOEC moet worden geschat, worden bij voorkeur krachtige statistische tests toegepast die gekozen worden op basis van gegevensverdeling (21) (26).

Testverslag

32. Het testverslag moet de onderzoeksresultaten bevatten, alsook een gedetailleerde beschrijving van de testomstandigheden, een diepgaande bespreking van de resultaten, analyse van de meetgegevens en de uit de analyse getrokken conclusies. Een overzichtstabel en een samenvatting van de resultaten zijn eveneens vereist. In het testverslag moet informatie worden opgenomen:

▼**M6**

Teststof:

— chemische idententificatiegegevens, relevante eigenschappen van de geteste chemische stof (bv. log P_{ow}, oplosbaarheid in water, dampspanning en informatie over het lot en het gedrag in het milieu, indien beschikbaar);

— details over de bereiding van de testoplossing en verificatie van testconcentraties zoals beschreven in punt 18.

Geteste soort:

— gegevens over het testorganisme: soort/variëteit, plantenfamilies, wetenschappelijke en gewone naam, bron en geschiedenis van het zaad, zo gedetailleerd mogelijk (d.w.z. naam van de leverancier, kiemingspercentage, grootte van de zaden klasse, partij- of lotnummer, jaar of groeiseizoen waarin het zaad werd geoogst, datum van beoordeling van kieming), levensvatbaarheid, enz.;

— aantal geteste mono- en dicotyle soorten;

— motivering van de keuze van de soort;

— beschrijving van de bewaring, behandeling en instandhouding van het zaad.

Testomstandigheden:

— testfaciliteit (bv. klimaatkast, fytotron en kas);

— beschrijving van het testsysteem (bv. afmetingen en materiaal van de potten en hoeveelheden grond);

— kenmerken van de grond (textuur of soort grond: korrelgrootteverdeling en indeling, fysische en chemische eigenschappen met inbegrip van % organisch materiaal, % organische koolstof en pH);

— bereiding van grond/substraat (bv. grond, kunstmatige grond, zand e.a.) voorafgaand aan test;

— beschrijving van het voedingsmedium, indien gebruikt;

— aanbrenging van de teststof: beschrijving van de aanbrengingsmethode, beschrijving van apparatuur, blootstellingsdoseringen en -volumes met inbegrip van chemische verificatie, beschrijving van de kalibratiemethode en beschrijving van omgevingsomstandigheden tijdens de aanbrenging;

— groeiomstandigheden: lichtintensiteit (bv. fotosynthetisch actieve straling (PAR)), fotoperiode, max/min temperaturen, bewateringsschema en — methode,

— aantal zaden per pot, aantal planten per dosis, aantal replicaten (potten) per blootstellingsdosering;

— soort en aantal controles (negatieve en/of positieve controles, oplosmiddelcontrole indien gebruikt);

— duur van de test.

Resultaten:

— tabel met alle eindpunten voor elk replicaat, testconcentratie/dosering en soort;

— aantal en percentage opgekomen planten in vergelijking met controles;

— gemeten biomassa (drooggewicht of versgewicht van scheuten) van de planten uitgedrukt als percentage van de controles;

▼M6

— scheuthoogte van de planten als percentage van de controles, indien gemeten;

— percentage zichtbare schade en een kwalitatieve en kwantitatieve beschrijving van zichtbare schade (chlorose necrose, verweking, blad- en stengelmisvorming, alsook eventuele afwezigheid van effecten) door de teststof in vergelijking met controleplanten;

— beschrijving van de waarderingsschaal gebruikt voor het beoordelen van zichtbare schade, indien visuele waarderingen worden opgegeven;

— voor onderzoeken met één dosering moet het percentage schade worden vermeld;

— EC_x of ER_x (bv. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25})-waarden en bijbehorende betrouwbaarheidsgrenzen. Als regressieanalyse is uitgevoerd moeten de standaardfout voor de regressievergelijking en de standaardfout voor individuele parameterschattingen (helling, snijpunt met de y-as) worden opgegeven;

— NOEC (en LOEC) indien berekend;

— beschrijving van de gebruikte statistische procedures en aannames;

— grafische weergave van deze gegevens en de dosis-responsrelatie voor de geteste soort.

Afwijkingen van de in deze testmethode beschreven procedures en eventuele ongebruikelijke gebeurtenissen tijdens de test.

LITERATUUR

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1 Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2 Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and 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. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and 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 Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and 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. and 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 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and 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. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Comité risicobeoordeling Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and 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. and 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. and 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). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. and 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. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Hoofdstuk C.33 van deze bijlage: Voortplantingstest met regenwormen (Eisenia fetida/Eisenia andrei).

▼M6

Aanhangsel 1

Definities

Werkzaam bestanddeel (of werkzame stof): een materiaal bedoeld om een specifiek biologisch effect teweeg te brengen (bv. ter bestrijding van insecten, plantenziekten of onkruid in het behandelde gebied), ook bekend als werkzaam bestanddeel van de technisch zuivere stof).

Chemische stof: een stof of een mengsel.

Gewasbeschermingsmiddelen of pesticiden: materialen met een specifieke biologische activiteit die doelbewust worden gebruikt om gewassen te beschermen tegen plagen (bv. schimmelziekten, insecten en concurrerende planten).

EC_x — concentratie voor x % effect, of ER_x — dosering voor x % effect: de concentratie of dosering die in vergelijking met de controle een ongewenste verandering in het eindpunt van de test veroorzaakt van x % (25 % of 50 % afname van de opkomst van zaailingen, het scheutgewicht of het uiteindelijke aantal aanwezige planten, of toename van zichtbare schade correspondeert bijvoorbeeld respectievelijk met een EC_{25}/ER_{25} of EC_{50}/ER_{50}).

Opkomst: het boven de grond verschijnen van het coleoptiel of de zaadlob.

Formulering: het in de handel verkrijgbare geformuleerde product dat de werkzame stof (werkzame bestanddeel) bevat; ook bekend als „eindpreparaat” ([1]) of „voor het typische eindgebruik bestemde product”.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): de laagste concentratie teststof waarbij effect werd waargenomen. In deze test heeft de concentratie die overeenkomt met de LOEC een statistisch significant effect ($p < 0,05$) binnen een bepaalde blootstellingsperiode, in vergelijking met de controle, en is deze concentratie hoger dan de NOEC-waarde.

Niet-doelwitplanten: die planten die zich buiten het gebied van de doelplanten bevinden. Voor gewasbeschermingsmiddelen zijn dit meestal planten buiten het behandelingsgebied.

NOEC (No Observed Effect Concentration): de hoogste concentratie teststof waarbij geen effect werd waargenomen. In deze test heeft de concentratie die overeenkomt met de NOEC geen statistisch significant effect ($p < 0,05$) binnen een bepaalde blootstellingsperiode in vergelijking met de controle.

Fytoxicity: schadelijke afwijkingen (vastgesteld door metingen en visuele beoordeling) van het normale beeld van opkomst en groei van planten als reactie op een bepaalde chemische stof.

Replicaat: de experimentele eenheid die representatief is voor een controlegroep en/of dosisgroep. In deze onderzoeken wordt de pot gedefinieerd als replicaat.

Visuele beoordeling: waardering van zichtbare schade op basis van waarnemingen van de plantstand, groeikracht, misvormingen, chlorose, necrose en het algehele uiterlijk in vergelijking met een controle.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

([1]) Eindpreparaat: Het geformuleerde product met de werkzame chemische stof (werkzame bestanddeel) dat in de handel wordt verkocht.

▼M6

Aanhangsel 2

Lijst van soorten die van oudsher bij plantentests worden gebruikt

Familie	Soort	Gewone namen
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Wortel
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Zonnebloem
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	sla
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Witte mosterd
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Paksoi
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Koolzaad
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Kool
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Meiraap/stoppelknol
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Tuinkerszaad
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Radijs
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Suikerbieten
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Komkommer
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Soja
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Mungbonen
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Stamboon, prinsessenboon, tuinboon
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Erwt
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Fenegriek
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Rolklaver
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Rode klaver
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Wikken
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Vlas
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Boekweit
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Tomaat

▼**M6**

Familie	Soort	Gewone namen
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	Uien
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Haver
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Gerst
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Perennial ryegrass
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Rijst
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Rogge
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Graansorgho, kafferkoren
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Tarwe
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Maïs

▼M6

Aanhangsel 3

Lijst van mogelijke niet-gewassoorten

Mogelijke soorten voor toxiciteitstests met planten volgens de OESO

Opmerking: De volgende tabel bevat informatie over 52 niet-gewassoorten (literatuur is tussen haakjes vermeld voor alle gegevens) De vermelde opkomstpercentages zijn afkomstig uit gepubliceerde literatuur en zijn uitsluitend als indicatie bedoeld. Persoonlijke ervaringen kunnen variëren naargelang van de zaadbron en andere factoren.

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
APIACEAE *Torilis japónica* (heggendoornzaad)	E, T verstoorde terreinen, hagen, weiden (16, 19)	1,7 - 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	koude stratificatie (7, 14, 18, 19) rijping kan nodig zijn (19) kieming geremd in het donker (1, 19) geen speciale behandelingen (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (madeliefje)	M grasland, akkers, vaak gemaaide grasgrond (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	kieming niet beïnvloed door bestraling (18, 19) geen speciale behandelingen (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (korenbloem)	A akkers, bermen, open habitats (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	geen speciale behandelingen (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (knoopkruid)	M akkers, bermen, open habitats (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	rijping kan nodig zijn (18, 19) kieming geremd in het donker (19) geen speciale behandelingen (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium Griekse alant	M vochtige, verstoorde terreinen (16)	1 - 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		geen speciale behandelingen (4)	POST (4)	A, F	

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
Leontodon hispidus (leeuwentand)	M akkers, bermen, open habitats (16 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	kieming geremd in het donker (17, 18, 19) geen speciale behandelingen (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (rudbeckia)	T, M verstoorde terreinen (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	geen speciale behandelingen (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis Canadese guldenroede	M weide, open terreinen (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	1:1 vermengen met zand en 24 uur weken in 500 ppm GA (11) geen speciale behandelingen (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum —	A akkers, open habitats (16)	25-61 (14, 29)		0 (1) 5 (29)		kieming mogelijk geremd in het donker (1) 12 uur weken in warm water (29)	PRE en POST (31)	A	
Xanthium spinosum (stekelnoot)	A open habitats (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		scarificatie (14) geen speciale behandelingen (6)	PRE en POST (6)	A	
Xanthium strumarium (Iate stekelnoot)	A akkers, open habitats (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		geen speciale behandelingen (6, 14, 21)	PRE en POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (pinksterbloem)	M akkers, bermen, vaak gemaaide grasvelden (16 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	kieming geremd in het donker (18, 19) geen speciale behandelingen (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (echte koekoeksbloem)	M (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	rijping kan nodig zijn (18) geen speciale behandelingen (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (ganzenvoet)	A akkerranden, verstoorde terreinen (16 19)	0,7 - 1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	behandeling verschilt afhankelijk van de zaadkleur (19) kiemrust bij droge opslag (19) kieming geremd in het donker (1, 18, 19) koude stratificatie (18) geen speciale behandeling (14, 34)	PRE en POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (sint-janskruid)	M akkers, bouwland, open habitats (16 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	kieming geremd in het donker (1, 18, 19) geen speciale behandelingen (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* —	A bermen, open habitats, maïsvelden (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	kieming niet beïnvloed door bestraling (1) geen speciale behandelingen (6, 21)	PRE en POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* —	M bouwland, weiden, bermen (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	kieming geremd in het donker (1) geen speciale behandelingen (6, 10, 14)	PRE en POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (rolklaver)	M grassige gebieden, bermen, open habitats (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	scarificatie (14, 19) kieming niet beïnvloed door bestraling (18, 19) geen speciale behandelingen (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
Senna obtusifolia —	A natte bossen (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		zaden 24 uur in water weken (9) scarificatie (14) zaadlevensvatbaarheid zaad verschilt afhankelijk van de kleur (1) geen speciale behandelingen (6)	POST (6,9)	A	
Sesbania exaltata —	A alluviale grond (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		zaden 24 uur in water weken (9) kieming niet beïnvloed door bestraling (1) geen speciale behandelingen (21)	PRE en POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (rode klaver)	M akkers, bermen, bouwland (16, 19)	1,4 - 1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	scarificatie (14, 18) rijping kan nodig zijn (19) kieming niet beïnvloed door bestraling (1, 19) geen speciale behandelingen (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (hartgespan)	M open terreinen (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		geen speciale behandelingen (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (aarmunt)	M vochtige gebieden (16)	2,21 (4)		0 (4)		geen speciale behandelingen (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (kattenkruid)	M verstoorde terreinen (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		geen speciale behandelingen (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
Prunella vulgaris (brunel)	M akkers, grassige gebieden, verstoorde terreinen (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	kieming geremd in het donker (18, 19) meer kieming bij grotere zaden (1) geen speciale behandelingen (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (betonie)	M graslanden, akkerranden (19)	14-18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	geen speciale behandelingen (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (fluweelblad)	A akkers, open habitats (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	scarificatie (14) geen speciale behandelingen (5, 10, 21)	PRE en POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa —	A akkers, bermen (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		scarificatie (14) kieming niet beïnvloed door bestraling (1) geen speciale behandelingen (6, 21)	PRE en POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (grote klaproos)	A akkers, bouwland, verstoorde terreinen (16 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	koude stratificatie, en scarificatie (1, 19, 32) geen speciale behandelingen (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (gewoon struisgras)	gazons, weiden (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	kieming geremd in het donker (1, 17, 19) geen speciale behandelingen (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (duist)	A akkers, open habitats (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	scarificatie (14) behandelen met 101 mg/l KNO_3 (14) warme stratificatie (1) kieming geremd in het donker (1) geen speciale behandelingen (34)	PRE en POST (28, 34)	A	32

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
Avena fatua (oot)	A beteelde terreinen, open habitats (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	scarificatie (7, 32) kieming geremd in het donker (1) koude stratificatie (1, 18) geen speciale behandelingen (6, 10, 14)	PRE en POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (zwenkdravik)	A akkers, bermen, bouwland (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		rijpingsperiode (1, 7, 32) kieming geremd door licht (1) geen speciale behandelingen (14)	PRE en POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (kamgras)	P akkers, bermen, open habitats (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	kieming niet beïnvloed door bestraling (19) geen speciale behandelingen (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (harig vingergras)	A akkers, bermen, open habitats (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21).	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	scarificatie, koude stratificatie, en maturatie (1, 7, 14, 32) behandelen met 101 mg/l KNO_3 (14) kieming geremd in het donker (1) geen speciale behandelingen (21)	PRE en POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Europese hanenpoot)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		scarificatie (7, 32) kieming niet beïnvloed door bestraling (1) geen speciale behandelingen (3, 14, 21)	PRE en POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis —	P oevers, verstoorde terreinen (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	geen speciale behandelingen (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (beemdlangbloem)	P akkers, vochtige gebieden (16 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	geen speciale behandelingen (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
Hordeum pusillum —	A weiden, bermen, open habitats (16)	3,28 (14)				warme stratificatie (1) kieming niet beïnvloed door bestraling (1)	PRE (31)		7
Phleum pratense —	P akkers, bouwland, verstoorde terreinen (16 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	kieming geremd in het donker (19) kieming niet beïnvloed door bestraling (17) geen speciale behandelingen (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (zwaluwtong)	A open habitats, bermen (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		koude stratificatie gedurende 4-8 weken (1, 2, 4, 20, 29) kieming niet beïnvloed door bestraling (1)	PRE en POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (beklierde duizendknoopa)	A vochtige grond (16)	1,8-2,5 (14).	L > D (6)		5 (94 %) (18)	kieming niet beïnvloed door bestraling (1) kieming geremd in het donker (18) koude stratificatie (1) geen speciale behandelingen (5)	PRE en POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum —	A akkers, open habitats (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		koude stratificatie gedurende 4 weken bij 0 — 5 °C (1, 29) kieming geremd in het donker (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (perzikkruid)	A verstoorde terreinen, bouwland (16, 19)	2,1-2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	scarificatie, koude stratificatie, GA-behandeling (14) koude stratificatie, rijping (17-19) kieming geremd in het donker (19) geen speciale behandelingen (13)	POST (13)	A	32

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
Rumex crispus (krukzuring)	P akkers, bermen, open terreinen (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	kieming geremd in het donker (18, 19) rijping kan nodig zijn (18) geen speciale behandelingen (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* —	A akkers, open terreinen, verstoorde terreinen (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	koude stratificatie, GA-behandeling (1, 14, 18, 19, 32) licht vereist voor kieming (1) geen speciale behandelingen (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (boterbloem)	M akkers, bermen, open terreinen (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	geen speciale behandelingen (5, 14, 22, 24-26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (geel nagelkruid)	M hagen, vochtige gebieden (16, 19)	0,8 - 1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	kieming geremd in het donker (18, 19) warme stratificatie (1) geen speciale behandelingen (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (kleefkruid)	A akkers, open terreinen, verstoorde terreinen (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	koude stratificatie (1, 18, 19) kieming niet beïnvloed door bestraling (18, 19) kieming geremd door licht (1) geen speciale behandelingen (6, 14)	PRE en POST (6, 28)	A	32

▼M6

FAMILIE Soort Botanische naam (gewone Nederlandse naam)	Levensduur ([1]) en habitat	Zaadgewicht (mg)	Fotoperiode voor kieming of groei ([2])	Plantdiepte (mm) ([3])	Kiemtijd (dagen) ([4])	Speciale behandelingen ([5])	Toxiciteitstest ([6])	Zaadleveranciers ([7])	Andere referenties ([8])
Galium mollugo (glad walstro)	M houtwallen, open terreinen (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		geen speciale behandelingen (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (vingerhoedskruid)	T, M houtwallen, open terreinen (16, 19)	0,1 -0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	kieming geremd in het donker (1, 17-19) geen speciale behandelingen (4, 22-26)	POST (4, 22 — 26)	D, G, F	
Veronica persica (ereprijsl)	A akkers, open terreinen, verstoorde terreinen (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	kieming geremd in het donker (18, 19) koude stratificatie (18) geen speciale behandelingen (14)	PRE en POST (28)	A	32

([1]) E = Eenjarige planten, T = Tweejarige planten, M = Meerjarige planten.
([2]) Referenties 11,14 en 33 hebben betrekking op de verhouding tussen licht (L) en donker (D) die nodig is om zaadkieming te induceren. Referenties 3, 6, 9, 10, 13, 20 hebben betrekking op groeiomstandigheden in kassen.
([3]) 0 mm geeft aan dat de zaden op het grondoppervlak werden gezaaid of dat de zaden licht nodig hebben om te kiemen.
([4]) De getallen betreffen het aantal dagen waarin een percentage van de zaden ontkiemde volgens de genoemde referentie, bv. 3 dagen (50 %) kieming (referentie 19).
([5]) Gegevens over de duur van rijping en/of stratificatie zijn niet in alle gevallen beschikbaar. Afgezien van de eis van een koudebehandeling worden de temperatuursomstandigheden niet gespecificeerd, omdat bij het testen in kassen maar beperkte temperatuurregeling mogelijk is. Bij de normale temperatuurschommelingen in kassen zullen de meeste zaden kiemen.
([6]) Geeft aan of de soort in een op herbiciden gerichte toxiciteitstest met planten vóór opkomst (PRE) of na opkomst (POST) werd gebruikt.
([7]) Voorbeeld(en) van commerciële zaadleveranciers.
([8]) Twee andere geraadpleegde referenties.

▼M6

Genoemde zaadleveranciers

ID leverancier	Gegevens van leverancier
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ VERENIGD KONINKRIJK +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 V.S. (727) 344 — 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 — 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 V.S. (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB VERENIGD KONINKRIJK +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 — 7333 www.thompson-morgan.com

GENOEMDE LITERATUUR

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-UpÒ). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & 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., & 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., & 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., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

▼M6

(7) Buhler, D.D. & 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, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & 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. & 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. pp. 151 — 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Persoonlijke mededeling. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & 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., & 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., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & 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. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. 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., & 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., & 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., & 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., & 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., & 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., & 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., & 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. & 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. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & 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. Persoonlijke mededeling. (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. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Persoonlijke mededeling.

(34) Zwerger, P. & 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**

Aanhangsel 4

Voorbeelden van geschikte groeiomstandigheden voor bepaalde gewassoorten

De volgende omstandigheden zijn voor tien gewassoorten geschikt bevonden en kunnen ook voor bepaalde andere soorten als richtsnoer voor tests in klimaatkasten worden gebruikt:

Koolstofdioxideconcentratie: 350 ± 50 ppm;

Relatieve vochtigheid: 70 ± 5 % in lichte perioden en 90 ± 5 % in donkere perioden;

Temperatuur: 25 ± 3 °C bij dag, 20 ± 3 °C bij nacht;

Fotoperiode: 16 uur licht/8 uur donker, uitgaande van een gemiddelde golflengte van 400 tot 700 nm;

Licht: luminantie van 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, gemeten vlak boven het bladerdek.

De gewassoorten zijn:

— tomaat (*Solanum lycopersicon*);

— komkommer (*Cucumis sativus*);

— sla (*Lactuca sativa*);

— sojaboon (*Glycine max*);

— kool (*Brassica oleracea* var. *capitata*);

— wortel (*Daucus carota*);

— haver (*Avena sativa*);

— Engels raaigras (*Lolium perenne*);

— mais (*Zea mays*);

— ui (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. **Voortplantingstest met Enchytraeidae**

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 220 (2004) van de OESO. De test is opzet om de effecten van stoffen op het voortplantingsresultaat van enchytreeën, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, in de bodem te beoordelen. Zij is in principe gebaseerd op een methode die door het Umweltbundesamt in Duitsland (1) is ontwikkeld en die is onderworpen aan een ringtest (2). Er is ook rekening gehouden met andere methoden voor het testen van het toxisch effect van stoffen op enchytreeën en regenwormen (3)(4)(5)(6)(7)(8).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

2. In de bodem levende ringwormen (Annelidae) van het geslacht Enchytraeus zijn ecologisch belangrijke soorten voor ecotoxicologische tests. Hoewel enchytreeën vaak worden aangetroffen in bodems die regenwormen bevatten, zijn ze vaak ook talrijk in bodems waarin geen regenwormen worden gevonden. Enchytreeën kunnen zowel in laboratoriumproeven als in semi-veld- en veldexperimenten worden gebruikt. Vanuit praktisch oogpunt zijn veel Enchytraeus-soorten gemakkelijk te hanteren en te kweken, en hun generatietijd is aanzienlijk korter dan die van regenwormen. De duur van een voortplantingstest met enchytreeën is daardoor slechts 4 tot 6 weken, terwijl deze voor regenwormen (Eisenia fetida) 8 weken is.

3. Meer informatie over de ecologie en ecotoxicologie van enchytreeën in het terrestrische milieu is te vinden in (9)(10)(11)(12).

PRINCIPE VAN DE TEST

4. Volwassen enchytreeën worden blootgesteld aan een bereik van concentraties van de teststof die door kunstmatige grond zijn gemengd. De test kan in twee stappen worden gesplitst: (a) een bereikbepalingstest, indien er onvoldoende informatie beschikbaar is, waarin de mortaliteit het belangrijkste eindpunt is dat na twee weken blootstelling wordt beoordeeld, en (b) een definitieve voortplantingstest, waarin het totale aantal door een moederdier voortgebrachte nakomelingen en de overleving van de moederdieren worden beoordeeld. De definitieve test duurt zes weken. Na de eerste drie weken worden de volwassen wormen verwijderd en worden de morfologische veranderingen geregistreerd. Na nog eens drie weken wordt het aantal nakomelingen geteld dat uit de door de volwassen dieren geproduceerde cocons is gekomen. Het voortplantingsresultaat van de dieren die zijn blootgesteld aan de teststof, wordt vergeleken met dat van de controle(s) om (i) de No Observed Effect Concentration (NOEC) en/of (ii) de EC_x (bv. EC_{10}, EC_{50}) te bepalen door met een regressiemodel een schatting te maken van de concentratie die zou leiden tot een afname van het voortplantingsresultaat met x %. De EC_x (bv. EC_{10}, EC_{50}) moet binnen de testconcentraties vallen, zodat de EC_x daarna afkomstig is van interpolatie in plaats van extrapolatie.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

5. Bij voorkeur zijn de oplosbaarheid in water, de log K_{ow}, de grond/water-verdelingscoëfficiënt (bv. hoofdstuk C.18 of C.19 van deze bijlage) en de dampspanning van de teststof bekend. Aanvullende informatie over het lot van de teststof in de bodem, zoals de fotolyse- en hydrolysesnelheid, is gewenst.

6. Deze testmethode kan zowel voor in water oplosbare als voor in water onoplosbare stoffen worden gebruikt. De wijze van aanbrengen van de teststof zal echter verschillen. De testmethode is niet van toepassing op vluchtige stoffen, d.w.z. stoffen waarvoor de Henry-constante of de lucht/water-verdelingscoëfficiënt groter dan één is, of stoffen waarvoor de dampspanning bij 25 °C groter dan 0,0133 Pa is.

▼M6

GELDIGHEID VAN DE TEST

7. Voor een geldige test moet in de controles aan de volgende prestatiecriteria worden voldaan:

— de mortaliteit van volwassen dieren mag aan het eind van de bereikbepalingstest en na de eerste drie weken van de voortplantingstest niet hoger zijn dan 20 %.

— aannemende dat bij de opzet van de test 10 volwassen dieren per vat zijn gebruikt, moeten aan het eind van de test gemiddeld ten minste 25 nakomelingen per vat zijn voortgebracht.

— de variatiecoëfficiënt rond het gemiddelde aantal jonge dieren mag aan het eind van de voortplantingstest niet hoger zijn dan 50 %.

Wanneer een test niet aan de hierboven genoemde geldigheidscriteria voldoet, moet de test worden beëindigd, tenzij voortzetting van de test kan worden gemotiveerd. De motivering moet in het testverslag worden opgenomen.

REFERENTIESTOF

8. Een referentiestof moet hetzij op gezette tijden of als onderdeel van elke test worden getest om te verifiëren dat de respons van de testorganismen in de loop van de tijd niet significant is gewijzigd. Een geschikte referentiestof is carbendazim, waarvan is aangetoond dat het de overleving en voortplanting van enchytreeën beïnvloedt (13)(14), maar er kunnen ook andere stoffen worden gebruikt waarvan de toxiciteitsgegevens goed bekend zijn. In een ringtest is een formulering van carbendazim gebruikt die bekend is onder de handelsnaam Derosal ™, wordt geleverd door AgrEvo Company (Frankfurt, Duitsland) en 360 g/l (32,18 %) werkzaam bestanddeel bevat (2). De in de ringtest bepaalde EC_{50} voor de voortplanting lag in het bereik van 1,2 ± 0,8 mg werkzaam bestanddeel (w.b.)/kg droge massa (2). Indien in de testreeks een positieve toxische standaard wordt opgenomen, wordt één concentratie gebruikt en moet het aantal replicaten hetzelfde zijn als in de controles. Voor carbendazim wordt het testen van 1,2 mg w.b./kg drooggewicht (getest als vloeibare formulering) aanbevolen.

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Benodigdheden

9. De testvaten moeten van glas of een ander chemisch inert materiaal gemaakt zijn. Glazen potten (bv. inhoud: 0,20 - 0,25 liter; diameter: ≈ ≈ 6 cm) zijn geschikt. De vaten moeten een transparant deksel hebben (bv. van glas of polyethyleen) dat zo is ontworpen dat verdampingsverlies wordt tegengegaan, maar gasuitwisseling tussen de grond en de lucht mogelijk is. De deksels moeten transparant zijn om licht door te kunnen laten.

10. Een standaard-laboratoriumuitrusting is vereist, in het bijzonder:

— droogkast;

— stereomicroscoop;

— pH-meter en fotometer;

— geschikte nauwkeurige weegschalen;

— adequate apparatuur voor temperatuurregeling;

— adequate apparatuur voor vochtigheidsregeling (niet noodzakelijk als de blootstellingsvaten een deksel hebben);

— incubator of kleine kast met klimaatregelaar;

— pincet, haken of ogen;

— fotobad.

Bereiding van de kunstmatige grond

11. In deze test wordt een kunstmatige grond gebruikt (5)(7) die als volgt is samengesteld (gebaseerd op drooggewicht, gedroogd tot een constant gewicht bij 105 °C):

▼M6

— 10 % veenmosturf, luchtdroog en fijngemalen (een deeltjesgrootte van 2 ± 1 mm is aanvaardbaar); er wordt aanbevolen te controleren dat grond die is gemaakt op basis van een verse batch turf, geschikt is voor het kweken van de wormen, voordat de grond in een test wordt gebruikt;

— 20 % kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

— ongeveer 0,3 tot 1,0 % calciumcarbonaat ($CaCO_3$, verpulverd, analytisch zuiver) om een pH van 6,0 ± 0,5 te verkrijgen; de toe te voegen hoeveelheid calciumcarbonaat zal vooral afhangen van de kwaliteit/aard van de turf;

— ongeveer 70 % luchtdroog kwartszand (afhankelijk van de benodigde hoeveelheid $CaCO_3$), overwegend bestaande uit fijn zand; meer dan 50 % van de deeltjes moet een grootte tussen 50 en 200 micron hebben.

Het is raadzaam aan te tonen dat de kunstmatige grond geschikt is voor het kweken van de wormen en geschikt is om aan het geldigheidscriterium te voldoen, voordat de grond in een definitieve test wordt gebruikt. In het bijzonder wordt aangeraden een dergelijke controle uit te voeren om te garanderen dat de uitvoering van de test niet in het gedrang komt wanneer het gehalte organische koolstof van de kunstmatige grond wordt verlaagd, bv. door vermindering van het turfgehalte tot 4-5 % en dienovereenkomstige verhoging van het zandgehalte. Door een dergelijke verlaging van het gehalte organische koolstof kan de hechting van de teststof aan de grond (organische koolstof) afnemen en kan de beschikbaarheid van de teststof voor de wormen toenemen. Aangetoond is dat *Enchytraeus albidus* aan de geldigheidscriteria voor de voortplanting kan voldoen bij tests in veldgrond met een lager gehalte organische koolstof dan hierboven genoemd (bv. 2,7 %) (15), en de — weliswaar beperkte — ervaring leert dat dit ook kan worden bereikt in kunstmatige grond met 5 % turf.

Noot: Wanneer in aanvullende tests (bv. van de latere fasen) natuurlijke grond wordt gebruikt, moet eveneens worden aangetoond dat de grond geschikt is en dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria.

12. De droge bestanddelen van de grond worden grondig gemengd (bv. in een grote laboratoriummenger). Dit moet ten minste één week voor aanvang van de test geschieden. De gemengde grond moet ten minste twee dagen worden opgeslagen om de zuurgraad te equilibreren/stabiliseren. Voor de bepaling van de pH moet een mengsel van grond en een oplossing van 1 M kaliumchloride (KCl) of 0,01 M calciumchloride ($CaCl_2$) in een verhouding van 1:5 worden gebruikt (zie (16) en aanhangsel 3). Als de grond zuurder is dan het vereiste bereik (zie punt 11), kan de zuurgraad worden verlaagd door toevoeging van een passende hoeveelheid $CaCO_3$. Als de grond te alkalisch is, kan dit worden gecorrigeerd door toevoeging van meer van het in punt 11 bedoelde mengsel, maar zonder $CaCO_3$

13. Het maximale waterhoudend vermogen (WHV) van de kunstmatige grond wordt bepaald overeenkomstig de procedures als beschreven in aanhangsel 2. Een of twee dagen voor aanvang van de test wordt de droge kunstmatige grond vooraf bevochtigd door genoeg gedeïoniseerd water toe te voegen om ongeveer de helft van het uiteindelijke watergehalte te verkrijgen, d.w.z. 40 tot 60 % of het maximale waterhoudend vermogen. Bij aanvang van de test wordt de vooraf bevochtigde grond verdeeld in zoveel porties als het aantal testconcentraties (en in voorkomend geval referentiestof) en controles dat

▼M6

voor de test wordt gebruikt. Het vochtgehalte wordt aangepast tot 40-60 % van WHV_{max} door de teststofoplossing en/of gedestilleerd of gedeïoniseerd water toe te voegen (zie de punten 19-21). Het vochtgehalte wordt aan het begin en aan het eind van de test bepaald (door droging tot constant gewicht bij 105 °C) en moet binnen het optimale bereik voor de overleving van de wormen liggen. Een ruwe controle van het vochtgehalte van de grond wordt verkregen wanneer men de grond lichtjes in de hand knijpt. Als het vochtgehalte in orde is, moeten kleine druppels water tussen de vingers verschijnen.

Selectie en voorbereiding van de proefdieren

14. De aanbevolen testsoort is *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (witte potworm), een lid van de familie der *Enchytraeidae* (orde *Oligochaeta*, stam *Annelida*). *E. albidus* is een van de grootste soorten enchytreeën, met een geregistreerde lengte tot 35 mm (17)(18). *E. albidus* komt over de hele wereld voor en wordt aangetroffen in mariene, limnische en terrestrische habitats, hoofdzakelijk in ontbindend organisch materiaal (zeewier, compost) en zelden in weiden (9). Deze brede ecologische tolerantie en een aantal morfologische variaties zouden erop kunnen duiden dat er verschillende rassen bestaan.

15. *E. albidus* is in de handel verkrijgbaar als voeding voor vissen. Gecontroleerd dient te worden of de cultuur verontreinigd is door andere, gewoonlijk kleinere soorten (1) (19). Indien verontreiniging optreedt, moeten alle wormen met water worden gewassen in een petrischaal. Vervolgens moeten grote volwassen exemplaren van *E. albidus* worden geselecteerd (met behulp van een stereomicroscoop) om een nieuwe cultuur te beginnen, en moeten alle overige wormen worden vernietigd. *E. albidus* kan worden gekweekt in een grote diversiteit aan organische stoffen (zie aanhangsel 4). De levenscyclus van *E. albidus* is kort, aangezien volwassenheid wordt bereikt tussen 33 dagen (bij 18 °C) en 74 dagen (bij 12 °C) (1). Voor de test worden enkel culturen gebruikt die zonder problemen gedurende ten minste 5 weken (één generatie) in het laboratorium zijn gehouden.

16. Andere soorten van het geslacht *Enchytraeus* zijn ook geschikt, bv. *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 of *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (zie aanhangsel 5). Indien andere soorten van het geslacht *Enchytraeus* worden gebruikt, moeten ze duidelijk worden geïdentificeerd en moet de motivering van de keuze van de soort worden gerapporteerd.

17. De dieren die in de tests worden gebruikt, zijn volwassen wormen. Zij moeten eitjes (witte stipjes) in de clitellumstreek hebben en van ongeveer gelijke lengte zijn (circa 1 cm). Synchronisatie van de kweekcultuur is niet noodzakelijk.

18. Als de enchytreeën niet in hetzelfde type grond en onder dezelfde omstandigheden (inclusief voeding) worden gekweekt als gebruikt voor de uiteindelijke test, moeten zij ten minste 24 uur en maximaal drie dagen worden geacclimatiseerd. In eerste instantie moet een groter aantal volwassen dieren worden geacclimatiseerd dan voor de uitvoering van de test benodigd is, om rekening te houden met de mogelijke afkeuring van beschadigde of anderszins ongeschikte exemplaren. Aan het eind van de acclimatiseringsperiode worden voor de test enkel wormen geselecteerd die eitjes hebben en geen gedragsafwijkingen vertonen (bv. uit de grond proberen te ontsnappen). De wormen worden voorzichtig met een juwelierspincet, haken of ogen verwijderd en geplaatst in een petrischaal met een kleine hoeveelheid zoet water. Synthetisch zoet water als voorgesteld in hoofdstuk C.20 van deze bijlage (*Daphnia magna* voortplantingstest) heeft voor dit doel de voorkeur, omdat gedeïoniseerd, gedemineraliseerd of kraanwater schadelijk kan zijn voor de wormen. De wormen worden onder een stereomicroscoop geïnspecteerd, en wormen die geen eitjes bevatten worden verwijderd. Mijten en springstaarten die de culturen mogelijk hebben geïnfecteerd, worden zorgvuldig verwijderd. Gezonde wormen die niet voor de test worden gebruikt, worden teruggeplaatst in de stamcultuur.

▼M6

Bereiding van testconcentraties

In water oplosbare teststof

19. Een oplossing van de teststof wordt bereid in gedeïoniseerd water in een hoeveelheid die voldoende is voor alle replicaten van één testconcentratie. Aanbevolen wordt een passende hoeveelheid water te gebruiken om het vereiste vochtgehalte te bereiken, d.w.z. 40 tot 60 % van WHV_{max} (zie punt 13). Elke oplossing van de teststof wordt grondig door één batch vooraf bevochtigde grond gemengd voordat de grond in het testvat wordt gedaan.

In water onoplosbare teststof

20. Indien de teststof niet in water oplosbaar is, maar wel oplosbaar in organische oplosmiddelen, kan de teststof worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bv. aceton). Enkel vluchtige oplosmiddelen mogen worden gebruikt. Het oplosmiddel wordt op een kleine hoeveelheid, bv. 2.5 g, fijn kwartszand gespoten of daarmee vermengd. Het oplosmiddel wordt verwijderd door het gedurende ten minste één uur in een afzuigkast te verdampen. Het mengsel van kwartszand en teststof wordt toegevoegd aan de vooraf bevochtigde grond en, na toevoeging van een passende hoeveelheid gedeïoniseerd water, grondig gemengd om het vereiste vochtgehalte te verkrijgen. Het uiteindelijke mengsel wordt in de testvaten gedaan.

21. Voor chemische stoffen die slecht in water en slecht in organische oplosmiddelen oplosbaar zijn, kan het equivalent van 2,5 g fijngemalen kwartszand per testvat worden gemengd met de hoeveelheid teststof die nodig is om de gewenste testconcentratie te verkrijgen. Dit mengsel van kwartszand en teststof wordt toegevoegd aan de vooraf bevochtigde grond en, na toevoeging van een passende hoeveelheid gedeïoniseerd water, grondig gemengd om het vereiste vochtgehalte te verkrijgen. Het uiteindelijke mengsel wordt verdeeld over de testvaten. De procedure wordt voor iedere testconcentratie herhaald en tevens wordt een passende controlegroep bereid.

22. Stoffen mogen normaal gesproken niet worden getest bij concentraties die hoger zijn dan 1 000 mg/kg droge massa grond. Testen bij hogere concentraties kan voor de doelstellingen van een specifieke test echter noodzakelijk zijn.

UITVOERING VAN DE PROEVEN

Test-en controlegroepen

23. Voor elke testconcentratie wordt een hoeveelheid testgrond overeenkomend met 20 g drooggewicht in het testvat gedaan (zie de punten 19-21). Er worden ook controles, zonder de teststof, voorbereid. Aan elk vat wordt voeding toegevoegd overeenkomstig de in punt 29 beschreven procedures. Aan elk testvat worden willekeurig tien wormen toegewezen. De wormen worden voorzichtig naar elk testvat overgebracht en met behulp van bijvoorbeeld een juwelierspincet, haken of ogen op de oppervlakte van de grond geplaatst. Het aantal replicaten voor testconcentraties en voor controles hangt af van de gebruikte testopzet (zie punt 34). De testvaten worden willekeurig in de testincubator geplaatst en deze posities worden wekelijks opnieuw gerandomiseerd.

24. Als voor de toevoeging van de teststof een oplosmiddel wordt gebruikt, moet er naast de testreeksen één controlereeks zijn die besproeid kwartszand of kwartszand vermengd met oplosmiddel bevat. De concentratie van het oplosmiddel of dispergeermiddel moet dezelfde zijn als die in de vaten met de teststof. Er moet een controlereeks met extra kwartszand (2,5 g per vat) worden uitgevoerd voor stoffen die moeten worden toegediend overeenkomstig de in punt 21 beschreven procedures.

▼M6

Testomstandigheden

25. De testtemperatuur is 20 ± 2 °C. Om wormen te ontmoedigen uit de grond te ontsnappen, wordt de test uitgevoerd bij gecontroleerde licht-donkercycli (bij voorkeur 16 uur licht en 8 uur donker), met een verlichting van 400 tot 800 lux in het gebied van de testvaten.

26. Om de vochtigheidsgraad van de grond te controleren, worden de vaten aan het begin van de test en vervolgens één keer per week gewogen. Gewichtsverlies wordt aangevuld door de toevoeging van een passende hoeveelheid gedeïoniseerd water. Er zij opgemerkt dat het vochtverlies kan worden beperkt door in de testincubator een hoge luchtvochtigheid (> 80 %) te handhaven.

27. Het vochtgehalte en de pH moeten aan het begin en aan het eind van de bereikbepalingstest en de definitieve test worden gemeten. De metingen moeten geschieden in de controlegrondmonsters en in de behandelde grondmonsters (alle concentraties) die op dezelfde wijze zijn bereid en worden bewaard als de testculturen, maar geen wormen bevatten. Aan deze grondmonsters mag uitsluitend aan het begin van de test voedsel worden toegevoegd om de microbiële activiteit te bevorderen. De hoeveelheid toegevoegd voedsel moet gelijk zijn aan die van de testculturen. Het is niet nodig om tijdens de test verder voedsel aan deze vaten toe te voegen.

Voeding

28. Er mag voedsel worden gebruikt dat de populatie enchytreeën in stand kan houden. Havervlokken, bij voorkeur vóór gebruik in een autoclaaf gesteriliseerd om microbiële besmetting te voorkomen (verhitting is ook geschikt) zijn als voedingsstof geschikt bevonden.

29. Voedsel wordt de eerst keer verstrekt door vóór de plaatsing van de wormen 50 mg gemalen havervlokken met de grond in elk vat te vermengen. Daarna wordt wekelijks tot en met dag 21 voedsel verstrekt. Op dag 28 wordt geen voeding verstrekt, omdat de volwassen dieren in die fase zijn verwijderd en de jonge wormen vanaf dit punt relatief weinig aanvullende voeding nodig hebben. De voeding tijdens de test bestaat uit 25 mg gemalen havervlokken per vat en wordt voorzichtig op het oppervlak van de grond aangebracht om beschadiging van de wormen te vermijden. Om schimmelgroei te beperken moeten de havervlokken in de grond worden begraven door ze te bedekken met kleine hoeveelheden grond. Als het voedsel niet volledig wordt opgegeten, moet de portie worden verkleind.

Opzet van de bereikbepalingstest

30. Indien nodig wordt een bereikbepalingstest uitgevoerd met bijvoorbeeld vijf teststofconcentraties van 0,1, 1,0, 10, 100 en 1 000 mg/kg (drooggewicht grond). Eén replicaat voor elke behandeling en controle volstaat.

31. De bereikbepalingstest duurt twee weken. Aan het eind van de test wordt de mortaliteit van de wormen beoordeeld. Een worm wordt als dood geregistreerd indien hij niet reageert op een mechanische stimulus op de kop. Aanvullende informatie over de mortaliteit kan ook nuttig zijn om de reeks concentraties voor de definitieve test vast te stellen. Veranderingen in het gedrag van de volwassen dieren (bv. onvermogen om in de grond te graven, bewegingsloos tegen de glazen wand van het testvat liggen) en de morfologie van de volwassen dieren (bv. de aanwezigheid van open wonden) moeten daarom ook worden geregistreerd, evenals de aanwezigheid van eventuele nakomelingen. Dit laatste kan worden vastgesteld aan de hand van de in aanhangsel 6 beschreven kleuringsmethode.

32. De LC_{50} kan worden geschat door het meetkundig gemiddelde van de mortaliteitsgegevens te berekenen. Bij het vaststellen van het concentratiebereik voor de definitieve test worden de effecten op de voortplanting geacht maximaal een factor 10 kleiner te zijn dan de LC_{50}. Dit is echter

▼M6

een empirisch verband dat in specifieke gevallen anders kan zijn. Aanvullende waarnemingen die tijdens de bereikbepalingstest worden gedaan, zoals het voorkomen van nakomelingen, kunnen het concentratiebereik van de teststof dat in de definitieve test moet worden gebruikt, helpen verfijnen.

33. Voor een nauwkeurige bepaling van de LC_{50} wordt aanbevolen de test uit te voeren met ten minste vier replicaten elk van de teststofconcentratie en een toereikend aantal concentraties om ten minste vier statistisch significant verschillende gemiddelde responsen op deze concentraties te veroorzaken. Indien van toepassing wordt voor de controles hetzelfde aantal concentraties en replicaten gebruikt.

Opzet van de definitieve voortplantingstest

34. Op basis van de aanbevelingen voortvloeiende uit een ringtest (2) worden drie opzetten voorgesteld.

— Voor de bepaling van de NOEC moeten ten minste vijf concentraties worden getest die een meetkundige reeks vormen. Aanbevolen wordt vier replicaten voor elke testconcentratie plus acht controles te gebruiken. De concentraties moeten worden gekozen met intervallen die onderling verschillen met een factor van niet meer dan 1,8.

— Voor de bepaling van de EC_x (bv. EC_{10}, EC_{50}) moeten ten minste vijf concentraties worden getest en moet de EC_x in het concentratiebereik liggen om bepaling van EC_x door interpolatie in plaats van extrapolatie mogelijk te maken. Het wordt aanbevolen ten minste vier replicaten voor elke testconcentratie en vier replicaten voor de controles te gebruiken. De intervalsfactor kan variëren, d.w.z. kleiner dan of gelijk aan 1,8 in het verwachte effectbereik en groter dan 1,8 bij de hogere en lagere concentraties.

— Een gecombineerde aanpak maakt het mogelijk om zowel de NOEC als de EC_x te bepalen. Er moeten acht behandelingsconcentraties die een meetkundige reeks vormen, worden gebruikt. Aanbevolen wordt vier replicaten voor iedere behandeling plus acht controles te gebruiken. De concentraties moeten worden gekozen met intervallen die onderling verschillen met een factor van niet meer dan 1,8.

35. Er moeten tien volwassen wormen per testvat worden gebruikt (zie punt 23). Voedsel wordt aan het begin van de test en vervolgens één keer per week aan de testvaten toegevoegd (zie punt 29) tot en met dag 21. Op dag 21 worden de grondmonsters voorzichtig met de hand doorzocht, worden de levende volwassen wormen geobserveerd en geteld en worden veranderingen in het gedrag (bv. onvermogen om in de grond te graven, bewegingsloos tegen de glazen wand van het testvat liggen) en de morfologie (bv. de aanwezigheid van open wonden) geregistreerd. Alle volwassen wormen worden vervolgens uit de testvaten en de testgrond verwijderd. De testgrond die geproduceerde cocons bevat, wordt nog eens drie weken onder dezelfde testomstandigheden geïncubeerd, behalve dat enkel op dag 35 voedsel wordt toegevoegd (d.w.z. 25 mg gemalen havervlokken per vat).

36. Na zes weken worden de nieuw uitgekomen wormen geteld. De methode gebaseerd op kleuring met Bengaals rood (zie aanhangsel 6) wordt aanbevolen, maar er is ook aangetoond dat andere natte (maar niet warme) extractie- en drijftechnieken (zie aanhangsel 6) geschiktheid zijn (4)(10)(11)(20). Kleuring met Bengaals rood wordt aanbevolen, omdat natte extractie uit een grondsubstraat hinder kan ondervinden van troebelheid als gevolg van gesuspendeerde kleideeltjes.

Limiettest

37. Als bij de hoogste concentratie in de bereikbepalingstest (d.w.z. 1 000 mg/kg) geen effecten worden waargenomen, kan de voortplantingstest worden uitgevoerd als een limiettest, waarbij 1 000 mg/kg wordt gebruikt om aan te tonen dat de NOEC voor de voortplanting groter is dan deze waarde.

▼M6

Samenvatting en tijdschema van de test

38. De stappen van de test kunnen als volgt worden samengevat:

Tijdstip	Bereikbepalingstest	Definitieve test
Dag – 7 of eerder	— Bereid kunstmatige grond (mengen van droge bestanddelen)	— Bereid kunstmatige grond (mengen van droge bestanddelen)
Dag – 5	— Controleer de pH van de kunstmatige grond — Meet WHV_{max} van de grond	— Controleer de pH van de kunstmatige grond — Meet WHV_{max} van de grond
Dag – 5 tot – 3	— Sorteer de wormen voor acclimatisering	— Sorteer de wormen voor acclimatisering
Dag – 3 tot 0	— Acclimatiseer de wormen gedurende ten minste 24 uur	— Acclimatiseer de wormen gedurende ten minste 24 uur
Dag – 1	— Bevochtig vooraf de kunstmatige grond en verdeel de grond in batches	— Bevochtig vooraf de kunstmatige grond en verdeel de grond in batches
Dag 0	— Bereid stamoplossingen — Breng teststof aan — Weeg het testsubstraat af in de testvaten — Meng het voedsel erdoorheen — Plaats de wormen — Meet de pH en het vochtgehalte van de grond	— Bereid stamoplossingen — Breng teststof aan — Weeg het testsubstraat af in de testvaten — Meng het voedsel erdoorheen — Plaats de wormen — Meet de pH en het vochtgehalte van de grond
Dag 7	— Controleer het vochtgehalte van de grond	— Controleer het vochtgehalte van de grond — Geef voedsel
Dag 14	— Bepaal de mortaliteit van de volwassen dieren — Schat het aantal nakomelingen — Meet de pH en het vochtgehalte van de grond	— Controleer het vochtgehalte van de grond — Geef voedsel
Dag 21		— Observeer het gedrag van de volwassen dieren — Verwijder de volwassen dieren — Bepaal de mortaliteit van de volwassen dieren — Controleer het vochtgehalte van de grond — Geef voedsel
Dag 28		— Controleer het vochtgehalte van de grond — Geef géén voedsel
Dag 35		— Controleer het vochtgehalte van de grond — Geef voedsel
Dag 42		— Tel de jonge wormen — Meet de pH en het vochtgehalte van de grond

▼M6

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

39. Hoewel aanhangsel 7 een overzicht bevat, wordt in deze testmethode geen definitieve statistische richtsnoer voor de analyse van de testresultaten gegeven.

40. In de bereikbepalingstest is het belangrijkste eindpunt de mortaliteit. Veranderingen in het gedrag (bv. onvermogen om in de grond te graven, bewegingsloos tegen de glazen wand van het testvat liggen) en de morfologie (bv. de aanwezigheid van open wonden) van de volwassen wormen moeten echter ook worden geregistreerd, evenals de aanwezigheid van eventuele nakomelingen. Normaal gesproken moet probit-analyse (21) of logistische regressie worden toegepast om de LC_{50} te bepalen. In gevallen waarin deze analysemethode niet geschikt is (bv. als er minder dan drie concentraties met gedeeltelijke sterfte beschikbaar zijn), kunnen echter andere methoden worden gebruikt. Tot deze methoden behoren onder andere voortschrijdende gemiddelden (22), de getrimde Spearman-Karber-methode (23) of eenvoudige interpolatie (bv. meetkundig gemiddelde van LC_0 en LC_{100}, berekend als de vierkantswortel van LC_0 vermenigvuldigd met LC_{100}).

41. In de definitieve test is de vruchtbaarheid (d.w.z. het aantal voortgebrachte jonge dieren) het eindpunt van de test. Net als in de bereikbepalingstest moeten echter ook hier alle andere schadelijke tekenen worden geregistreerd in het eindverslag. De statistische analyse vereist dat het rekenkundig gemiddelde en de standaardafwijking per behandeling en per controle voor de voortplanting worden berekend.

42. Als een variantieanalyse is uitgevoerd, kunnen de standaardafwijking (s) en het aantal vrijheidsgraden (df) worden vervangen door respectievelijk de schatting van de gepoolde variantie verkregen uit de ANOVA en haar aantal vrijheidsgraden, mits de variantie niet afhankelijk is van de concentratie. Gebruik in dit geval de afzonderlijke varianties van de controle en de behandelingen. Deze waarden worden doorgaans berekend door commerciële statistische software met de resultaten per vat als replicaten. Als het poolen van de gegevens voor de negatieve en oplosmiddelcontroles redelijk lijkt, in plaats van het toetsen tegen een hiervan, moet worden getoetst of ze niet significant verschillen (zie punt 45 en aanhangsel 7 voor geschikte toetsen).

43. De verdere statistische toetsen en gevolgtrekkingen hangen af van de vraag of de replicaatwaarden normaal verdeeld zijn en homogeen zijn voor wat betreft hun variantie.

Schatting van NOEC

44. De toepassing van krachtige toetsen heeft de voorkeur. Er dient gebruik te worden gemaakt van informatie uit bv. eerdere ervaring met ringtesten of andere historische gegevens over de vraag of gegevens ongeveer normaal verdeeld zijn. Homogeniteit van variantie (homoscedasticiteit) is crucialer. De ervaring leert dat de variantie vaak toeneemt bij een hoger gemiddelde. In deze gevallen zou een gegevenstransformatie kunnen leiden tot homoscedasticiteit. Een dergelijke transformatie moet echter worden gebaseerd op de ervaring met historische gegevens in plaats van op gegevens van het lopende onderzoek. Bij homogene gegevens moeten multipele t-toetsen zoals de Williams-toets ($\alpha = 0{,}05$, eenzijdig) (24)(25) of in bepaalde gevallen de toets van Dunnett (26)(27) worden uitgevoerd. Er zij opgemerkt dat in het geval van ongelijke aantallen replicaten de tabel met t-waarden moet worden aangepast zoals voorgesteld door Dunnett en Williams. Soms nemen de

▼M6

responsen als gevolg van grote variatie niet regelmatig toe of af. In het geval van een sterke afwijking van monotoniciteit is de toets van Dunnett geschikter. Als er afwijkingen van homoscedasticiteit zijn, kan het redelijk zijn om mogelijke effecten op varianties nader te onderzoeken om te bepalen of de t-toetsen kunnen worden toegepast zonder al te zeer aan statistisch onderscheidingsvermogen in te boeten (28). Anders kan een multipele Mann-Whitney-toets, bv. de Bonferroni-toets volgens Holm (29), of wanneer deze gegevens heteroscedasticiteit vertonen maar anderszins consistent zijn met een onderliggende monotone dosis-respons, een andere verdelingsvrije toets (bv. Jonckheere-Terpstra (30) (31) of Shirley (32) (33)) worden toegepast, en deze zal doorgaans de voorkeur hebben boven t-toetsen voor ongelijke varianties. (Zie ook het schema in aanhangsel 7.)

45. Als een limiettest is uitgevoerd en er is voldaan aan de voorwaarden van parametrische toetsprocedures (normaliteit, homogeniteit), kan de gepaarde t-toets worden gebruikt, of anders de Mann-Whitney-toets (29).

Schatting van EC_x

46. Om een EC_x-waarde te berekenen worden de gemiddelden per behandeling gebruikt voor regressieanalyse (lineair of niet-lineair), nadat een passende dosis-responsfunctie is verkregen. Voor de groei van wormen als een continue respons kunnen EC_x-waarden worden geschat met behulp van geschikte regressieanalyse (35). Tot de geschikte functies voor binaire gegevens (mortaliteit/overleving en aantal geproduceerde nakomelingen) behoren de normale sigmoïde, logistische of Weibull-functies, met twee tot vier parameters, waarvan sommige ook hormetische responsen kunnen modelleren. Als een dosis-responsfunctie werd gefit door lineaire regressieanalyse, moet bij de regressieanalyse een significante r^2 (determinatiecoëfficiënt) en/of helling worden gevonden voordat de EC_x kan worden geschat door in de door de regressieanalyse gevonden vergelijking een waarde in te vullen die overeenkomt met x % van het controlegemiddelde. De 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen worden berekend overeenkomstig Fieller (geciteerd in Finney (21)) of andere passende moderne methoden.

47. De respons kan ook worden gemodelleerd als een percentage of proportie van de modelparameter die wordt geïnterpreteerd als de gemiddelde respons van de controle. In deze gevallen kan de normale (logistische, Weibull) sigmoïde curve vaak gemakkelijk aan de resultaten worden gefit met de probit-regressieprocedure (21). In deze gevallen moet de weegfunctie aan de metrische responsen worden aangepast zoals aangegeven door Christensen (36). Als echter hormese is waargenomen, moet probit-analyse worden vervangen door een logistische of Weibull-functie met vier parameters, die wordt gefit met een niet-lineaire regressieprocedure (36). Als geen geschikte dosis-responsfunctie aan de gegevens kan worden gefit, kunnen alternatieve methoden worden gebruikt om de EC_x en de betrouwbaarheidsgrenzen te schatten, zoals voortschrijdende gemiddelden volgens Thompson (22) en de getrimde Spearman-Karber-methode (23).

TESTVERSLAG

48. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysische aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen (bv. oplosbaarheid in water, dampspanning);

— chemische naam volgens de IUPAC-nomenclatuur, CAS-nummer, batch, partij, structuurformule en zuiverheid van de teststof;

— datum waarop de geldigheidsduur van het monster verstrijkt.

Diersoort:

— gebruikte testdieren: soort, wetenschappelijke naam, bron van de organismen en kweekomstandigheden.

Testomstandigheden:

— ingrediënten en bereiding van de kunstmatige grond;

▼M6

— wijze van aanbrengen van de teststof;

— beschrijving van de testomstandigheden, met inbegrip van de temperatuur, het vochtgehalte, de pH, enz.;

— volledige beschrijving van de testopzet en procedures.

Testresultaten:

— mortaliteit van de volwassen wormen na twee weken en het aantal nakomelingen aan het eind van de bereikbepalingstest;

— mortaliteit van de volwassen wormen na drie weken blootstelling en de volledige gegevens over nakomelingen aan het eind van de definitieve test;

— eventuele waargenomen fysieke of pathologische symptomen en gedragsveranderingen in de testorganismen;

— de LC_{50}, de NOEC en/of EC_x (bv. EC_{50}, EC_{10}) voor de voortplanting als een of meer hiervan van toepassing zijn, met betrouwbaarheidsintervallen en een grafiek van het gefitte model dat is gebruikt voor de berekening ervan, en alle informatie en waarnemingen die van nut zijn voor de interpretatie van de resultaten.

Afwijkingen van de procedures beschreven in deze testmethode en alle ongebruikelijke voorvallen tijdens de test.

LITERATUUR

(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. & Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 blz.

(3) Westheide, W. & Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Esser, G. & Overdieck, D. (eds.). blz. 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. & 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 pp.

(5) Hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. & A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. & 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. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. & Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). 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. & Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(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. & Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. & 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. & 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 (3rd ed.), blz. 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 & R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correctie 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. & F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. 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. & J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Aanhangsel 1

Definities

Voor de toepassing van deze testmethode worden de volgende definities gehanteerd:

Stof betekent een substantie of mengsel.

EC_x (Effect concentration for x % effect) is de concentratie die binnen een bepaalde blootstellingstijd x % van een effect op testorganismen veroorzaakt ten opzichte van een controle. In deze test worden de effectconcentraties uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond.

LC_0 (No lethal concentration) is de concentratie van een teststof die binnen een bepaalde blootstellingstijd geen van de blootgestelde testorganismen doodt. In deze test wordt de LC_0 uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond.

LC_{50} (Median lethal concentration) is de concentratie van een teststof die binnen een bepaalde blootstellingstijd 50 % van de blootgestelde testorganismen doodt. In deze test wordt de LC_{50} uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond.

LC_{100} (Totally lethal concentration) is de concentratie van een teststof die binnen een bepaalde blootstellingstijd 100 % van de blootgestelde testorganismen doodt. In deze test wordt de LC_{100} uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) is de laagste concentratie van een teststof die tot een statistisch significant effect ($p < 0,05$) leidt. In deze test wordt de LOEC uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond. Alle geteste concentraties boven de LOEC moeten gewoonlijk een effect laten zien dat statistisch afwijkt van de controle. Alle afwijkingen van het bovenstaande bij het vaststellen van de LOEC moeten in het testverslag worden verantwoord.

NOEC (No Observed Effect Concentration) is de hoogste concentratie van de teststof direct onder de LOEC waarbij geen effect wordt waargenomen. In deze test heeft de concentratie die overeenkomt met de NOEC geen statistisch significant effect ($p < 0,05$) binnen een bepaalde blootstellingsperiode in vergelijking met de controle.

Voortplantingssnelheid is het gemiddelde aantal jonge wormen op een bepaald aantal volwassen wormen dat gedurende de testperiode wordt geproduceerd.

Teststof betekent alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M6

Aanhangsel 2

Bepaling van het maximale waterhoudend vermogen

Bepaling van het waterhoudend vermogen van de kunstmatige grond

De volgende methode is geschikt bevonden. Zij is beschreven in bijlage C bij ISO DIS 11268-2.

Verzamel met een geschikt apparaat (grondboorbuis enz.) een vastgestelde hoeveelheid testgrondsubstraat (bv. 5 g). Bedek de onderkant van de buis met een stuk filterpapier, vul een waterbad en plaats de buis op een rek in het bad. De buis zou geleidelijk onder water moeten komen te staan, tot het water de bovenkant van de grond bereikt. Laat de buis gedurende ongeveer drie uur in het water. Niet alle water dat door de bodemcapillairen wordt geabsorbeerd, kan worden vastgehouden. Laat het grondmonster daarom gedurende twee uur uitlekken door de buis op een bed van zeer nat fijngemalen kwartszand in een afgesloten vat te plaatsen (om droging te voorkomen). Het monster moet vervolgens worden gewogen, gedroogd tot een constante massa bij 105 °C. Het waterhoudend vermogen (WHV) kan vervolgens als volgt worden berekend:

$$\text{WHV (in \% van droge massa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

waarbij:

S = met water verzadigd substraat + massa van buis + massa van filterpapier

T = leeggewicht (massa van buis + massa van filterpapier)

D = droge massa van substraat

LITERATUUR:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼M6

Aanhangsel 3

Bepaling van de pH van de grond

De volgende methode voor het bepalen van de pH van een grondmonster is gebaseerd op de beschrijving in ISO 10390 (Bodemkwaliteit — Bepaling van de pH-waarde).

Een vastgestelde hoeveelheid grond wordt gedurende ten minste 12 uur bij kamertemperatuur gedroogd. Vervolgens wordt een suspensie van de grond (die ten minste 5 g grond bevat) gemaakt in vijf keer zijn volume van hetzij een 1 M-oplossing van analytisch zuiver kaliumchloride (KCl) of een 0,01 M-oplossing van analytisch zuiver calciumchloride ($CaCl_2$). De suspensie wordt daarna vijf minuten lang goed geschud. Na het schudden krijgt de suspensie ten minste 2 uur, maar niet langer dan 24 uur, gelegenheid om te bezinken. Daarna wordt de pH van de vloeibare fase gemeten met een pH-meter die vóór elke meting is geijkt met een passende reeks bufferoplossingen (bv. pH 4,0 en 7,0).

LITERATUUR:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Aanhangsel 4

Kweekomstandigheden van *Enchytraeus* sp.

Enchytreeën van de soort *Enchytraeus albidus* (alsmede andere *Enchytraeus*-soorten) kunnen worden gekweekt in grote plastic bakken (bv. 30 × 60 × 10 cm) die gevuld zijn met een 1:1-mengsel van kunstmatige grond en natuurlijke, niet verontreinigde tuinaarde. Compostmateriaal moet worden vermeden, aangezien dit toxische stoffen zoals zware metalen kan bevatten. Voordat de grond wordt gebruikt, moet alle fauna eruit worden verwijderd (bv. door diepvriezen). Een substraat van uitsluitend kunstmatige grond kan ook worden gebruikt, maar de voortplantingssnelheid zou lager kunnen zijn dan bij gebruik van een substraat van gemengde grond. Het substraat dat voor de kweek wordt gebruikt, moet een pH van 6,0 ± 0,5 hebben.

De cultuur moet op een temperatuur tussen 15 °C en 20 °C ± 2 °C worden gehouden. Temperaturen hoger dan 23 °C moeten worden vermeden. De grond moet vochtig worden gehouden, maar niet nat. Bij de juiste vochtigheidsgraad van de grond verschijnen kleine druppels water tussen de vingers wanneer men de grond lichtjes in de hand knijpt. Het ontstaan van anoxische omstandigheden moet worden vermeden door ervoor te zorgen dat deksels op kweekbakken voldoende uitwisseling van gassen met de lucht mogelijk maken. De grond moet elke week voorzichtig worden losgemaakt om de beluchting te bevorderen.

De wormen kunnen worden gevoed met havervlokken. De havervlokken moeten in een afgesloten verpakking worden bewaard en moeten voor gebruik in een autoclaaf worden gesteriliseerd of worden verhit om infestering met meelmijten (bv. *Glycyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) of roofmijten (bv. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*) te voorkomen. Na een warmtebehandeling moet het voedsel worden vermalen, zodat het gemakkelijk op het grondoppervlak kan worden gestrooid. Van tijd tot tijd kunnen de havervlokken worden aangevuld met vitaminen, melk en levertraan. Andere geschikte voedselbronnen zijn bakkersgist of het visvoer „TetraMin”.

De voeding wordt ongeveer twee keer per week verstrekt. Een passende hoeveelheid havervlokken wordt op het grondoppervlak gestrooid of voorzichtig in het substraat gemengd wanneer de grond wordt losgemaakt om de beluchting te bevorderen. De absolute hoeveelheid verstrekt voedsel hangt af van het aantal wormen in het substraat. Als richtsnoer, moet de hoeveelheid voedsel worden verhoogd als deze binnen één dag na verstrekking helemaal is geconsumeerd. Omgekeerd, moet de hoeveelheid voedsel worden verlaagd als er op het moment van de tweede voeding (één week later) nog steeds voedsel op het oppervlak aanwezig is. Verontreinigd voedsel met schimmelgroei moet worden verwijderd en vervangen. Na drie maanden moeten de wormen worden overgebracht naar een vers bereid substraat.

De kweekomstandigheden worden toereikend geacht als de wormen: (a) niet proberen het grondsubstraat te verlaten, (b) zich snel door de grond voortbewegen, (c) een glanzend buitenoppervlak hebben waaraan geen gronddeeltjes kleven, (d) een min of meer wittige kleur hebben, en (e) als er wormen van verschillende leeftijden zichtbaar zijn in de culturen en (f) de wormen zich voortdurend voortplanten.

▼M6

Aanhangsel 5

Uitvoering van de test met andere *Enchytraeus*-soorten

Keuze van de soorten

Er mogen andere soorten dan *E. albidus* worden gebruikt, maar de testprocedure en de geldigheidscriteria moeten in dat geval dienovereenkomstig worden aangepast. Omdat veel *Enchytraeus*-soorten gemakkelijk verkrijgbaar zijn en op bevredigende wijze in het laboratorium kunnen worden gehouden, zijn het belangrijkste criterium voor het kiezen van een andere soort dan *E. albidus* het ecologisch belang en, daarnaast, de relatieve gevoeligheid. Er kunnen ook formele redenen zijn om een andere soort te kiezen. Zo zal het in landen waar *E. albidus* niet voorkomt en niet kan worden geïmporteerd (bv. vanwege quarantainebeperkingen), nodig zijn een andere *Enchytraeus*-soort te gebruiken.

Voorbeelden van geschikte alternatieve soorten

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): In de afgelopen jaren is deze soort vaak gebruikt in ecotoxicologische studies vanwege de eenvoud van kweken en testen. De soort is echter klein en dit maakt de hantering moeilijker in vergelijking met *Enchytraeus albidus* (vooral in de fasen vóór gebruik van de kleuringsmethode). Het staat niet vast dat *E. crypticus* in het veld voorkomt, aangezien de soort alleen in regenwormculturen is beschreven. De ecologische behoeften van de soort zijn derhalve onbekend.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Deze naam dekt waarschijnlijk een groep nauwverwante soorten die morfologisch moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn. Het gebruik van de soort in tests wordt afgeraden, tenzij kan worden vastgesteld tot welke soort de in een test te gebruiken afzonderlijke wormen behoren. *E. buchholzi* komt gewoonlijk voor in weiden en op verstoorde plekken, zoals wegkanten.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Deze soort stond oorspronkelijk bekend als *E. „minutus”*, maar is onlangs beschreven (1). Hij werd voor het eerst aangetroffen door U. Graefe (Hamburg) in een weide in de buurt van St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Duitsland). *E. luxuriosus* is ongeveer half zo groot als E. albidus, maar is groter dan de andere soorten die hier worden besproken; deze soort kan daardoor een goed alternatief zijn voor *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Deze soort is tot nu toe aangetroffen in Duitse en Spaanse minerale gronden, waar de soort algemeen voorkomt, maar gewoonlijk niet zeer talrijk is. De soort is gemakkelijk te herkennen vergeleken met andere kleine soorten van dit geslacht. Er is niets bekend over het gedrag van de soort in laboratoriumtests of over zijn gevoeligheid voor chemische stoffen. De soort blijkt echter wel gemakkelijk te kweken (E. Belotti, persoonlijke mededeling).

Kweekomstandigheden

Alle hierboven genoemde *Enchytraeus*-soorten kunnen in dezelfde substraten worden gekweekt als gebruikt voor *E. albidus*. Door de kleinere omvang van de wormen kunnen de kweekbakken kleiner zijn. Weliswaar kan dezelfde voeding worden gebruikt, maar de portiegrootte moet worden aangepast. De levenscyclus van deze soorten is korter dan die van *E. albidus* en er moet vaker voedsel worden verstrekt.

Testomstandigheden

De testomstandigheden zijn doorgaans dezelfde als gelden voor *E. albidus*, behalve:

— de omvang van het testvat kan kleiner zijn, maar dat hoeft niet;

— de duur van de voortplantingstest kan korter zijn, d.w.z. vier in plaats van zes weken, maar dat hoeft niet; de duur van de bereikbepalingstest mag echter niet worden gewijzigd;

— gelet op de geringe grootte van de jonge wormen wordt het gebruik van de kleuringsmethode voor het tellen ten zeerste aanbevolen;

— het geldigheidscriterium voor „het aantal jonge wormen per testvat in de controle” moet worden vervangen door „50”.

▼**M6**

LITERATUUR

(1) Schmelz, R.M. & Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Aanhangsel 6

Gedetailleerde beschrijving van extractietechnieken

Kleuring met Bengaals rood

Deze methode, die oorspronkelijk werd ontwikkeld in de limnische ecologie (1), werd voor het eerst voor het tellen van jonge enchytreeën in de Enchytraeidae-voortplantingstest voorgesteld door W. de Coen (Universiteit van Gent, België). Onafhankelijk hiervan werd een gewijzigde versie (Bengaals rood gemengd met formaldehyde in plaats van ethanol) ontwikkeld door het RIVM in Bilthoven, Nederland (2)(3).

Aan het eind van de definitieve test (d.w.z. na zes weken) moet de grond in de testvaten worden overgebracht naar een ondiepe houder. Voor dit doel kunnen een Bellaplast-bak of een fotobad met geribbelde bodem worden gebruikt; laatstgenoemde is geschikt omdat de „ribbels" de beweging van de wormen binnen het waarnemingsveld beperken. De jonge wormen worden gefixeerd met ethanol (ca. 5 ml per replicaat). De vaten worden vervolgens gevuld met water tot een laag van 1 tot 2 cm. Er worden enkele druppels (200 tot 300 µl) Bengaals rood (1 %-oplossing in ethanol) toegevoegd (0,5 % eosine is een alternatief) en de twee bestanddelen worden voorzichtig gemengd. Na 12 uur moeten de wormen een rode kleur hebben gekregen en moeten ze gemakkelijk te tellen zijn, omdat ze op het oppervlak van het substraat liggen. Het substraat/alcoholmengsel kan ook, als alternatief, worden gewassen door een zeef (maaswijdte: 0,250 mm) vóór het tellen van de wormen. Wanneer deze methode wordt toegepast, wordt de kaoliniet, turf en een deel van het zand uitgewassen en zullen de roodgekleurde wormen gemakkelijker te zien en te tellen zijn. Het gebruik van verlichte lenzen (lensgrootte ten minste 100 × 75 mm met een vergrotingsfactor van 2 tot 3×) zal het tellen ook vergemakkelijken.

De kleuringstechniek verkort de benodigde tijd voor het tellen tot een paar minuten per vat. In de regel zou één persoon alle vaten van één test in maximaal twee dagen moeten kunnen beoordelen.

Natte extractie

Met de natte extractie moet worden begonnen zodra de test eindigt. De grond van elk testvat wordt in plastic zeven met een maaswijdte van circa 1 mm geplaatst. De zeven worden vervolgens op zodanige wijze in plastic kommen gehangen dat zij de bodem niet raken. De kommen worden voorzichtig met water gevuld tot de monsters in de zeven volledig onder water staan. Om een recoverypercentage van meer dan 90 % van de aanwezige wormen te waarborgen, moet een extractieperiode van 3 dagen bij 20 ± 2 °C worden aangehouden. Aan het eind van de extractieperiode worden de zeven uit de kommen gehaald en wordt het water (behalve wanneer het om een kleine hoeveelheid gaat) langzaam gedecanteerd, waarbij erop wordt gelet dat het sediment op de bodem van de kommen niet wordt verstoord. De plastic kommen worden daarna licht geschud om het sediment te suspenderen in het bovenstaande water. Het water wordt overgebracht in een petrischaal, en wanneer de gronddeeltjes zijn bezonken, kunnen de enchytreeën worden geïdentificeerd, verwijderd en geteld met behulp van een stereomicroscoop en een zacht stalen tangetje.

Flotatie

In een notitie van R. Kuperman is een methode gebaseerd op flotatie beschreven (4). Nadat de inhoud van een testvat met ethanol is gefixeerd, wordt de grond overstroomd met Ludox (AM-30 colloïdaal silicium, 30 gewichtspercent suspensie in water) tot een niveau van 10 tot 15 mm boven het grondoppervlak. Nadat de grond 2 tot 3 minuten grondig is gemengd met het flotatiemiddel, kunnen de jonge wormen die op het oppervlak drijven, gemakkelijk worden geteld.

LITERATUUR

(1) Korinkova, J. & 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. & 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 pp.

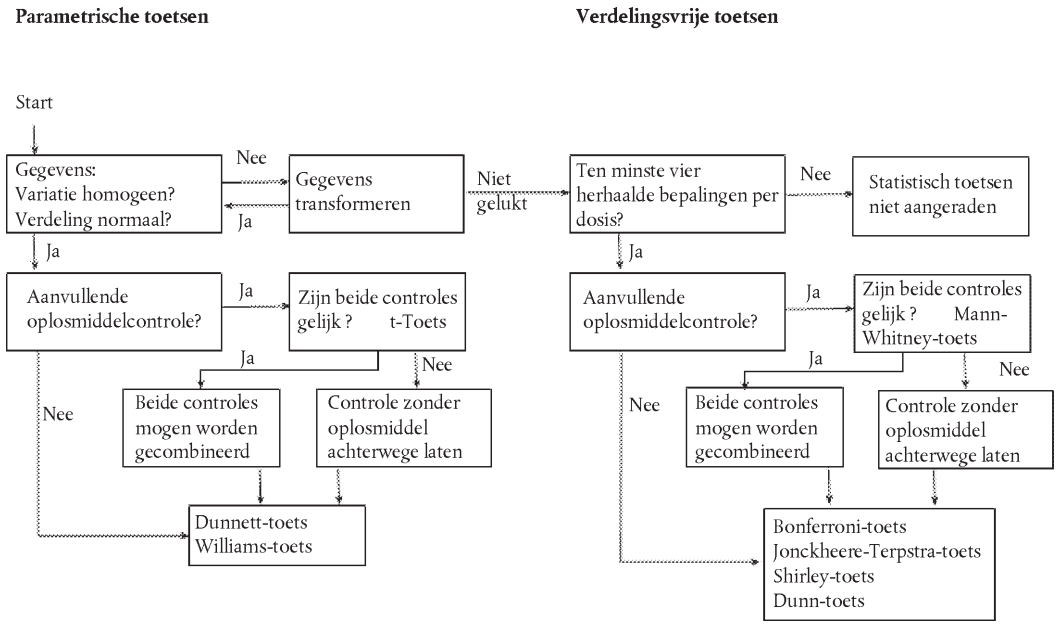
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. & Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. & Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, blz. 157.

▼M6

Aanhangsel 7

Overzicht van de statistische beoordeling van gegevens (NOEC-bepaling)



▼M6

C.33. VOORTPLANTINGSTEST MET REGENWORMEN (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 222 (2004) van de OESO. De test is opgezet om de effecten van stoffen in de bodem op het voortplantingsresultaat (en andere subletale eindpunten) van de regenwormsoorten *Eisenia fetida* (Savigny 1826) en *Eisenia andrei* (Andre 1963) te beoordelen (1)(2). De test is onderworpen aan een ringtest (3). Er bestaat een testmethode voor de acute toxiciteitstest voor regenwormen (4). Er is ook een aantal andere internationale en nationale richtsnoeren voor acute en chronische tests voor regenwormen gepubliceerd (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida /Eisenia andrei* worden beschouwd als vertegenwoordigers van bodemfauna en regenwormen in het bijzonder. Achtergrondinformatie over de ecologie van regenwormen en hun gebruik in ecotoxicologische tests is te vinden in (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIPE VAN DE TEST

3. Volwassen wormen worden blootgesteld aan een concentratiebereik van de teststof die door de grond is gemengd of, in het geval van pesticiden, wordt aangebracht in of op de grond volgens procedures die overeenkomen met het gebruikspatroon van de stof. De wijze van aanbrengen is specifiek voor het doel van de test. Het bereik van testconcentraties wordt zo gekozen dat de concentraties die waarschijnlijk binnen een periode van acht weken zowel subletale als letale effecten zullen hebben, binnen het bereik vallen. De effecten op de mortaliteit en groei van de volwassen wormen worden na 4 weken blootstelling bepaald. De volwassen wormen worden dan uit de grond verwijderd, en na nog eens 4 weken worden de effecten op de voortplanting beoordeeld door het aantal nakomelingen te tellen dat in de grond aanwezig is. Het voortplantingsresultaat van de wormen die zijn blootgesteld aan de teststof, wordt vergeleken met dat van de controle(s) om het volgende te bepalen: (i) de concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (no observed effect concentration, NOEC) en/of (ii) EC_x (bv. EC_{10}, EC_{50}) door met een regressiemodel een schatting te maken van de concentratie die zou leiden tot een afname van het voortplantingsresultaat met x %. De EC_x (bv. EC_{10}, EC_{50}) moet in het bereik van de testconcentraties liggen, zodat de EC_x kan worden bepaald door interpolatie in plaats van extrapolatie (zie aanhangsel 1 voor definities).

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

4. Over de teststof moeten de volgende gegevens beschikbaar zijn om passende testprocedures te helpen opzetten:

   — oplosbaarheid in water;

   — log K_{ow};

   — dampspanning;

   — en, indien mogelijk, informatie over het lot en het gedrag in het milieu (bv. fotolyse- en hydrolysesnelheid voor zover relevant voor aanbrengingspatronen).

5. Deze testmethode is van toepassing op alle stoffen, ongeacht hun oplosbaarheid in water. De testmethode is niet van toepassing op vluchtige stoffen, d.w.z. stoffen waarvoor de Henry-constante of de lucht/water-verdelingscoëfficiënt groter dan één is, of op stoffen waarvoor de dampspanning bij 25 °C groter dan 0,0133 Pa is.

6. In deze testmethode wordt geen rekening gehouden met mogelijke afbraak van de teststof in de loop van de test. Er kan dus niet worden aangenomen dat de blootstellingsconcentraties gedurende de gehele test hun beginwaarde behouden. Een chemische analyse van de teststof aan het begin en het eind van de test is in dat geval aanbevolen.

▼M6

REFERENTIESTOF

7. De NOEC en/of de EC_x van een referentiestof moeten worden bepaald om zekerheid te verkrijgen dat de testomstandigheden in het laboratorium toereikend zijn en om na te gaan dat de respons van de testorganismen in de loop van de tijd niet statistisch wijzigt. Het is raadzaam ten minste één keer per jaar of, wanneer de test met een vrij lage frequentie wordt uitgevoerd, tegelijk met de bepaling van de toxiciteit van een teststof een referentiestof te testen. Carbendazim of benomyl zijn geschikte referentiestoffen waarvan is aangetoond dat zij de voortplanting beïnvloeden (3). Er zouden significante effecten moeten worden waargenomen tussen (a) 1 en 5 mg werkzaam bestanddeel (w.b.)/kg droge massa of (b) 250-500 g/ha of 25-50 mg/m^2. Indien in de testreeks een positieve toxische standaard wordt opgenomen, wordt één concentratie gebruikt en moet het aantal replicaten hetzelfde zijn als in de controles.

GELDIGHEID VAN DE TEST

8. Wil een testresultaat geldig zijn, dan moet in de controlegroep aan de volgende criteria worden voldaan:

— elk replicaat (10 volwassen wormen bevattende) moet aan het eind van de test ≥ 30 nakomelingen hebben voortgebracht;

— de variatiecoëfficiënt van de voortplanting moet ≤ 30 % zijn;

— de mortaliteit van volwassen wormen in de eerste 4 weken van de test moet ≤ 10 % zijn.

Wanneer een test niet aan de hierboven genoemde geldigheidscriteria voldoet, moet de test worden beëindigd, tenzij voortzetting van de test kan worden gemotiveerd. De motivering dient in het verslag te worden opgenomen.

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Benodigdheden

9. Er moeten testvaten worden gebruikt die van glas of een ander chemisch inert materiaal gemaakt zijn en een inhoud hebben van een tot twee liter. De vaten moeten een oppervlakte van de doorsnede van circa 200 cm^2 hebben, zodat een vochtige substraatdikte van ongeveer 5-6 cm wordt bereikt wanneer 500 tot 600 g droge massa substraat wordt toegevoegd. De afsluiting van de vaten moet zo zijn ontworpen dat uitwisseling van gassen tussen het substraat en de lucht mogelijk is en licht wordt doorgelaten (bv. door middel van een geperforeerd transparant deksel), maar wordt voorkomen dat de wormen ontsnappen. Als de gebruikte hoeveelheid testsubstraat substantieel meer is dan 500 tot 600 g per testvat, moet het aantal wormen proportioneel worden verhoogd.

10. Een standaard-laboratoriumuitrusting is vereist, in het bijzonder:

— droogkast;

— stereomicroscoop;

— pH-meter en fotometer;

— geschikte nauwkeurige weegschalen;

— adequate apparatuur voor temperatuurregeling;

— adequate apparatuur voor vochtigheidsregeling (niet noodzakelijk als de blootstellingsvaten een deksel hebben);

— incubator of kleine kast met klimaatregelaar;

— pincet, haken of ogen;

— waterbad.

▼M6

Bereiding van de kunstmatige grond

11. In deze test wordt een kunstmatige grond gebruikt (5)(7) met de volgende samenstelling (gebaseerd op drooggewicht, gedroogd tot een constant gewicht bij 105 °C):

— 10 % veenmosturf (de pH moet zo dicht mogelijk bij 5,5 tot 6,0 liggen, zonder zichtbare plantenresten, fijngemalen, gedroogd tot gemeten vochtgehalte);

— 20 % kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

— 0,3 tot 1,0 % calciumcarbonaat ($CaCO_3$, verpulverd, analytisch zuiver) om een beginwaarde van de pH te verkrijgen van 6,0 ± 0,5.

— 70 % luchtdroog kwartszand (afhankelijk van de benodigde hoeveelheid $CaCO_3$), overwegend bestaande uit fijn zand; meer dan 50 % van de deeltjes moet een grootte tussen 50 en 200 micron hebben.

Noot 1: De benodigde hoeveelheid $CaCO_3$ zal afhangen van de bestanddelen van het grondsubstraat inclusief voeding en moet worden bepaald door metingen van gronddeelmonsters direct vóór de test. De pH wordt gemeten in een gemengd monster in een 1 M-oplossing van kaliumchloride (KCl) of een 0,01 M-oplossing van calciumchloride ($CaCl_2$) (13).

Noot 2: Het gehalte organische koolstof van de kunstmatige grond kan worden verlaagd, bv. door vermindering van het turfgehalte tot 4-5 % en dienovereenkomstige verhoging van het zandgehalte. Door een dergelijke verlaging van het gehalte organische koolstof kan de adsorptie van de teststof aan de grond (organische koolstof) afnemen en kan de beschikbaarheid van de teststof voor de wormen toenemen. Aangetoond is dat Eisenia fetida kan voldoen aan de geldigheidscriteria voor de voortplanting bij tests in veldgrond met een lager gehalte organische koolstof (bv. 2,7 %) (14), en de ervaring leert dat dit ook bereikt kan worden in kunstmatige grond met 5 % turf. Het is daarom niet nodig om vóór het gebruik van een dergelijke grond in een definitieve test aan te tonen dat de kunstmatige grond geschikt is om aan de geldigheidscriteria te voldoen, tenzij het turfgehalte tot onder het hierboven genoemde gehalte wordt verlaagd.

Noot 3: Wanneer in aanvullende tests (bv. van de latere fasen) natuurlijke grond wordt gebruikt, moet eveneens worden aangetoond dat de grond geschikt is en dat wordt voldaan aan de geldigheidscriteria.

12. De droge bestanddelen van de grond worden in een goed geventileerde ruimte grondig gemengd (bv. in een grote laboratoriummenger). Vóór aanvang van de test wordt de droge kunstmatige grond bevochtigd door genoeg gedeïoniseerd water toe te voegen om ongeveer de helft van het uiteindelijke watergehalte te verkrijgen, d.w.z. 40 % tot 60 % van het maximale waterhoudend vermogen (overeenkomend met 50 ± 10 % vochtgehalte van de droge massa). Dit levert een substraat op dat geen staand of vrij water heeft wanneer het in de hand wordt geknepen. Het maximale waterhoudend vermogen (WHV) van de kunstmatige grond wordt bepaald overeenkomstig de procedures als beschreven in aanhangsel 2, ISO 11274 (15) of een gelijkwaardige EU-norm.

13. Als de teststof zonder water op het grondoppervlak wordt aangebracht of met de grond wordt gemengd, kan de uiteindelijke hoeveelheid water in de kunstmatige grond worden gemengd tijdens de bereiding van de grond. Als de teststof met water door de grond wordt gemengd, kan de aanvullende hoeveelheid water tezamen met de teststof worden toegevoegd (zie punt 19).

14. Het vochtgehalte van de grond wordt aan het begin en aan het eind van de test bepaald overeenkomstig ISO 11465 (16) of een gelijkwaardige EU-norm, en de pH-waarde van de grond wordt bepaald overeenkomstig aanhangsel 3 of ISO 10390 (13) of een gelijkwaardige EU-norm. Deze bepalingen moeten

▼M6

worden uitgevoerd in een monster controlegrond en een monster van elke testconcentratiegrond. De pH-waarde van de grond mag niet worden aangepast wanneer zure of basische stoffen worden getest. Het vochtgehalte moet gedurende de gehele test worden bewaakt door de vaten periodiek te wegen (zie de punten 26 en 30).

Selectie en voorbereiding van de proefdieren

15. De testsoort is *Eisenia fetida* of *Eisenia andrei* (1)(2). Om de test te beginnen zijn volwassen wormen tussen twee maanden en één jaar oud met een clitellum nodig. De wormen moeten worden gekozen uit een gesynchroniseerde cultuur met een relatief homogene leeftijdsstructuur (aanhangsel 4). Individuele wormen in een testgroep mogen in leeftijd niet meer dan 4 weken van elkaar verschillen.

16. De geselecteerde wormen moeten gedurende ten minste één dag worden geacclimatiseerd met het type kunstmatig grondsubstraat dat in de test zal worden gebruikt. Tijdens deze periode moeten de wormen worden gevoed met hetzelfde voedsel dat in de test zal worden gebruikt (zie de punten 31 tot en met 33).

17. Aan het begin van de test moeten groepen van 10 wormen afzonderlijk worden gewogen en moeten de groepen aselect worden toegewezen aan de testvaten. De wormen worden vóór het wegen gewassen (met gedeïoniseerd water), en het overtollige water wordt verwijderd door de wormen kort op filterpapier te leggen. De natte massa van de afzonderlijke wormen moet tussen 250 en 600 mg zijn.

Bereiding van testconcentraties

18. Voor het aanbrengen van de teststof kunnen twee methoden worden gebruikt: menging van de teststof in de grond (zie hiervoor de punten 19-21) of aanbrenging op het grondoppervlak (zie hiervoor de punten 22-24.). De keuze van de juiste methode hangt af van het doel van de test. In het algemeen wordt aangeraden de teststof door de grond te mengen. Het kan echter nodig zijn aanbrengingsprocedures te gebruiken die overeenkomen met de normale landbouwpraktijk (bv. sproeien van vloeibare formulering of gebruik van speciale formuleringen van pesticiden zoals granulaten of zaadbehandelingen). Oplosmiddelen die als hulpstof worden gebruikt bij de behandeling van de grond met de teststof, moeten worden gekozen op basis van hun laag toxisch effect op regenwormen, en er moet een geschikte oplosmiddelcontrole in de testopzet worden opgenomen (zie punt 27).

Mengen van de teststof in de grond

In water oplosbare teststof

19. Vlak voor het begin van de test wordt een oplossing van de teststof in gedeïoniseerd water bereid in een hoeveelheid die voldoende is voor alle replicaten van één concentratie. Er kan een co-solvent nodig zijn om het bereiden van de testoplossing te vergemakkelijken. Het is handig om voldoende oplossing te bereiden om het uiteindelijke vochtgehalte (40 tot 60 % van het maximale waterhoudend vermogen) te bereiken. De oplossing wordt goed vermengd met het grondsubstraat voordat dit naar een testvat wordt overgebracht.

In water onoplosbare teststof

20. De teststof wordt opgelost in een kleine hoeveelheid geschikt organisch oplosmiddel (bv. aceton) en vervolgens op een kleine hoeveelheid fijn kwartszand gesproeid of erdoorheen gemengd. Het oplosmiddel wordt daarna verwijderd door het gedurende tenminste enkele minuten in een afzuigkast te verdampen. Vervolgens wordt het behandelde zand goed gemengd met de vooraf bevochtigde kunstmatige grond. Daarna wordt gedeïoniseerd water toegevoegd, in een hoeveelheid die nodig is om een uiteindelijke vochtigheidsgraad van 40 tot 60 % van het maximale waterhoudend vermogen te bereiken, en door de grond gemengd. De grond is daarna gereed om naar de testvaten te worden overgebracht. Er dient op te worden gelet dat sommige oplosmiddelen een toxisch effect kunnen hebben op regenwormen.

▼M6

In water en organische oplosmiddelen onoplosbare teststof

21. Er wordt een mengsel bereid bestaande uit 10 g fijngemalen industrieel kwartszand en een hoeveelheid van de teststof die nodig is om de testconcentratie in de bodem te bereiken. Vervolgens wordt het mengsel goed gemengd met de vooraf bevochtigde kunstmatige grond. Daarna wordt gedeïoniseerd water toegevoegd, in een hoeveelheid die nodig is om een uiteindelijke vochtigheidsgraad van 40 tot 60 % van het maximale waterhoudend vermogen te bereiken, en door de grond gemengd. De grond is daarna gereed om naar de testvaten te worden overgebracht.

Aanbrengen van de teststof op het grondoppervlak

22. De grond wordt behandeld nadat de wormen zijn toegevoegd. De testvaten worden eerst gevuld met het bevochtigde grondsubstraat, waarna de gewogen wormen op het oppervlak worden geplaatst. Gezonde wormen graven zich gewoonlijk onmiddellijk in het substraat in. Wormen die na 15 minuten nog op het oppervlak zijn achtergebleven, worden daarom als beschadigd beschouwd en moeten worden vervangen. Als wormen worden vervangen, moeten de nieuwe wormen en de vervangen wormen worden gewogen, zodat het totale levend gewicht van de blootstellingsgroep en het totale gewicht van het vat met wormen aan het begin bekend is.

23. De teststof wordt aangebracht. De teststof mag niet binnen een half uur na de plaatsing van de wormen aan de grond worden toegevoegd (en evenmin als er wormen op het grondoppervlak aanwezig zijn), om directe blootstelling aan de teststof door contact met de huid te vermijden. Wanneer de teststof een pesticide is, kan het aangewezen zijn de teststof door sproeien op het grondoppervlak aan te brengen. De teststof moet zo gelijkmatig mogelijk op het grondoppervlak worden aangebracht met behulp van een geschikte laboratoriumsproeier om aanbrenging door sproeien in het veld te simuleren. Vóór aanbrenging dient het deksel van het testvat te worden verwijderd en te worden vervangen door een binnenkuip die de zijwanden van het vat beschermt tegen de spray. De binnenkuip kan worden gemaakt van een testvat waaruit de bodem is verwijderd. De aanbrenging dient te geschieden bij een temperatuur van 20 ± 2 °C en voor waterige oplossingen, emulsies of dispersies bij een wateraanbrenging van 600 tot 800 $\mu l/m^2$. De verhouding moet worden gecontroleerd met een passende kalibratietechniek. Speciale formuleringen zoals granulaten of zaadbehandelingen moeten worden aangebracht op een wijze die overeenkomt met de landbouwpraktijk.

24. Testvaten moeten gedurende één uur onafgedekt blijven, zodat vluchtig oplosmiddel dat is gebruikt bij de aanbrenging van de teststof, kan verdampen. Er moet op worden gelet dat er in deze tijd geen wormen uit de testvaten ontsnappen.

PROCEDURE

Test-en controlegroepen

25. Aanbevolen wordt een aantal van 10 regenwormen in 500 tot 600 g droge massa van de kunstmatige grond (d.w.z. 50-60 g grond per worm). Als grotere hoeveelheden grond worden gebruikt, zoals het geval kan zijn als pesticiden worden getest met speciale aanbrengingswijzen zoals zaadbehandelingen, moet de hoeveelheid van 50-60 g grond per worm worden aangehouden door het aantal wormen te vergroten. Voor elk controle- en behandelingsvat worden tien wormen voorbereid. De wormen worden met water gewassen en drooggeveegd en vervolgens kort op absorberend papier geplaatst, zodat overtollig water kan wegstromen.

26. Om systematische fouten in de verdeling van de wormen over de testvaten te voorkomen, moet de homogeniteit van de testpopulatie worden vastgesteld door 20 aselect gekozen wormen uit de populatie waaruit de testwormen zullen worden gehaald, afzonderlijk te wegen. Nadat de homogeniteit is gewaarborgd, worden met een randomiseringsprocedure batches van

▼M6

wormen samengesteld, gewogen en aan de testvaten toegewezen. Na plaatsing van de testwormen moet het gewicht van elk testvat worden bepaald, zodat het begingewicht bekend is en als basis kan dienen voor het gedurende de test bewaken van het vochtgehalte van de grond als beschreven in punt 30. De testvaten worden vervolgens afgesloten als beschreven in punt 9 en in de testruimte geplaatst.

27. Voor elk van de aanbrengingsmethoden van de teststof worden passende controles voorbereid als beschreven in de punten 18 tot en met 24. Voor de voorbereiding van de controles worden de beschreven toepasselijke procedures gevolgd, zij het dat geen teststof wordt gevoegd. Voor zover van toepassing worden dus organische oplosmiddelen, kwartszand of andere media op de controles aangebracht in concentraties/hoeveelheden die overeenkomen met die in de behandelingen. Wanneer een oplosmiddel of ander medium wordt gebruikt om de teststof aan te brengen, moet ook een extra controle zonder het medium of de teststof worden voorbereid en getest om te waarborgen dat het medium het resultaat niet beïnvloedt.

Testomstandigheden

28. De testtemperatuur is 20 ± 2 °C. De test wordt uitgevoerd bij gecontroleerde licht-donkercycli (bij voorkeur 16 uur licht en 8 uur donker), met een verlichting van 400 tot 800 lux in het gebied van de testvaten.

29. De testvaten worden tijdens de test niet belucht, maar het ontwerp van de afsluiting van de testvaten moet uitwisseling van gassen wel mogelijk maken, maar de verdamping van vocht beperken (zie punt 9).

30. Het watergehalte van het grondsubstraat in de testvaten wordt gedurende de hele test gehandhaafd door de testvaten (zonder hun afsluiting) periodiek opnieuw te wegen. Het verloren vocht wordt, indien nodig, aangevuld met gedeïoniseerd water. Het watergehalte mag niet meer dan 10 % afwijken van het gehalte aan het begin van de test.

Voeding

31. Elk voedsel van een kwaliteit waarvan is aangetoond dat het geschikt is om het gewicht van de wormen tijdens de test ten minste in stand te houden, wordt aanvaardbaar geacht. De ervaring leert dat havervlokken, koeien- of paardenmest geschikte voedselbronnen zijn. Er moeten controles plaatsvinden om te waarborgen dat koeien of paarden waarvan mest wordt verkregen, geen medicijnen gebruiken en niet worden behandeld met een chemische stof, zoals groeibevorderaars, nematiciden of soortgelijke diergeneesmiddelen die tijdens de test een negatief effect op de wormen zouden kunnen hebben. Het wordt aangeraden om zelfverzamelde koeienmest te gebruiken, want de ervaring leert dat commercieel verkrijgbare koeienmest die als meststof in tuinen wordt gebruikt, negatieve effecten op de wormen kan hebben. De mest moet vóór gebruik aan de lucht worden gedroogd, fijngemalen en gepasteuriseerd.

32. Elke verse batch voedsel moet, voordat de batch in een test wordt gebruikt, worden verstrekt aan een wormcultuur die geen deel uitmaakt van de test, om te waarborgen dat de batch van toereikende kwaliteit is. De groei en coconproductie mag niet lager zijn dan die van wormen die worden gehouden in een substraat dat de nieuwe batch voedsel niet bevat (voorwaarden als beschreven in testmethode C.8(4)).

33. Voedsel wordt voor het eerst verstrekt één dag na de plaatsing van de wormen en de aanbrenging van de teststof op de grond. Ongeveer 5 g voeding wordt over het grondoppervlak van elk vat verspreid en bevochtigd met gedeïoniseerd water (ongeveer 5 ml tot 6 ml per vat). Daarna wordt gedurende de testperiode van 4 weken één keer per week voedsel verstrekt.

▼M6

Als het voedsel niet volledig wordt opgegeten, moet de portie worden verkleind om schimmelgroei te voorkomen. De volwassen wormen worden op dag 28 van de test uit de grond verwijderd. Vervolgens wordt aan elk testvat nog eens 5 g voedsel toegediend. In de resterende 4 weken van de test wordt geen voeding meer verstrekt.

Selectie van testconcentraties

34. Wanneer er vooraf iets bekend is over de toxiciteit van de teststof, bijvoorbeeld uit een acute test (4) en/of bereikbepalingstests, kan dit nuttig zijn bij het kiezen van geschikte testconcentraties. Indien nodig, wordt een bereikbepalingstest uitgevoerd met bijvoorbeeld vijf teststofconcentraties van 0,1, 1,0, 10, 100 en 1 000 mg/kg (drooggewicht grond). Eén replicaat voor elke behandeling en controle volstaat. De tijdsduur van de bereikbepalingstest is twee weken, en de mortaliteit wordt aan het eind van de test beoordeeld.

Proefopzet

35. Omdat voor de test niet één samenvattende statistiek kan worden voorgeschreven, voorziet deze testmethode in de bepaling van de NOEC en de EC_x. In de nabije toekomst zal door regelgevende autoriteiten waarschijnlijk een NOEC worden geëist. Op grond van statistische en ecologische overwegingen kan in de nabije toekomst ook de EC_x algemener worden gebruikt. Op basis van de aanbevelingen voortvloeiende uit een ringtest van een voortplantingstestmethode voor enchytreeën worden daarom drie opzetten voorgesteld (17).

36. Bij de vaststelling van het concentratiebereik moet aandacht worden geschonken aan het volgende:

— Voor de bepaling van de NOEC moeten ten minste vijf/twaalf concentraties worden getest die een meetkundige reeks vormen. Aanbevolen wordt vier replicaten voor elke testconcentratie plus acht controles te gebruiken. De concentraties moeten worden gekozen met intervallen die onderling verschillen met een factor van niet meer dan 2,0.

— Voor de bepaling van de ECx (bv. EC10, EC50) wordt aanbevolen voldoende concentraties te gebruiken om ten minste vier statistisch significant verschillende gemiddelde responsen op deze concentraties te veroorzaken. Aanbevolen wordt ten minste twee replicaten voor elke testconcentratie plus zes controles te gebruiken. De intervalsfactor kan variëren, d.w.z. kleiner dan of gelijk aan 1,8 in het verwachte effectbereik en groter dan 1,8 bij de hogere en lagere concentraties.

— Een gecombineerde aanpak maakt het mogelijk om zowel de NOEC als ECx te bepalen. Er moeten acht behandelingsconcentraties die een meetkundige reeks vormen, worden gebruikt. Aanbevolen wordt vier replicaten voor iedere behandeling plus acht controles te gebruiken. De concentraties moeten worden gekozen met intervallen die onderling verschillen met een factor van niet meer dan 1,8.

Testduur en metingen

37. Op dag 28 worden de levende volwassen wormen geobserveerd en geteld. Alle ongebruikelijke gedragingen (bv. onvermogen om in de grond te graven, bewegingsloos tegen de glazen wand van het testvat liggen) en ongebruikelijke morfologie (bv. de aanwezigheid van open wonden) worden ook geregistreerd. Alle volwassen wormen worden vervolgens uit de testvaten verwijderd en geteld en gewogen. Het zoeken naar volwassen wormen kan makkelijker worden gemaakt door de grond met daarin de wormen vóór de beoordeling over te brengen naar een schone schaal. De uit de grond geëxtraheerde wormen moeten vóór het wegen worden gewassen (met gedeïoniseerd water) en het overtollige water moet worden verwijderd door de wormen kort op filterpapier te leggen. Wormen die op dat moment niet worden aangetroffen, moeten als dood worden geregistreerd, omdat moet worden aangenomen dat deze wormen vóór de beoordeling zijn overleden en ontbonden.

▼M6

38. Als de grond uit de vaten is verwijderd, wordt deze weer terug in de vaten gebracht (zonder de volwassen wormen, maar met de eventuele cocons die zijn geproduceerd). De grond wordt vervolgens gedurende nog eens vier weken onder dezelfde testomstandigheden geïncubeerd, behalve dat enkel aan het begin van deze testfase voeding wordt verstrekt (zie punt 33).

39. Aan het eind van de tweede periode van vier weken wordt het aantal jonge wormen dat uit de cocons in de testgrond is gekomen, en het aantal cocons bepaald met de procedures als beschreven in aanhangsel 5. Gedurende de gehele testperiode moeten alle tekenen van letsel of beschadiging van de worm worden geregistreerd.

Limiettest

40. Als bij de hoogste concentratie in de bereikbepalingstest (d.w.z. 1 000 mg/kg) geen effecten worden waargenomen, wordt de voortplantingstest uitgevoerd als een limiettest met 1 000 mg/kg als testconcentratie. Een limiettest biedt de mogelijkheid om aan te tonen dat de NOEC voor de voortplanting groter is dan de hoogste concentratie, en om het aantal gebruikte wormen in de test tot een minimum te beperken. Zowel voor de behandelde grond als voor de controle moeten acht replicaten worden gebruikt.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

41. Hoewel aanhangsel 6 een overzicht bevat, wordt in deze testmethode geen definitieve statistische richtsnoer voor de analyse van de testresultaten gegeven.

42. Een van de eindpunten is de mortaliteit. Veranderingen in het gedrag (bv. onvermogen om in de grond te graven, bewegingsloos tegen de glazen wand van het testvat liggen) en de morfologie (bv. de aanwezigheid van open wonden) van de volwassen wormen moeten echter ook worden geregistreerd, evenals de aanwezigheid van eventuele nakomelingen. Normaal gesproken moet probit-analyse (18) of logistische regressie worden toegepast om de LC50 te bepalen. In gevallen waarin deze analysemethode niet geschikt is (bv. als er minder dan drie concentraties met gedeeltelijke sterfte beschikbaar zijn), kunnen echter andere methoden worden gebruikt. Tot deze methoden behoren onder andere voortschrijdende gemiddelden (19), de getrimde Spearman-Karber-methode (20) of eenvoudige interpolatie (bv. meetkundig gemiddelde van LC_0 en LC_{100}, berekend als de vierkantswortel van LC_0 vermenigvuldigd met LC_{100}).

43. Het andere eindpunt is de vruchtbaarheid (d.w.z. het aantal voortgebrachte nakomelingen). Net als in de bereikbepalingstest moeten echter ook hier alle andere schadelijke tekenen worden geregistreerd in het eindverslag. De statistische analyse vereist dat het rekenkundig gemiddelde $\bar{x}$ en de standaardafwijking per behandeling en per controle voor de voortplanting worden berekend.

44. Als een variantieanalyse is uitgevoerd, kunnen de standaardafwijking (s) en het aantal vrijheidsgraden (df) worden vervangen door respectievelijk de schatting van de gepoolde variantie verkregen uit de ANOVA en haar aantal vrijheidsgraden, mits de variantie niet afhankelijk is van de concentratie. Gebruik in dit geval de afzonderlijke varianties van de controle en de behandelingen. Deze waarden worden doorgaans berekend door commerciële statistische software met de resultaten per vat als replicaten. Als het poolen van de gegevens voor de negatieve en oplosmiddelcontroles redelijk lijkt, in plaats van het toetsen tegen een hiervan, moeten ze worden getoetst om te bepalen of ze significant afwijken (zie punt 47 en aanhangsel 6 voor de geschikte toets).

45. De verdere statistische toetsen en gevolgtrekkingen hangen af van de vraag of de replicaatwaarden normaal verdeeld zijn en homogeen zijn voor wat betreft hun variantie.

▼M6

Schatting van NOEC

46. De toepassing van krachtige toetsen heeft de voorkeur. Er dient gebruik te worden gemaakt van informatie uit bv. eerdere ervaring met ringtesten of andere historische gegevens over de vraag of gegevens ongeveer normaal verdeeld zijn. Homogeniteit van variantie (homoscedasticiteit) is crucialer. De ervaring leert dat de variantie vaak toeneemt bij een hoger gemiddelde. In deze gevallen zou een gegevenstransformatie kunnen leiden tot homoscedasticiteit. Een dergelijke transformatie moet echter worden gebaseerd op de ervaring met historische gegevens in plaats van op gegevens van het lopende onderzoek. Bij homogene gegevens moeten multipele t-toetsen zoals de Williams-toets (α = 0,05, eenzijdig) (21)(22) of in bepaalde gevallen de toets van Dunnett (23)(24) worden uitgevoerd. Er zij opgemerkt dat in het geval van ongelijke aantallen replicaten de tabel met t-waarden moet worden aangepast zoals voorgesteld door Dunnett en Williams. Soms nemen de responsen als gevolg van grote variatie niet regelmatig toe of af. In het geval van een sterke afwijking van monotoniciteit is de toets van Dunnett geschikter. Als er afwijkingen van homoscedasticiteit zijn, kan het redelijk zijn om mogelijke effecten op varianties nader te onderzoeken om te bepalen of de t-toetsen kunnen worden toegepast zonder al te zeer aan statistisch onderscheidingsvermogen in te boeten (25). Anders kan een multipele Mann-Whitney-toets, bv. de Bonferroni-toets volgens Holm (26), of wanneer deze gegevens heteroscedasticiteit vertonen maar anderszins consistent zijn met een onderliggende monotone dosis-respons, een andere verdelingsvrije toets (bv. Jonckheere-Terpstra (27) (28) of Shirley (29) (30)) worden toegepast, en deze zal doorgaans de voorkeur hebben boven t-toetsen voor ongelijke varianties. (Zie ook het schema in aanhangsel 6.)

47. Als een limiettest is uitgevoerd en er is voldaan aan de voorwaarden van parametrische toetsprocedures (normaliteit, homogeniteit), kan de gepaarde t-toets worden gebruikt, of anders de Mann-Whitney-toets (31).

Schatting van EC_x

48. Om een EC_x-waarde te berekenen worden de gemiddelden per behandeling gebruikt voor regressieanalyse (lineair of niet-lineair), nadat een passende dosis-responsfunctie is verkregen. Voor de groei van wormen als een continue respons kunnen EC_x-waarden worden geschat met behulp van geschikte regressieanalyse (32). Tot de geschikte functies voor binaire gegevens (mortaliteit/overleving) en aantal geproduceerde nakomelingen behoren de normale sigmoïde, logistische of Weibull-functies, met twee tot vier parameters, waarvan sommige ook hormetische responsen kunnen modelleren. Als een dosis-responsfunctie werd gefit door lineaire regressieanalyse, moet bij de regressieanalyse een significante r^2 (determinatiecoëfficiënt) en/of helling worden gevonden voordat de EC_x kan worden geschat door in de door de regressieanalyse gevonden vergelijking een waarde in te vullen die overeenkomt met x % van het controlegemiddelde. De 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen worden berekend overeenkomstig Fieller (geciteerd in Finney (18)) of andere passende moderne methoden.

49. De respons kan ook worden gemodelleerd als een percentage of proportie van de modelparameter die wordt geïnterpreteerd als de gemiddelde respons van de controle. In deze gevallen kan de normale (logistische, Weibull) sigmoïde curve vaak gemakkelijk aan de resultaten worden gefit met de probit-regressieprocedure (18). In deze gevallen moet de weegfunctie aan de metrische responsen worden aangepast zoals aangegeven door Christensen (33). Als echter hormese is waargenomen, moet probit-analyse worden vervangen door een logistische of Weibull-functie met vier parameters, die wordt gefit met een niet-lineaire regressieprocedure (34). Als geen geschikte dosis-responsfunctie aan de gegevens kan worden gefit, kunnen alternatieve methoden worden gebruikt om de EC_x en de betrouwbaarheidsgrenzen te schatten, zoals voortschrijdende gemiddelden volgens Thompson (19) en de getrimde Spearman-Karber-methode (20).

TESTVERSLAG

50. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

▼M6

Teststof:

— een ondubbelzinnige beschrijving van de teststof, batch, partij en CAS-nummer, zuiverheid;

— eigenschappen van de teststof (bv. log Kow, oplosbaarheid in water, dampspanning, Henry-constante (H) en informatie over het lot en gedrag).

Testorganismen:

— gebruikte testdieren: soort, wetenschappelijke naam, bron van de organismen en kweekomstandigheden;

— leeftijd, grootte- (massa-) bereik van de testorganismen.

Testomstandigheden:

— gegevens over de voorbereiding van de testgrond;

— het maximale waterhoudend vermogen van de grond;

— een beschrijving van de techniek die is gebruik voor het aanbrengen van de teststof op de grond;

— gedetailleerde gegevens over hulpstoffen gebruikt bij de toediening van de teststof;

— gegevens over de kalibratie van het sproeiapparaat, indien van toepassing;

— beschrijving van de testopzet en procedure;

— grootte van testvaten en volume van de testgrond;

— testomstandigheden: lichtintensiteit, duur van licht-donkercycli, temperatuur;

— een beschrijving van het voedingsschema, het type en de hoeveelheid voedsel dat in de test is gebruikt, voedingsdatums;

— de pH en het watergehalte van de grond aan het begin en het eind van de test;

Testresultaten:

— de mortaliteit van de volwassen wormen (%) in elk testvat aan het eind van de eerste 4 weken van de test;

— de totale massa van de volwassen wormen aan het begin van de test in elk testvat;

— veranderingen in lichaamsgewicht van de levende volwassen wormen (% van het begingewicht) in elk testvat na de eerste vier weken van de test;

— het aantal geproduceerde nakomelingen in elk testvat aan het eind van de test;

— een beschrijving van zichtbare of pathologische symptomen of opvallende veranderingen in het gedrag;

— de resultaten verkregen met de referentieteststof;

— de LC_{50}, de NOEC en/of EC_x (bv. EC_{50}, EC_{10}) voor de voortplanting als een of meer hiervan van toepassing zijn, met betrouwbaarheidsintervallen en een grafiek van het gefitte model dat is gebruikt voor de berekening ervan, en alle informatie en waarnemingen die van nut zijn voor de interpretatie van de resultaten;

— een grafiek van de dosis-responsrelatie;

— de resultaten die voor elk testvat gelden;

Afwijkingen van de procedures beschreven in deze testmethode en alle ongebruikelijke voorvallen tijdens de test.

LITERATUUR

(1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. & J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Verplicht 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. In: Riepert, F., 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, blz. 50-82.

(4) Hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Acute toxiciteitstest voor regenwormen.

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., & L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 blz.

(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. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards & F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. & J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

(13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. & Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 blz.

▼M6

(18) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), blz. 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 & R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correctie 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. & F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and 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. & J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Aanhangsel 1

Definities

Voor de toepassing van deze testmethode worden de volgende definities gehanteerd:

Stof betekent een substantie of mengsel.

EC_x (Effect concentration for x % effect) is de concentratie die binnen een bepaalde blootstellingstijd x % van een effect op testorganismen veroorzaakt ten opzichte van een controle. De EC_{50} is bijvoorbeeld de geschatte concentratie die gedurende een bepaalde blootstellingsperiode bij 50 % van een blootgestelde populatie een effect op een testeindpunt zal hebben. In deze test worden de effectconcentraties uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond of als een massa van de teststof per oppervlakte-eenheid van de grond.

LC_0 (No lethal concentration) is de concentratie van een teststof die binnen een bepaalde blootstellingstijd geen van de blootgestelde testorganismen doodt. In deze test wordt de LC_0 uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond.

LC_{50} (Median lethal concentration) is de concentratie van een teststof die binnen een bepaalde blootstellingstijd 50 % van de blootgestelde testorganismen doodt. In deze test wordt de LC_{50} uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond of als een massa van de teststof per oppervlakte-eenheid van de grond.

LC_{100} (Totally lethal concentration) is de concentratie van een teststof die binnen een bepaalde blootstellingstijd 100 % van de blootgestelde testorganismen doodt. In deze test wordt de LC_{100} uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) is de laagste concentratie van een teststof die tot een statistisch significant effect ($p < 0,05$) leidt. In deze test wordt de LOEC uitgedrukt als een massa van de teststof per droge massa van de testgrond of als een massa van de teststof per oppervlakte-eenheid van de grond. Alle geteste concentraties boven de LOEC moeten gewoonlijk een effect laten zien dat statistisch afwijkt van de controle. Alle afwijkingen van het bovenstaande moeten in het testverslag worden verantwoord.

NOEC (No Observed Effect Concentration) is de hoogste concentratie van de teststof direct onder de LOEC waarbij geen effect wordt waargenomen. In deze test heeft de concentratie die overeenkomt met de NOEC geen statistisch significant effect ($p < 0,05$) binnen een bepaalde blootstellingsperiode in vergelijking met de controle.

Voortplantingssnelheid Is het gemiddelde aantal jonge wormen op een bepaald aantal volwassen wormen dat gedurende de testperiode wordt geproduceerd.

Teststof betekent alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M6

Aanhangsel 2

Bepaling van het maximale waterhoudend vermogen van de grond

De volgende methode voor de bepaling van het maximale waterhoudend vermogen van de grond is geschikt bevonden. Zij is beschreven in bijlage C van ISO DIS 11268-2 (1).

Verzamel met een geschikt bemonsteringsapparaat (grondboorbuis enz.) een vastgestelde hoeveelheid van het testgrondsubstraat (bv. 5 g). Bedek de onderkant van de buis met een stuk filterpapier, vul een waterbad en plaats de buis op een rek in het bad. De buis zou geleidelijk onder water moeten komen te staan, tot het water de bovenkant van de grond bereikt. Laat de buis gedurende ongeveer drie uur in het water. Niet alle water dat door de bodemcapillairen wordt geabsorbeerd, kan worden vastgehouden. Laat het grondmonster daarom gedurende twee uur uitlekken door de buis op een bed van zeer nat fijngemalen kwartszand in een afgesloten vat te plaatsen (om droging te voorkomen). Het monster moet vervolgens worden gewogen, gedroogd tot een constante massa bij 105 °C. Het waterhoudend vermogen (WHV) kan vervolgens als volgt worden berekend:

$$\text{WHV (in \% van droge massa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

waarbij:

S = met water verzadigd substraat + massa van buis + massa van filterpapier

T = leeggewicht (massa van buis + massa van filterpapier)

D = droge massa van substraat

LITERATUUR:

(1) ISO International Organization for Standardization (Internationale Organisatie voor Normalisatie) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼M6

Aanhangsel 3

Bepaling van de pH van de grond

De volgende methode voor het bepalen van de pH van een grondmonster is gebaseerd op de beschrijving in ISO DIS 10390: Bodemkwaliteit — Bepaling van de pH-waarde (1).

Een vastgestelde hoeveelheid grond wordt gedurende ten minste 12 uur bij kamertemperatuur gedroogd. Vervolgens wordt een suspensie van de grond (die ten minste 5 g grond bevat) gemaakt in vijf keer zijn volume van hetzij een 1 M-oplossing van analytisch zuiver kaliumchloride (KCl) of een 0,01 M-oplossing van analytisch zuiver calciumchloride ($CaCl_2$). De suspensie wordt daarna vijf minuten goed geschud. Na het schudden krijgt de suspensie ten minste 2 uur, maar niet langer dan 24 uur, gelegenheid om te bezinken. Daarna wordt de pH van de vloeibare fase gemeten met een pH-meter die vóór elke meting is geijkt met een passende reeks bufferoplossingen (bv. pH 4,0 en 7,0).

LITERATUUR:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Aanhangsel 4

Kweken van Eisenia fetida/Eisenia andrei

De kweek dient bij voorkeur plaats te vinden in een klimaatkamer bij 20 °C ± 2 °C. Bij deze temperatuur en bij voldoende voedselverstrekking zijn de wormen na ongeveer 2 tot 3 maanden volwassen.

Beide soorten kunnen worden gekweekt in een grote diversiteit aan dierlijke afvalstoffen. Het aanbevolen kweekmedium is een 50:50-mengsel van paarden- of koeienmest en turf. Er moeten controles plaatsvinden om te waarborgen dat koeien of paarden waarvan mest wordt verkregen, geen medicijnen gebruiken en niet worden behandeld met een chemische stof, zoals groeibevorderaars, nematiciden of soortgelijke diergeneesmiddelen die tijdens de test een negatief effect op de wormen zouden kunnen hebben. Het wordt aangeraden om zelfverzamelde mest van „biologische" oorsprong te gebruiken, want de ervaring leert dat commercieel verkrijgbare mest die als meststof in tuinen wordt gebruikt, negatieve effecten op de wormen kan hebben. Het medium moet een pH-waarde van ongeveer 6 tot 7 hebben (gereguleerd met calciumcarbonaat), moet een lage ionische geleidbaarheid hebben (minder dan 6 mS/cm of 0,5 % zoutconcentratie) en mag niet overmatig verontreinigd zijn met ammoniak of dierlijke urine. Het substraat dient vochtig maar niet te nat te zijn. Kweekbakken met een inhoud van 10 tot 50 liter zijn geschikt.

Om wormen met een standaardleeftijd en -grootte (-massa) te verkrijgen, kan de cultuur het beste worden begonnen met cocons. Wanneer de cultuur eenmaal is opgezet, wordt deze in stand gehouden door volwassen wormen gedurende 14 tot 28 dagen in een kweekbak met vers substraat te plaatsen om ze de gelegenheid te geven meer cocons te produceren. De volwassen wormen worden daarna verwijderd, en de jonge wormen die uit de cocons zijn gekomen, worden als basis voor de volgende cultuur gebruikt. De wormen worden voortdurend gevoed met dierlijke afvalstoffen en van tijd tot tijd overgeplaatst op vers substraat. De ervaring leert dat aan de lucht gedroogde, fijngemalen koeien- of paardenmest of havervlokken geschikte voedselbronnen zijn. Er moet worden gecontroleerd dat koeien of paarden waarvan mest wordt verkregen, geen medicijnen gebruiken en niet worden behandeld met een chemische stof, zoals groeibevorderaars, die tijdens een langlopende kweek een negatief effect op de wormen zouden kunnen hebben. De uit de cocons gekomen wormen worden voor de tests gebruikt wanneer ze 2 tot 12 maanden oud zijn en als volwassen worden beschouwd.

Wormen kunnen als gezond worden beschouwd als ze zich door het substraat voortbewegen, niet proberen om het substraat te verlaten en zich voortdurend voortplanten. Het substraat is uitgeput wanneer de wormen zich zeer traag voortbewegen en een geel achtereind hebben. In dat geval wordt aanbevolen vers substraat te verstrekken en/of het aantal dieren per bak te verlagen.

▼M6

Aanhangsel 5

Technieken voor het tellen van uit cocons gekomen jonge wormen

Het is heel tijdrovend om wormen uit het grondsubstraat met de hand te sorteren. Daarom worden twee alternatieve methoden aanbevolen.

(a) De testvaten worden in een waterbad geplaatst met een temperatuur van aanvankelijk 40 °C, maar oplopend tot 60 °C. Na ongeveer 20 minuten moeten de jonge wormen op het grondoppervlak verschijnen, waar ze gemakkelijk van kunnen worden verwijderd en geteld.

(b) De testgrond kan door een zeef worden gewassen met de methode die is ontwikkeld door Van Gestel et al. (1), mits de aan de grond toegevoegde turf en mest of havervlokken tot een fijn poeder zijn vermalen. Twee zeven (diameter 30 cm) met een maaswijdte van 0,5 mm worden op elkaar geplaatst. De inhoud van een testvat wordt onder een krachtige straal kraanwater door de zeven gewassen, zodat de jonge wormen en cocons hoofdzakelijk in de bovenste zeef achterblijven. Het is belangrijk op te merken dat tijdens deze handeling het gehele oppervlak van de bovenste zeef nat moet worden gehouden, zodat de jonge wormen op een film van water drijven en niet door de openingen van de zeef kunnen kruipen. Het beste resultaat wordt verkregen wanneer een douchekop wordt gebruikt.

Wanneer het grondsubstraat geheel door de zeef is weggewassen, kunnen de jonge wormen en cocons uit de bovenste zeef in een kom worden gespoeld. De inhoud van de kom krijgt daarna gelegenheid te rusten, zodat de lege cocons op het wateroppervlak komen drijven en de volle cocons en jonge wormen naar de bodem zinken. Het staande water kan vervolgens worden afgegoten en de jonge wormen en cocons kunnen worden overgebracht in een petrischaal met daarin een klein beetje water. De wormen kunnen met een naald of een pincet worden verwijderd om ze te tellen.

De ervaring leert dat methode (a) geschikter is voor de extractie van jonge wormen die mogelijk zelfs door een zeef met een maaswijdte van 0,5 mm worden weggewassen.

De efficiëntie van de gebruikte methode om de wormen (en cocons, in voorkomend geval) uit het grondsubstraat te verwijderen moet altijd worden bepaald. Als jonge wormen worden verzameld door ze handmatig te sorteren, is het raadzaam om de handeling op alle monsters twee keer uit te voeren.

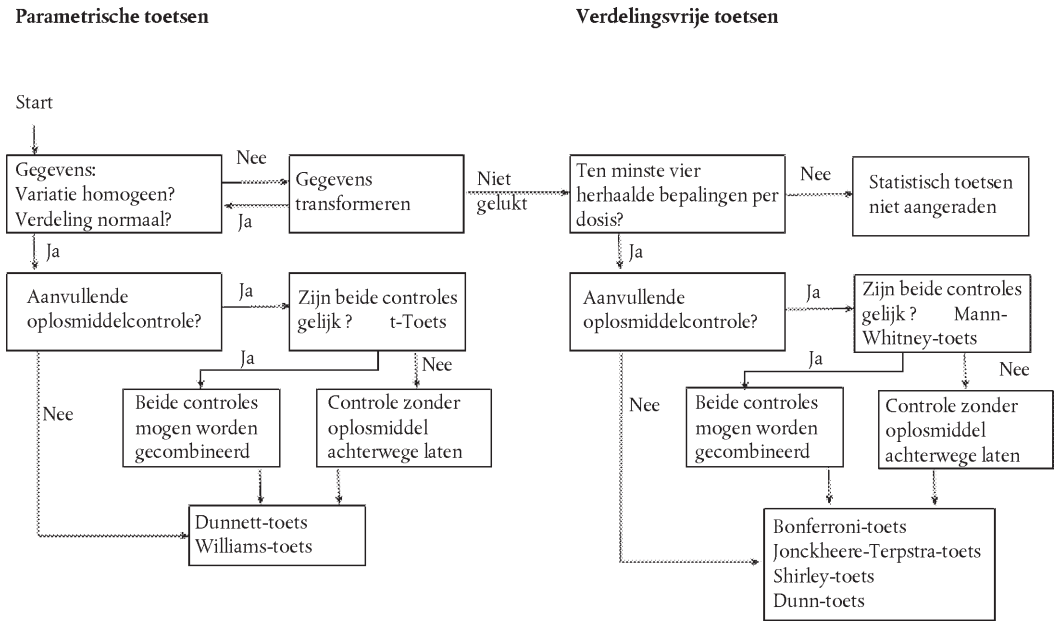
LITERATUUR:

(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**

Aanhangsel 6

Overzicht van de statistische beoordeling van gegevens (NOEC-bepaling)



▼M6

C.34. BEPALING VAN DE REMMING VAN DE ACTIVITEIT VAN ANAEROBE BACTERIËN — VERLAGING VAN DE GASPRODUCTIE UIT ANAEROOB GISTEND (RIOOL)SLIB

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan TG 224 (2007) van de OESO. Stoffen die in het aquatisch milieu worden geloosd, passeren zowel aerobe als anaerobe zones, waar ze kunnen worden afgebroken en/of de bacteriële activiteit kunnen remmen; in sommige gevallen kunnen ze ongestoord decennia lang, of nog langer, in anaerobe zones aanwezig blijven. De eerste fase in afvalwaterbehandeling, primaire bezinking, is aeroob in de bovenstaande vloeistof en anaeroob in het onderstaande slib. Dit wordt in de tweede fase gevolgd door een aerobe zone in de beluchtingstank met actief slib en een anaerobe zone in het onderstaande slib in de secundaire bezinkingsvijver. Slib uit deze beide fasen wordt gewoonlijk onderworpen aan een anaerobe behandeling, waarbij methaan en koolstofdioxide worden geproduceerd, die doorgaans worden gebruikt voor de opwekking van elektriciteit. In de grotere omgeving zullen stoffen die sedimenten in baaien, estuaria en de zee bereiken, waarschijnlijk voor onbepaalde tijd in deze anaerobe zones aanwezig blijven als ze niet biologisch afbreekbaar zijn. Grotere hoeveelheden van sommige stoffen zullen bij voorkeur in deze zones terechtkomen, vanwege hun fysische eigenschappen, zoals geringe oplosbaarheid in water, hoge adsorptie aan gesuspendeerde vaste stoffen, alsook onvermogen om op aerobe wijze biologisch te worden afgebroken.

2. Hoewel het wenselijk is dat stoffen die in het milieu worden geloosd, biologisch afbreekbaar zijn onder zowel aerobe als anaerobe omstandigheden, is het essentieel dat deze stoffen de activiteit van micro-organismen in deze zones niet remmen. In het Verenigd Koninkrijk hebben zich enkele gevallen voorgedaan van volledige remming van de methaanproductie door bijvoorbeeld de aanwezigheid van pentachloorfenol in industriële lozingen, waardoor hoge kosten moesten worden gemaakt om geremd slib van de gistingstanks naar 'veilige' locaties te vervoeren en gezond gistend slib van nabije installaties aan te voeren. Er zijn echter ook veel gevallen geweest van minder ernstige verstoring van de gisting door diverse andere stoffen, waaronder alifatische halokoolwaterstoffen (stomerijen) en detergenten, waardoor de efficiëntie van gistingstanks aanzienlijk werd geschaad.

3. Slechts één testmethode, C.11 (1), betreffende de remming van de bacteriële activiteit (ademhaling van actief slib), beoordeelt het effect van teststoffen op het zuurstofverbruik bij aanwezigheid van substraat. Deze methode wordt op grote schaal gebruikt om een vroege waarschuwing voor mogelijk schadelijke effecten van stoffen op de aerobe behandeling van afvalwater af te geven en om niet-remmende concentraties van teststoffen aan te wijzen die in de verschillende tests voor de biologische afbreekbaarheid moeten worden gebruikt. Testmethode C.43 (2) maakt het beperkt mogelijk de toxiciteit van een teststof op de gasproductie door anaeroob slib dat tot een tiende van de normale concentratie vaste stoffen is verdund, te bepalen om het percentage biologische afbraak met de vereiste nauwkeurigheid te kunnen beoordelen. Omdat verdund slib gevoeliger kan zijn voor remmende stoffen, heeft de ISO-groep besloten een methode vast te stellen waarin onverdund slib wordt gebruikt. Er zijn ten minste drie teksten bestudeerd (uit Denemarken, Duitsland en het Verenigd Koninkrijk) en uiteindelijk zijn twee ISO-normen opgesteld, een waarin onverdund slib wordt gebruikt, ISO 13 641-1 (3), en een andere waarin tot een honderdste verdund slib wordt gebruikt, ISO 13 641-2 (4), om modders en sedimenten met weinig bacteriepopulaties te representeren. Beide methoden zijn onderworpen aan een ringtest (5); van deel 1 werd bevestigd dat het een aanvaardbare standaard is, maar er was verschil van mening over deel 2. Het Verenigd Koninkrijk was van mening dat de methode nader moet worden onderzocht, omdat een belangrijk deel van de deelnemers heel weinig of geen gasproductie meldde, ten dele doordat het percentage gasruimte (75 %) te hoog was voor een optimale gevoeligheid.

4. In eerder werk in het Verenigd Koninkrijk (6)(7) werd een manometrische methode beschreven die gebruikmaakte van onverdund gistend slib, plus niet-behandeld rioolslib als substraat, in kolven van 500 ml; de opstelling was lastig om mee te werken en de stank van het niet-behandelde slib was

▼M6

uiterst onaangenaam. Nadien is de compactere en handigere opstelling van Shelton en Tiedje (8) als ontwikkeld door Battersby en Wilson (9) met succes toegepast door Wilson et al. (10). Kawahara et al. (11) hebben in het laboratorium met succes meer standaardslibben bereid om te gebruiken in tests voor de anaerobe biologische afbreekbaarheid en remming van een aantal stoffen. Ook werd niet-behandeld slib als substraat vervangen om een test uit te voeren hetzij door tot een honderdste verdund anaeroob slib of door modders, sedimenten enz. met geringe bacteriële activiteit.

5. Deze methode kan informatie verschaffen die nuttig is om het waarschijnlijke effect van een teststof op de gasproductie in anaerobe gistingstanks te voorspellen. Alleen langere tests waarin werkende gistingstanks nauwkeuriger worden gesimuleerd, kunnen echter aangeven of de micro-organismen zich aan de teststof kunnen aanpassen of dat stoffen die waarschijnlijk worden geabsorbeerd en geadsorbeerd aan slib, zich in de loop van een langere periode dan de duur van de test kunnen ophopen tot een concentratie die een toxisch effect heeft.

PRINCIPE VAN DE TEST

6. Porties van een mengsel van anaeroob gistend slib (20 g/l tot 40 g/l totaal aan vaste stoffen) en een afbreekbare substraatoplossing worden, apart en gelijktijdig met een reeks van concentraties van de teststof, gedurende maximaal 3 dagen geïncubeerd in afgesloten vaten. De hoeveelheid geproduceerd gas (methaan plus koolstofdioxide) wordt gemeten door de toename van de druk (Pa) in de flessen. Het remmingspercentage van de gasproductie door de verschillende concentraties van de teststof wordt berekend op basis van de geproduceerde hoeveelheden in de respectievelijke test- en controleflessen. De EC_{50} en andere effectieve concentraties worden berekend uit grafieken van het remmingspercentage als functie van de concentratie van de teststof of, gebruikelijker, de logaritme ervan.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

7. Teststoffen moeten doorgaans worden gebruikt in de zuiverste vorm die gemakkelijk verkrijgbaar is, omdat onzuiverheden in sommige stoffen, bv. chloorfenolen, veel toxischer kunnen zijn dan de teststof zelf. Er moet echter rekening worden gehouden met de noodzaak om teststoffen te testen in de vorm waarin zij worden geproduceerd/commercieel verkrijgbaar zijn. Het gebruik van geformuleerde producten wordt in de regel niet aanbevolen, maar bij slecht oplosbare teststoffen kan het gebruik van geformuleerd materiaal aangewezen zijn. Eigenschappen van de teststof die beschikbaar moeten zijn, zijn de oplosbaarheid in water en enkele organische oplosmiddelen, de dampspanning, adsorptiecoëfficiënt, hydrolyse en biologische afbreekbaarheid onder anaerobe omstandigheden.

TOEPASBAARHEID VAN DE METHODE

8. De test kan worden gebruikt zowel voor stoffen die oplosbaar zijn in water als voor stoffen die onoplosbaar zijn in water, met inbegrip van vluchtige stoffen. Bijzondere zorgvuldigheid is vereist bij materialen met een lage oplosbaarheid in water (zie ref. (12)) of een hoge vluchtigheid. Entmateriaal van andere anaerobe locaties, bv. modders, verzadigde bodems, sedimenten, mag eveneens worden gebruikt. Anaerobe bacteriële systemen die eerder zijn blootgesteld aan toxische stoffen, kunnen zijn geconditioneerd om hun activiteit in aanwezigheid van xenobiotische stoffen te behouden. Entmateriaal van geconditioneerde bacteriële systemen kunnen een hogere tolerantie voor de teststoffen vertonen dan entmateriaal verkregen van niet-geconditioneerde systemen.

REFERENTIESTOFFEN

9. Om de procedure te controleren, wordt een referentiestof getest door passende vaten op te zetten en op te nemen in de normale testreeksen; 3,5-dichloorfenol heeft bewezen een consistente remmer van anaerobe gasproductie te zijn, alsook van het zuurstofverbruik door actief slib en andere biochemische reacties. Van twee andere stoffen is aangetoond dat ze de methaanproductie meer remmen dan 3,5-dichloorfenol, namelijk, methyleen-bis-thiocyanaat en pentachloorfenol, maar de resultaten met deze stoffen zijn niet gevalideerd. Pentachloorfenol wordt niet aanbevolen, omdat het niet gemakkelijk in zuivere vorm verkrijgbaar is.

▼M6

REPRODUCEERBAARHEID VAN DE RESULTATEN

10. In een internationale ringtest (5) was slechts sprake van een redelijke reproduceerbaarheid in de EC_{50}-waarden tussen de 10 deelnemende laboratoria voor 3,5-dichloorfenol en 2-broomethaansulfonzuur. (Het bereik voor eerstgenoemde stof was 32 mg/l tot 502 mg/l en dat voor laatstgenoemde stof 220-2 190 mg/l.)

Aantal laboratoria	In mg/l			In mg/g slib		
	gemiddelde	s.d.	cv (%)	gemiddelde	s.d.	cv (%)
	3,5-Dichloorfenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-Broomethaansulfonzuur					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50}-gegevens van ringtest — onverdund slib

11. De hoge variatiecoëfficiënten (cv) tussen de laboratoria weerspiegelen grotendeels verschillen in de gevoeligheid van de micro-organismen in het slib als gevolg van wel of geen eerdere blootstelling aan de teststof of daaraan chemisch verwante andere stoffen. De nauwkeurigheid waarmee de EC_{50}-waarde op basis van de slibconcentratie werd bepaald, was nauwelijks beter dan de 'volumetrische' waarde (mg/l). De drie laboratoria die de nauwkeurigheid van hun EC_{50}-waarden voor 3,5-dichloorfenol rapporteerden, vertoonden veel lagere variatiecoëfficiënten (respectievelijk 22, 9 en 18 % voor EC_{50} mg/g) dan de gemiddelden van alle tien laboratoria. De afzonderlijke gemiddelden voor de drie laboratoria waren respectievelijk 3,1, 3,2 en 2,8 mg/g. De lagere, aanvaardbare variatiecoëfficiënten binnen de laboratoria in vergelijking met de veel hogere variatiecoëfficiënten tussen de laboratoriumwaarden, namelijk 9-22 % in vergelijking met 92 %, wijzen op significante verschillen in de eigenschappen van de afzonderlijke slibben.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

12. Vereist zijn een standaard-laboratoriumuitrusting en het volgende:

a) Incubator — vonkvrij en gereguleerd bij 35 °C ± 2 °C;

b) Drukbestendige glazen testvaten van een geschikte nominale grootte ([1]), elk voorzien van een gasdicht gecoat septum, bestand tegen ongeveer 2 bar of 2×10^5 Pa (gebruik voor de coating bv. PTFE = polytetrafluoretheen). Glazen serumflessen met een nominale inhoud van 125 ml, met een werkelijke inhoud van circa 160 ml, verzegeld met serumsepta ([2]) en aluminium krimpringen worden aanbevolen, maar ook flessen met een totale inhoud tussen 0,1 en 1 liter kunnen met succes worden gebruikt;

([1]) De aanbevolen grootte is 0,1 tot 1 liter.

([2]) Het gebruik van gasdichte siliconen septa wordt aanbevolen. Voorts wordt aanbevolen dat de gasdichtheid van doppen, vooral septa van butylrubber, wordt getest, want verschillende commercieel verkrijgbare septa zijn onvoldoende gasdicht voor methaan en sommige septa blijven niet gasdicht wanneer ze onder de testomstandigheden met een naald worden doorstoken.

— Gasdichte, gecoate septa worden aanbevolen en moeten worden gebruikt voor vluchtige stoffen (sommige commerciële septa zijn betrekkelijk dun, minder dan 0,5 cm dik, en blijven niet gasdicht wanneer ze met een injectienaald worden doorstoken);

— Septa van butylrubber (circa 1 cm dik) worden aanbevolen als de teststoffen niet vluchtig zijn (deze septa blijven doorgaans ook na doorsteking gasdicht);

— Het wordt aanbevolen de septa vóór de test zorgvuldig te onderzoeken op hun vermogen om na doorsteking gasdicht te blijven.

▼M6

c) Precisiedrukmeter [1] met naald

Totale gasproductie (methaan plus koolstofdioxide) gemeten door middel van een drukmeter die is aangepast om het meten en laten wegstromen van geproduceerd gas mogelijk te maken. Een voorbeeld van een geschikt instrument is een handheld precisiedrukmeter verbonden met een injectienaald; een gasdicht driewegventiel vergemakkelijkt het laten ontsnappen van overdruk (aanhangsel 1). De interne inhoud van de druktransductorslang en het ventiel moet zo laag mogelijk worden gehouden, zodat fouten die worden ingevoerd door het volume van de apparatuur, onbetekenend zijn;

d) Geïsoleerde containers voor het transport van gistend slib;

e) Driewegdrukventielen;

f) Zeef met een maasgrootte van 1 mm2;

g) Reservoir voor gistend slib, een fles van glas of polyethyleen met een hoge dichtheid en met een inhoud van ongeveer 5 liter, voorzien van een roerder en voorzieningen voor het doorvoeren van een stroom stikstofgas door de gasruimte (zie punt 13);

h) membraanfilters (0,2 μm) voor het steriliseren van het substraat;

i) micro-injectiespuiten, voor de gasdichte verbinding van de druktransductor (zie punt 12(c)) met de gasruimte in de flessen (zie punt 12(b)); ook voor het toevoegen van onoplosbare vloeibare teststoffen aan de flessen;

j) handschoenkast, facultatief, maar aanbevolen, met een licht positieve stikstofdruk.

Reagentia

13. Er wordt steeds gebruikgemaakt van reagentia pro analysi. Er dient steeds stikstofgas van een hoge zuiverheid met een gehalte van minder dan 5μl/l zuurstof te worden gebruikt.

Water

14. Gebruik gedeïoniseerd water dat vooraf ontlucht is, als op enig moment verdunning noodzakelijk is. Analytische controles van dit water zijn niet nodig, maar zie erop toe dat het deïoniseringsapparaat regelmatig wordt onderhouden. Gebruik ook gedeïoniseerd water voor het bereiden van stamoplossingen. Zorg ervoor dat een oplossing of verdunning van teststof zuurstofvrij is, voordat er anaeroob entmateriaal aan wordt toegevoegd. Dit gebeurt door gedurende 1 uur voorafgaand aan de toevoeging van het entmateriaal stikstofgas door het verdunningswater (of door de verdunningen) te blazen, of door het verdunningswater tot het kookpunt te verwarmen en in een zuurstofvrije omgeving tot kamertemperatuur te laten afkoelen.

Uitgegist slib

15. Verzamel actief gistend slib uit een gistingstank bij een waterzuiveringsinstallatie of uit een installatie op laboratoriumschaal, die slib van hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater behandelt. Praktische informatie over slib van een gistingstank op laboratoriumschaal is elders te vinden (11). Als het de bedoeling is om aangepast entmateriaal te gebruiken, kan gistend slib van een industriële waterzuiveringsinstallatie worden overwogen. Gebruik voor het verzamelen van slib flessen met een brede nek, gemaakt van polyethyleen met een hoge dichtheid of een vergelijkbaar materiaal, dat kan uitzetten. Vul de monsterflessen met slib tot ongeveer 1 cm onder de bovenrand

[1] De meter moet worden gebruikt en regelmatig worden gekalibreerd, overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant. Als een drukmeter van de voorgeschreven kwaliteit worden gebruikt, bv. met een stalen membraan omhuld, hoeft in het laboratorium geen kalibratie plaats te vinden. De meter moet worden gekalibreerd door een erkend instituut en met de aanbevolen tussenpozen. De nauwkeurigheid van de kalibratie kan in het laboratorium worden gecontroleerd met een eenpuntsmeting bij 1×10^5 Pa op een drukmeter met een mechanisch display. Wanneer dit punt correct wordt gemeten, zal ook de lineariteit niet gewijzigd zijn. Als andere meetapparaten worden gebruikt (zonder gecertificeerde kalibratie door de fabrikant), wordt conversie over het gehele bereik met regelmatige intervallen aanbevolen (aanhangsel 2).

▼M6

van de flessen, sluit de flessen goed af, bij voorkeur met een veiligheidsafsluiter (punt 12(e)), en plaats ze in geïsoleerde containers (punt 12(d)) om de temperatuurschok zo klein mogelijk te maken, tot ze in een incubator met een temperatuur van 35 °C ± 2 °C worden geplaatst. Zorg ervoor dat bij het openen van de flessen de overtollige gasdruk wordt weggenomen, hetzij door de afsluiter voorzichtig los te maken of door middel van het driewegdrukventiel (punt 12(e)). Het heeft de voorkeur het slib binnen enkele uren na het verzamelen te gebruiken. Bewaar het slib anders maximaal 3 dagen, waarin gewoonlijk weinig verlies van activiteit optreedt, bij 35 °C ± 2 °C onder een gasruimte van stikstof.

Waarschuwing — Gistend slib produceert ontvlambare gassen die brand- en ontploffingsgevaar opleveren, en het bevat ook potentieel pathogene organismen. Neem dus passende voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van slib. Gebruik om veiligheidsredenen géén glazen vaten voor het verzamelen van slib.

Entmateriaal

16. Meng het slib onmiddellijk vóór het gebruik door het voorzichtig te roeren, en giet het daarna door een zeef met een maasgrootte van 1 mm^2 (punt 12(f)) in een geschikte fles (punt 12(g)) door de gasruimte waarvan een stroom stikstof wordt geleid. Houd een monster apart om de concentratie totale droge vaste stoffen te meten (zie bv. ISO 11 923 (13) of gelijkwaardige EU-norm). Gebruik het slib in het algemeen zonder het te verdunnen. De concentratie vaste stoffen ligt gewoonlijk tussen 2 % en 4 % (massaconcentratie). Controleer de pH-waarde van het slib en pas deze, indien nodig, aan tot 7 ± 0,5.

Testsubstraat

17. Los 10 g kweekbouillon (bv. Oxoid), 10 g gistextract en 10 g D-glucose op in gedeïoniseerd water en verdun tot 100 ml. Steriliseer door filtratie door een 0,2 μm membraanfilter (punt 12(h)) en gebruik onmiddellijk of bewaar niet langer dan 1 dag bij 4 °C.

Teststof

18. Bereid een aparte stamoplossing voor elke in water oplosbare teststof met bijvoorbeeld 10 g/l van de stof in zuurstofvrij verdunningswater (punt 14). Gebruik passende hoeveelheden van deze stamoplossingen om de reactiemengsels met daarin verschillende concentraties te bereiden. Als alternatief kan een oplossingenreeks van elke stamoplossing worden gemaakt zodat het aan de testflessen toegevoegde volume voor elke vereiste uiteindelijke concentratie hetzelfde is. De pH-waarde van de stamoplossingen moet, indien nodig, worden aangepast tot 7 ± 0,2.

19. Raadpleeg ISO 10 634 (12) of een gelijkwaardige EU-norm voor teststoffen die onvoldoende in water oplosbaar zijn. Vermijd, als een organisch oplosmiddel moet worden gebruikt, oplosmiddelen zoals chloroform en koolstoftetrachloride, waarvan bekend is dat ze de methaanproductie sterk remmen. Bereid een oplossing van een passende concentratie van de niet in water oplosbare stof in een geschikt vluchtig oplosmiddel, bijvoorbeeld aceton of diethylether. Voeg de vereiste hoeveelheden oplosmiddeloplossing toe aan de lege testflessen (punt 12(b)) en laat het oplosmiddel verdampen voordat slib wordt toegevoegd. Gebruik voor andere behandelingen ISO 10 634 (12) of een gelijkwaardige EU-norm, maar wees ervan bewust dat eventuele oppervlakte-actieve stoffen die worden gebruikt voor de productie van emulsies, de anaerobe gasproductie kunnen remmen. Als wordt gedacht dat de aanwezigheid van organische oplosmiddelen en emulgeermiddelen artefacten veroorzaakt, kan de teststof direct als poeder of als vloeistof aan het testmengsel worden toegevoegd. Vluchtige stoffen en niet in water oplosbare vloeibare teststoffen kunnen met mirco-injectiespuiten in de flessen met geënt serum worden geïnjecteerd (punt 12(i)).

▼M6

20. Voeg teststoffen aan de flessen toe zodat een meetkundige reeks concentraties wordt verkregen, bijvoorbeeld 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l en 15,6 mg/l. Voer eerst een voorafgaande bereikbepalingstest uit met de concentraties 1 000 mg/l, 100 mg/l en 10 mg/l om het juiste bereik vast te stellen, als het toxiciteitsbereik niet bekend is van soortgelijke stoffen.

Referentiestof

21. Bereid een waterige oplossing van 3,5-dichloorfenol (10 g/l) door langzaam, onder voortdurend schudden, een zo klein mogelijke hoeveelheid van een 5 mol/l natriumhydroxide-oplossing aan de vaste stof toe te voegen, tot de stof is opgelost. Voeg vervolgens het gedeoxygeneerd oplossingswater toe (punt 14) tot het vereiste volume; ultrasoonbehandeling kan de oplossing bevorderen. Er mogen andere referentiestoffen worden gebruikt wanneer het gemiddelde bereik van de EC_{50} is verkregen in ten minste drie tests met verschillende entmaterialen (afkomstig van verschillende bronnen of verzameld op verschillende tijdstippen).

INTERFERENTIE/FOUTEN

22. Sommige bestanddelen van slib zouden, naar verluidt, kunnen reageren met potentiële remmers zodat ze niet meer beschikbaar zijn voor micro-organismen en dus een geringere, of geen, remming geven. Ook als het slib al een remmende stof bevat, zouden foute resultaten worden verkregen wanneer die stof aan de test zou worden onderworpen. Afgezien van deze mogelijkheden, zijn er diverse geïdentificeerde factoren die tot foute resultaten kunnen leiden. Deze zijn opgenomen in aanhangsel 3, tezamen met methoden om fouten te elimineren of tenminste te beperken.

TESTPROCEDURE

23. Het benodigde aantal replicaten hangt af van de mate van precisie die voor de remmingsindices vereist is. Zet voor elke vereiste concentratie slechts één batch (ten minste in drievoud) testflessen op als de afsluiters van de flessen gedurende de gehele test voldoende gasdicht zijn. Zet evenzo slechts één batch flessen met de referentiestof en één set controles op. Zet echter een batch (bv. in drievoud) testflessen op voor elk interval (t) waarvoor resultaten voor alle concentraties van een te testen teststof vereist zijn, als de afsluiters van de flessen slechts betrouwbaar zijn zolang ze slechts één keer of enkele keren worden doorstoken. Zet evenzo 't' batches van flessen op voor de referentiestof en voor de controles.

24. Het gebruik van een handschoenkast (punt 12(j)) wordt aanbevolen. Laat gedurende ten minste 30 minuten voor aanvang van de test een stroom stikstofgas door de handschoenkast met daarin alle benodigde apparatuur stromen. Zorg ervoor dat de temperatuur van het slib tijdens het hanteren en afsluiten van de flessen 35 °C ± 2 °C is.

Inleidende test

25. Als de activiteit van het slib onbekend is, wordt aanbevolen een inleidende test uit te voeren. Zet controles op om bijvoorbeeld concentraties van vaste stoffen van 10 g/l, 20 g/l en 40 g/l plus substraat, maar geen teststof te verkrijgen. Gebruik ook verschillende volumes reactiemengsel om drie of vier verhoudingen tussen volume van de gasruimte en volume van de vloeistof te verkrijgen. Bepaal op basis van de resultaten van de gasvolumes die op verschillende tijdstippen zijn geproduceerd, de voorwaarden die het meest geschikt zijn om twee dagelijkse metingen te kunnen doen die aanzienlijke volumes gas opleveren, en verlaging van de druk per dag bij optimale gevoeligheid ([1]) zonder angst voor ontploffingen.

Toevoeging van teststoffen

26. Voeg aan de lege testflessen (punt 12(b)) in water oplosbare teststoffen toe als waterige oplossingen (punt 18). Gebruik voor elk concentratiebereik sets van flessen, ten minste in drievoud (punt 20). Injecteer, in geval van een onoplosbare of slecht oplosbare teststof, oplossingen daarvan in organische

([1]) Dit geldt voor de testopzet en de testomstandigheden waarbij de geproduceerde gasvolumes — van controleblanco's en van vaten die duiden op 70-80 % remming — met een aanvaardbare foutenmarge kunnen worden geschat.

▼M6

oplosmiddelen met behulp van een micro-injectiespuit in lege flessen om sets van replicaten van alle vijf de concentraties van de teststof te verkrijgen. Verdamp het oplosmiddel door een straal stikstofgas over het oppervlak van de oplossingen in de testflessen te laten stromen. Als alternatief kunnen ook onoplosbare vaste stoffen als gewogen hoeveelheden van de vaste stof direct aan de testflessen worden toegevoegd.

27. Als onoplosbare en slecht in water oplosbare teststoffen niet met behulp van een oplosmiddel worden toegevoegd, voeg ze dan met een micro-injectiespuit direct aan de testflessen toe na de toevoeging van entmateriaal en testsubstraat (zie punt 30). Vluchtige teststoffen kunnen op dezelfde wijze worden toegevoegd.

Toevoeging van entmateriaal en substraat

28. Roer een geschikte hoeveelheid gezeefd gistend slib (zie punt 16) in een 5-literfles (punt 12(g)), terwijl een stroom stikstofgas door de gasruimte stroomt. Spoel de testflessen, met daarin waterige oplossingen of verdampte oplosmiddeloplossingen van teststoffen, gedurende ongeveer twee minuten met een stroom stikstofgas om lucht te verwijderen. Breng met behulp van een pipet met grote punt of een maatcilinder porties van bv. 100 ml van het goed gemengde slib in de testflessen. Het is van essentieel belang de pipet in één keer te vullen tot precies het vereiste volume slib, omdat vaste slibdeeltjes gemakkelijk kunnen bezinken. Als meer slib nodig is, leeg de pipet dan en begin opnieuw.

29. Voeg vervolgens voldoende substraatoplossing toe (punt 17) om een concentratie van 2 g/l van elk van de voedingsbouillon, het gistextract en de D-glucose in het mengsel te verkrijgen, terwijl de stikstof nog steeds doorstroomt. Hieronder ziet u een voorbeeld voor testbatches:

Uiteindelijke massaconcentratie van de teststof in testflessen (mg/l)	Volume van de teststof (ml)		Reagentia en media (ml)		
	Voorraadoplossing a) 10 g/l punt 18	Voorraadoplossing b) 1 g/l punt 18	Verdunningswater punt 14	Entmateriaal punt 16	Substraat punt 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

Totaal volume van fles = 160 ml. Volume van vloeistof = 103 ml.
Volume van gas = 57 ml, of 35,6 % van het totale volume.

30. Spoel op dezelfde wijze ook voldoende lege testflessen met stikstofgas uit voor eventuele vluchtige en onoplosbare vloeibare teststoffen (zie punt 27).

▼M6

Controles en referentiestof

31. Zet sets van flessen op, ten minste in drievoud, met daarin enkel slib en substraat, om als controles te dienen. Zet voorts replicaatflessen op met daarin slib en substraat plus voldoende stamoplossing van de referentiestof, 3,5-dichloorfenol (punt 21), om een uiteindelijke concentratie van 150 mg/l te verkrijgen. Deze concentratie moet de gasproductie met ongeveer 50 % remmen. Zet, als alternatief, een reeks concentraties van de referentiestof op. Zet voor pH-metingen bovendien vier extra flessen op met daarin slib, gedeoxygeneerd water en substraat. Voeg de teststof toe aan twee flessen in de hoogste concentratie die wordt getest, en voeg gedeoxygeneerd water toe aan de andere twee flessen.

32. Zorg ervoor dat alle flessen — teststof, referentiestoffen en controles — hetzelfde volume (V_R) aan vloeistof bevatten; voeg, waar nodig, gedeoxygeneerd, gedeïoniseerd water toe (punt 14) om het juiste volume te verkrijgen. De gasruimte dient tussen de 10 % en 40 % van het volume van de fles in te nemen, waarbij de werkelijke waarde wordt geselecteerd uit de gegevens die uit de inleidende test zijn verkregen. Verwijder, wanneer alle bestanddelen aan de flessen zijn toegevoegd, de naald waardoor het gas werd aangevoerd, en sluit elke fles af met een rubber stop en een aluminium dop (punt 12(b)). Bevochtig de stop daarbij eerst met een druppel gedeïoniseerd water, zodat hij gemakkelijker in te brengen is. Meng de inhoud van elke fles door te schudden.

Incubatie van flessen

33. Breng de flessen over naar de thermostatisch gereguleerde incubator, die bij voorkeur is uitgerust met een schudapparaat en op een temperatuur van 35 °C ± 2 °C wordt gehouden. De flessen worden in het donker geïncubeerd. Maak de druk in de flessen na ongeveer 1 uur gelijk aan de omgevingsdruk door de injectienaald die is verbonden met de drukmeter (punt 12(c)), door de afsluiters van de verschillende flessen te steken, open het ventiel tot de drukmeter op nul staat, en sluit tot slot het ventiel. De naald dient onder een hoek van ongeveer 45° te worden ingebracht om weglekken van gas uit de flessen te voorkomen. Als de flessen worden geïncubeerd in een incubator zonder schudapparaat, schud de flessen dan gedurende de gehele incubatieperiode twee keer per dag met de hand om het systeem in evenwicht te brengen. Incubeer de flessen en draai ze om om verlies van gas door het septum te voorkomen. Omkering is echter ongeschikt in gevallen waarin onoplosbare teststoffen zich aan de bodem van de fles kunnen hechten.

Drukmeting

34. Meet en noteer de pH van de inhoud van twee van de vier flessen die voor dit doel zijn opgezet, wanneer de flessen een temperatuur van 35 °C ± 2 °C hebben bereikt, en gooi de inhoud vervolgens weg; zet de incubatie van de overige flessen in het donker voort. Meet en noteer in de volgende 48 tot 72 uur twee keer per dag de druk in de flessen door de naald van de drukmeter door de afsluiters van de verschillende flessen te steken en de naald tussen de metingen te drogen. Houd tijdens de meting, die zo snel mogelijk moet worden uitgevoerd, alle delen van de fles op de incubatietemperatuur. Laat de stand van de drukmeter stabiliseren en noteer het resultaat. Open vervolgens het ventiel voor ventilatie en sluit het wanneer de drukmeter 0 aangeeft. Zet de test voort, gewoonlijk gedurende 48 uur vanaf het moment waarop de druk voor het eerst in evenwicht is gebracht, aangeduid als 'tijdstip 0'. Het aantal aflezingen en ventilaties moet voor vluchtige stoffen worden beperkt tot één (aan het eind van de incubatie) of twee om het verlies van de teststof tot een minimum te beperken (10).

35. Open het ventiel niet als de meter een negatieve druk aangeeft. Soms hoopt zich vocht in de injectienaald en slangen op, wat blijkt uit een kleine negatieve stand van de drukmeter. Verwijder in dit geval de naald, schud aan de slang, droog af met een tissue en plaats een nieuwe naald.

pH-meting

36. Meet en noteer de pH van de inhoud van elke fles na de laatste drukmeting.

▼M6

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Uitdrukking van de resultaten

37. Bereken de som en het gemiddelde van de genoteerde drukken op elk tijdstip voor elke set replicaatflessen en bereken de gemiddelde cumulatieve bruto gasdruk op elk tijdstip voor elke set replicaten. Teken voor de controle-, test- en referentieflessen curves van de gemiddelde cumulatieve gasproductie (Pa) als functie van de tijd. Selecteer een tijdstip op het lineaire gedeelte van de curve, doorgaans 48 uur, en bereken het remmingspercentage (I) voor elke concentratie volgens de volgende formule [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

waarin:

I = remmingspercentage, in %;

P_t = de met testmateriaal geproduceerde gasdruk op de geselecteerde tijd, in Pascal (Pa);

P_c = de in de controle geproduceerde gasdruk op dezelfde tijd, in Pascal (Pa).

Het is raadzaam beide grafieken te tekenen, d.w.z. de grafiek van I als functie van de concentratie en ook de grafiek van I als functie van de logaritme van de concentratie, zodat de curve kan worden gekozen die een lineair verband het dichtst benadert. Bepaal de EC_{50}-waarde (mg/l) visueel of door regressieanalyse op basis van de meest lineaire curve. Voor vergelijkende doeleinden kan het nuttiger zijn om de concentratie van de stof uit te drukken in mg stof/g totale droge vaste stoffen. Deel, om deze concentratie te verkrijgen, de volumetrische concentratie (mg/l) door de volumetrische concentratie van de droge vaste stoffen in het slib (g/l) (punt 16).

38. Bereken hetzij het remmingspercentage dat is bereikt door de ene concentratie van de gebruikte referentiestof, of de EC_{50}, als voldoende concentraties zijn onderzocht.

39. Gebruik de kalibratiecurve van de drukmeter (aanhangsel 2) om de gemiddelde druk van het geproduceerde gas in de controle P_c (Pa) te converteren naar het volume en bereken hieruit de gasopbrengst, uitgedrukt als het volume dat in 48 uur wordt geproduceerd uit 100 ml onverdund slib bij een concentratie van 2 % (20 g/l) tot 4 % (40 g/l) vaste stoffen.

Geldigheidscriteria

40. Uit de resultaten van de ISO-interlaboratoriumproef (5) is gebleken dat de referentiestof (3,5-dichloorfenol) 50 % remming van de gasproductie in een concentratiebereik van 32 mg/l tot 510 mg/l (gemiddeld 153 mg/l) veroorzaakt (punt 10). Dit bereik is zo breed dat geen betrouwbare, harde grenzen voor de remming als geldigheidscriteria kunnen worden vastgesteld; dit zou wel mogelijk moeten zijn wanneer uit ontwikkelingen is gebleken hoe consistentere entmaterialen kunnen worden geproduceerd. De volumes gas die in 48 uur in de controleflessen werden geproduceerd, varieerden van 21 ml/g slib (droge stof) tot 149 ml/g (gemiddeld 72 ml/g). Er werd geen duidelijk verband gevonden tussen het volume van het geproduceerde gas en de bijbehorende EC_{50}-waarde. De uiteindelijke pH varieerde tussen 6,1 en 7,5.

41. De test wordt als geldig beschouwd wanneer een remming van meer dan 20 % is verkregen in de referentiecontrole met 150 mg/l 3,5-dichloorfenol, meer dan 50 ml gas per g droge stof is geproduceerd in de blanco controle en de pH-waarde aan het eind van de test tussen 6,2 en 7,5 ligt.

Testverslag

42. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof

— de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

▼M6

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof.

Testomstandigheden

— volumes van vloeibare inhoud en van de gasruimte in de testvaten;

— beschrijvingen van de testvaten en gasmeting (bv. type drukmeter);

— de manier waarop de teststof en de referentiestof aan het testsysteem zijn toegevoegd, de gebruikte testconcentraties en het gebruik van oplosmiddelen;

— gedetailleerde gegevens over het gebruikte entmateriaal: naam van de waterzuiveringsinstallatie, beschrijving van de oorsprong van het behandelde afvalwater (bv. werktemperatuur, slibretentietijd, hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater of industrieel afvalwater, enz.), concentratie van vaste stoffen, gasproductieactiviteit van anaerobe gistingstank, eerdere blootstelling of mogelijke voorafgaande conditionering aan toxische stoffen of plaats van verzamelen van modder, sediment, enz.;

— incubatietemperatuur en bereik;

— het aantal replicaten.

Resultaten

— pH-waarden aan het eind van de test;

— alle gemeten gegevens die in de test-, blanco- en referentiestofcontrolevaten zijn verzameld, als passend (bv. druk in Pa of millibar) in tabelvorm;

— remmingspercentage in test- en referentieflessen, en remming-concentratiecurven;

— berekening van EC_{50}-waarden, uitgedrukt in mg/l en mg/g;

— gasproductie per g slib in 48 uur;

— eventuele redenen om de testresultaten te verwerpen;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van afwijkingen van de procedures in deze testmethode en bespreking van eventuele afwijkingen in de testresultaten als gevolg van interferenties en fouten ten opzichte van wat werd verwacht;

— tevens bespreking of de test ten doel had het toxisch effect op eerder blootgestelde of op niet eerder blootgestelde micro-organismen te meten.

LITERATUUR

(1) Hoofdstuk C.11 van deze bijlage: Actief slib: remming ademhaling.

(2) Hoofdstuk C.43 van deze bijlage: Anaerobe biologische afbreekbaarheid van organische bestanddelen in uitgegist slib: methode door meting van de gasproductie.

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼M6

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Control Fed. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS & 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 HA & Battersby NS (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, Germany (1990). Eds. Steinberg C & Kettrup A, blz. 117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T & 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.

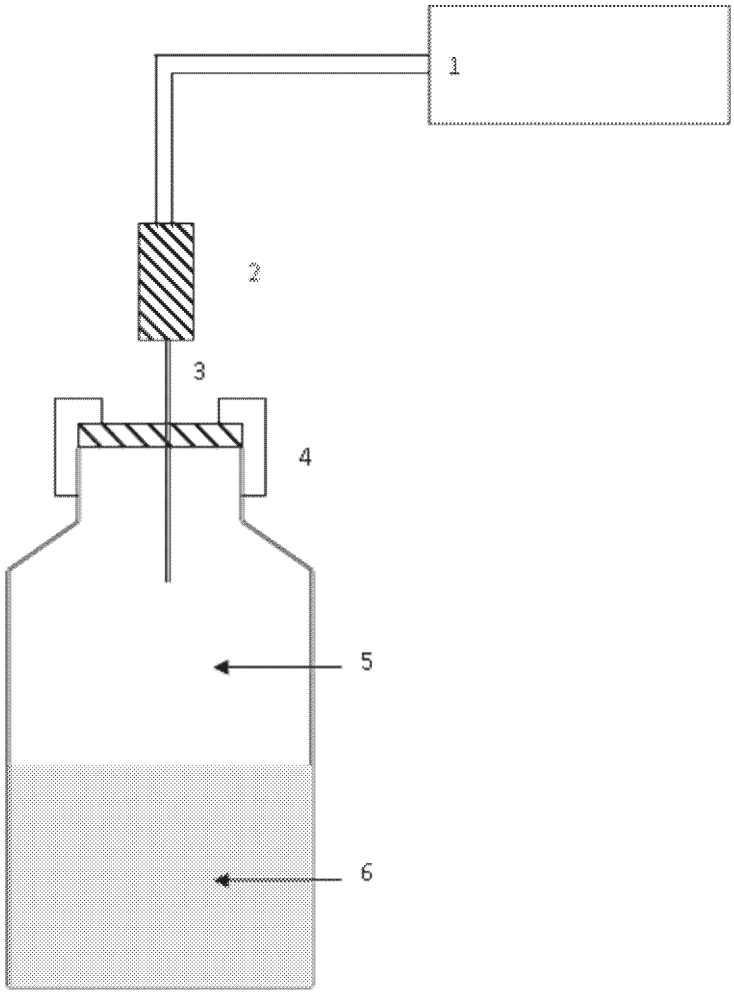
(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Aanhangsel 1

Voorbeeld van een apparaat om de biogasproductie te meten door de gasdruk



Legenda:

1 — Drukmeter

2 — Gasdicht driewegventiel

3 — Injectienaald

4 — Gasdichte afsluiter (krimpsluiting en septum)

5 — Gasruimte

6 — Uitgegist slibentmateriaal

Testvaten in een omgeving van 35 °C ± 2 °C

▼M6

Aanhangsel 2

Conversie van de drukmeter

De standen van de drukmeter kunnen door middel van een standaardcurve worden gerelateerd aan gasvolumes en hieruit kan het geproduceerde volume gas per g droog slib per 48 uur worden berekend. Deze activiteitsindex wordt gebruikt als een van de criteria op basis waarvan de geldigheid van de testresultaten wordt beoordeeld. De kalibratiecurve wordt opgesteld door bekende volumes gas bij 35 °C ± 2 °C te injecteren in serumflessen met daarin een volume aan water gelijk aan dat van het reactiemengsel, V_R;

— Breng porties van V_R ml water, bewaard bij 35 °C ± 2 °C, in vijf serumflessen. Sluit de flessen af en plaats ze gedurende 1 uur in een waterbad bij 35 °C ± 2 °C om een evenwichtstoestand te bereiken;

— Zet de drukmeter aan, laat deze stabiliseren en stel hem in op nul;

— Steek de injectienaald door de afsluiter van een van de flessen, open het ventiel tot de drukmeter nul aangeeft, en sluit het ventiel;

— Herhaal deze procedure voor de overige flessen;

— Injecteer in elke fles 1 ml lucht van 35 °C ± 2 °C. Steek de naald (op de meter) door de afsluiter van een van de flessen en wacht tot de stand van de drukmeter is gestabiliseerd; Noteer de druk, open het ventiel tot de drukmeter nul aangeeft, en sluit het ventiel;

— Herhaal deze procedure voor de overige flessen;

— Herhaal de totale procedure met 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml en 50 ml lucht;

— Teken een conversiecurve van de druk (Pa) als functie van het geïnjecteerde gasvolume (ml). De respons van het instrument is lineair in het bereik van 0 Pa tot 70 000 Pa, en van 0 ml tot 50 ml gasproductie.

▼M6

Aanhangsel 3

Geïdentificeerde factoren die tot foute resultaten kunnen leiden

(a) *Kwaliteit van de flesdoppen*

Er zijn verschillende typen septa voor de serumflessen commercieel verkrijgbaar; vele daarvan, waaronder septa van butylrubber, verliezen hun gasdichtheid wanneer ze onder de omstandigheden van deze test met een injectienaald worden doorstoken. Soms daalt de druk heel langzaam wanneer het septum met een injectienaald is doorstoken. Het gebruik van gasdichte septa wordt aanbevolen om lekken tegen te gaan (punt 12(b)).

(b) *Vocht in de injectienaald*

Soms hoopt zich vocht in de injectienaald en slang op, wat blijkt uit een kleine negatieve stand van de drukmeter. Verwijder, om dit recht te zetten, de naald, schud aan de slang, droog af met een tissue en plaats een nieuwe naald (punten 12(c) en 35).

(c) *Vervuiling door zuurstof*

Anaerobe methoden zijn gevoelig voor fouten als gevolg van verontreiniging door zuurstof, die tot een lagere gasproductie kan leiden. In deze methode moet deze mogelijkheid tot een minimum worden beperkt door het gebruik van strikt anaerobe technieken, met inbegrip van het gebruik van een handschoenkast.

(d) *Grove substraten in slib*

De anaerobe gasproductie en de gevoeligheid van het slib worden beïnvloed door substraten die met het entmateriaal naar de testflessen worden overgebracht. Uitgegist slib van huishoudelijke anaerobe gistingstanks bevat vaak nog herkenbare zaken zoals haar en plantenresten van cellulose, die het doorgaans moeilijk maken om representatieve monsters te nemen. De grove onoplosbare materie in het slib kan worden verwijderd door het slib te zeven, waarna monsters vaker representatief zullen zijn (punt 16).

(e) *Vluchtige teststoffen*

Vluchtige teststoffen zullen vrijkomen in de gasruimte van de testflessen. Dit kan ertoe leiden dat tijdens de ventilatie na de drukmetingen een deel van de teststof uit het systeem verdwijnt, wat onjuiste hoge EC_{50}-waarden oplevert. Door een geschikte keuze van de verhouding tussen het volume van de gasruimte en het vloeistofvolume en door niet te ventileren na de drukmetingen, kan de fout worden beperkt (10).

(f) *Niet-lineariteit van gasproductie*

Als de grafiek van de gemiddelde cumulatieve gasproductie als functie van de incubatieperiode over 48 uur niet bij benadering lineair is, kan de nauwkeurigheid van de test afnemen. Om dit tegen te gaan, kan het raadzaam zijn gistend slib van een andere bron te gebruiken en/of een hogere concentratie van de testsubstraat-voedingsbouillon, gistextract en glucose toe te voegen (punt 29).

▼M6

Aanhangsel 4

Toepassing op milieumonsters met een lage concentratie biomassa — anaerobe modders, sedimenten, enz.

INLEIDING

A.1 In het algemeen is de specifieke microbiële activiteit (volume van geproduceerd gas per g droge vaste stoffen) van van nature voorkomende anaerobe modders, sedimenten, bodems, enz. veel lager dan die van anaeroob slib afkomstig van afvalwater. Daarom moeten enkele van de experimentele omstandigheden worden aangepast wanneer de remmende effecten van deze minder actieve monsters moeten worden gemeten. Voor deze minder actieve monsters zijn twee algemene handelswijzen mogelijk:

(a) Voer een aangepaste inleidende test uit (punt 25) met het onverdunde monster modder, bodem, enz. bij 35 °C ± 2 °C of bij de temperatuur van de plaats waar het monster is genomen, voor een nauwkeurigere simulatie (als in deel 1 van ISO 13 641);

(b) Of voer de test uit met verdund (1 op 100) slib uit een gistingstank om de lage activiteit te simuleren die van het milieumonster wordt verwacht, maar houd de temperatuur op 35 °C ± 2 °C (als in deel 2 van ISO 13 641).

A.2 Optie (a) kan worden verwezenlijkt door de methode te volgen die hier wordt beschreven (gelijk aan deel 1 van ISO 13 641), maar het is noodzakelijk een inleidende test (punt 25) uit te voeren om optimale omstandigheden te waarborgen, tenzij deze al bekend zijn uit eerdere tests. Het modder- of sedimentmonster moet grondig worden gemengd, bv. in een blender, en, indien nodig, worden verdund met een kleine portie ontlucht, verdunningswater (punt 14), zodat het voldoende mobiel is om door een pipet met grove punt of een maatcilinder te worden overgebracht. Als wordt gedacht dat er mogelijk een tekort aan voedingsstoffen is, kan het moddermonster worden gecentrifugeerd (onder anaerobe omstandigheden) en opnieuw worden gesuspendeerd in het minerale medium met gistextract (A.11).

A.3 Optie (b). Dit bootst de lage activiteit van milieumonsters redelijk na, maar heeft niet de hoge concentratie gesuspendeerde vaste stoffen van deze monsters. Het is niet bekend welke rol deze vaste stoffen spelen in de remming, maar de reactie tussen de teststoffen en bestanddelen van de modder, alsook de adsorptie van de teststoffen aan de vaste stoffen zouden tot een lager toxisch effect van de teststof kunnen leiden.

A.4 Temperatuur is een andere belangrijke factor: voor een strikte simulatie moeten tests worden uitgevoerd bij de temperatuur van de plaats waar het monster is genomen, omdat bekend is dat verschillende groepen methaanproducerende consortia van bacteriën binnen verschillende temperatuurbereiken werkzaam zijn, namelijk thermofielen (~30-35 °C), mesofielen (20-25 °C) en psychrofielen (< 20 °C), die verschillende remmingspatronen kunnen vertonen.

A.5 Duur. In de algemene test, deel 1, met onverdund slib, was de gasproductie in de 2 tot 4 dagen altijd voldoende, terwijl in deel 2 met tot een honderdste verdund slib in deze periode in de ringtest onvoldoende gas, of helemaal geen gas, werd geproduceerd. Madsen et al. (1996) zeggen in hun beschrijving van laatstgenoemde test dat minstens 7 dagen de tijd moet worden genomen.

Testen met lage concentratie biomassa (Optie b)

De volgende wijzigingen en aanpassingen moeten worden aangebracht, waarbij enkele bestaande punten en alinea's van de hoofdtekst worden aangevuld of vervangen.

▼**M6**

A.6 Toevoegen aan punt 6: Principe van de test;

„Deze techniek mag worden gebruikt met 1:100-verdund anaeroob slib, gedeeltelijk om de lage activiteit van modders en sediment te simuleren. De incubatietemperatuur kan 35 °C zijn of die van de plaats waar het monster werd verzameld. Omdat de bacteriële activiteit veel lager is dan in onverdund slib, moet de incubatietijd worden verlengd tot ten minste 7 dagen.”

A.7 Toevoegen aan punt 12 (a):

„de incubator moet kunnen werken bij lage temperaturen tot 15 °C.”

A.8 Toevoegen van een extra reagens na punt 13:

„Fosforzuur (H_3PO_4), 85 % in massa in water.”

A.9 Toevoegen aan het eind van punt 16:

„Gebruik in de test een definitieve concentratie van 0,20 ± 0,05 g/l totale droge vaste stoffen.”

A.10 Punt 17. Testsubstraat

Dit substraat mag niet worden gebruikt, maar wordt vervangen door gistextract (zie de punten 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 Een mineraal medium, met inbegrip van sporenelementen, voor het verdunnen van anaeroob slib is vereist, en voor het gemak wordt aan dit medium het organisch substraat, gistextract, toegevoegd.

Toevoegen na punt 17.

„(a) Mineraal testmedium, met gistextract.

Dit wordt bereid uit een tien keer geconcentreerd testmedium (punt 17 (b); A.12) met een sporenelementenoplossing (punt 17 (c); A.13). Gebruik vers geleverd natriumsulfidenonahydraat (punt 17 (b); A.12) of was en droog het voor gebruik, om te waarborgen dat het voldoende reductiecapaciteit heeft. Als de test wordt uitgevoerd zonder gebruikmaking van een handschoenkast (punt 12 (j)), moet de concentratie natriumsulfide in de stamoplossing worden verhoogd tot 2 g/l (van 1 g/l). Natriumsulfide kan ook worden toegevoegd uit een geschikte stamoplossing door het septum van de gesloten testflessen, omdat deze procedure het risico van oxidatie verkleint, om een uiteindelijke concentratie van 0,2 g/l te verkrijgen. Als alternatief mag titanium(III)citraat (punt 17 (b)) worden gebruikt. Voeg het door het septum van de gesloten testflessen toe om een concentratie van 0,8 mmol/l tot 1,0 mmol/l te verkrijgen. Titanium(III)citraat is een zeer effectief, laagtoxisch reductiemiddel, dat als volgt wordt bereid: Los 2,94 g trinatriumcitraatdihydraat op in 50 ml zuurstofvrij verdunningswater (punt 14) (wat resulteert in een 200 mmol/l-oplossing) en voeg 5 ml titanium(III)chloride-oplossing (15 g/100 ml verdunningswater) toe. Neutraliseer tot een pH van 7 ± 0,5 met natriumcarbonaat en breng over in een geschikte serumfles onder een stroom stikstofgas. De concentratie van het titanium(III)citraat in deze stamoplossing is 164 mmol/l. Gebruik het testmedium onmiddellijk of bewaar het niet langer dan 1 dag bij 4 °C.

A.12 (b) Tienmaal geconcentreerd testmedium, bereid met:

watervrij kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4)	2,7 g
Dinatriumwaterstoffosfaat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(of 11,2 g dodecahydraat)	5,3 g
ammoniumchloride (NH_4Cl)	

▼**M6**

calciumchloridedihydraat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnesiumchloridehexahydraat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
ijzer(II)chloridetetrahydraat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurine (redoxindicator)	0,01 g
natriumsulfidenonahydraat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(of titanium(III)citraat) uiteindelijke concentratie	0,8 mmol/l tot 1,0 mmol/l
sporenelementenoplossing (zie punt 17 (c); A.13)	10,0 ml
gistextract	100 g
In verdunningswater oplossen (punt 14) en aanvullen tot:	1 000 ml

A.13 (c) Sporenelementenoplossing, bereid met:

mangaan(II)chloridetetrahydraat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
orthoboorzuur (H_3BO_3)	0,05 g
zinkchloride ($ZnCl_2$)	0,05 g
koper(II)chloride ($CuCl_2$)	0,03 g
natriummolybdaatdihydraat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
kobalt(II)chloridehexahydraat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
nikkel(II)chloridehexahydraat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinatriumseleniet (Na_2SeO_3)	0,05 g
In verdunningswater oplossen (punt 14) en aanvullen tot:	1 000 ml”

A.14 Punt 25: Inleidende test

Het is van essentieel belang dat een inleidende test wordt uitgevoerd als beschreven in punt 24, behalve dat de concentratie van de vaste stoffen in het slib een honderdste moet zijn van de opgegeven concentraties, d.w.z. 0,1 g/l, 0,2 g/l en 0,4 g/l. De incubatietijd moet ten minste 7 dagen zijn.

Noot: In de ringtest (5) was de gasruimte met 75 % totaalvolume veel te hoog; de gasruimte moet in het aanbevolen bereik van 10 %-40 % liggen. Het toepasselijke criterium is dat het volume van het geproduceerde gas bij circa 80 % remming met een acceptabele precisie (bv. ± 5 % tot ± 10 %) moet kunnen worden gemeten.

A.15 Punt 26 tot en met 30: Toevoeging van teststoffen, entmateriaal en substraat

De toevoegingen vinden plaats op dezelfde wijze als beschreven in deze punten, maar de substraatoplossing (punt 17) wordt vervangen door het testmedium plus gistextractsubstraat (A.11).

Ook wordt de uiteindelijke concentratie van de droge vaste stoffen in het slib verlaagd van 2 g/l — 4 g/l naar 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). In tabel A.1, die de tabel in punt 29 vervangt, worden twee voorbeelden van de toevoeging van bestanddelen aan het testmengsel gegeven.

A.16 Punt 33: Incubatie van flessen

De incubatietijd is ten minste 7 dagen, vanwege de verwachte lagere gasproductie.

▼M6

A.17 Punt 34: Drukmetingen

Voor het meten van de druk in de gasruimte van de flessen wordt dezelfde procedure gebruikt als beschreven in punt 34, als de hoeveelheden in de gasvormige fase vereist zijn. Als de totale hoeveelheden CO_2 plus CH_4 moeten worden gemeten, wordt de pH van de vloeibare fase verlaagd tot circa pH 2 door injectie van H_3PO_4 in elk van de relevante flessen en meting van de druk na 30 minuten schudden bij de testtemperatuur. Meer informatie over de kwaliteit van het entmateriaal kan echter worden verkregen door de druk in elke fles vóór en na aanzuring te meten. Wanneer het tempo van de CO_2-productie bijvoorbeeld veel hoger is dan dat van methaan, kan de gevoeligheid van de fermentatieve bacteriën zijn gewijzigd en/of worden vooral methaanbacteriën beïnvloed door de teststof.

A.18 Punt 36: pH-meting

Als H_3PO_4 wordt gebruikt, moeten speciaal voor de pH-meting enkele extra flessen worden opgezet waaraan geen H_3PO_4 wordt toegevoegd.

REFERENTIE:

Madsen, T, Rasmussen, HB & Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No. 336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tabel A.1

Voorbeelden van de testopzet voor testbatches

Bestanddelen reactiemengsel	Voorbeeld 1	Voorbeeld 2	Normale volgorde van de toevoegingen
Concentratie van bereid entmateriaal (g/l)	0,42	2,1	—
Volume van toegevoegd entmateriaal (ml)	45	9	4
Concentratie van entmateriaal in testflessen (g/l)	0,20	0,20	—
Volume van toegevoegd testmedium (ml)	9	9	2
Volume van toegevoegd verdunningswater (ml)	36	72	3
Concentratie van gistextract in testflessen (g/l)	9,7	9,7	—
Volume van stamoplossing van de teststof (ml)	3	3	1
Totaal vloeibaar volume (ml)	93	93	—

▼**M6**

Aanhangsel 5

Definities

Voor de toepassing van deze testmethode worden de volgende definities gehanteerd:

Stof betekent een substantie of mengsel.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M6

C.35. TEST TER BEPALING VAN DE TOXICITEIT VOOR *LUMBRICULUS* IN SEDIMENTEN EN WATER M.B.V. VERRIJKT SEDIMENT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 225 (2007) van de OESO. Sediment-opnemende endobenthische dieren zijn voorwerp van een potentieel hoge blootstelling aan sedimentgebonden stoffen en moeten daarom extra aandacht krijgen, bv. (1), (2), (3). Van deze sediment-opnemende dieren spelen de aquatische Oligochaetae een belangrijke rol in de sedimenten van aquatische systemen. Door bioturbatie van het sediment en doordat ze als prooi dienen, kunnen deze dieren een grote invloed hebben op de biologische beschikbaarheid van chemische stoffen voor andere organismen, bv. benthische vissen. In tegenstelling tot epibenthische organismen, graven endobenthische aquatische Oligochaetae (bv. *Lumbriculus variegatus*) zich in het sediment in en nemen zij onder het sedimentoppervlak sedimentdeeltjes op. Dit zorgt voor blootstelling van de testorganismen aan de teststof via alle mogelijk opnameroutes (bv. contact met en opname van verontreinigde sedimentdeeltjes, maar ook via poriënwater en bovenstaand water).

2. Deze testmethode is bedoeld om de effecten van langdurige blootstelling van endobenthische Oligochaetae *Lumbriculus variegatus* (Müller) aan sedimentgerelateerde stoffen te bepalen. Zij is gebaseerd op bestaande protocollen voor toxiciteits- en bioaccumulatietests in sedimenten, bv. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). De methode is beschreven voor statische testomstandigheden. Bij het in deze testmethode gebruikte blootstellingsscenario wordt het sediment verrijkt met de teststof. Het gebruik van verrijkt sediment heeft ten doel een sediment te simuleren dat is verontreinigd met de teststof.

3. De stoffen die moeten worden getest voor in het sediment levende organismen, zijn gewoonlijk gedurende lange tijd persistent in dit compartiment. De in het sediment levende organismen kunnen via een aantal routes worden blootgesteld. Het relatieve belang van elke blootstellingsroute, en de tijd die verstrijkt voordat elk van de routes bijdraagt aan de algehele toxische effecten, hangen af van de fysisch-chemische eigenschappen van de betrokken stof en zijn uiteindelijke lot in het dier. Voor sterk adsorberende stoffen (bijvoorbeeld met log K_{ow} > 5) of voor stoffen die een covalente binding met het sediment aangaan, kan opname van besmet voedsel een belangrijke blootstellingsroute zijn. Om de toxiciteit van dergelijke stoffen niet te onderschatten, wordt het voedsel dat nodig is voor de voortplanting en groei van de testorganismen, vóór de aanbrenging van de teststof aan het sediment toegevoegd (11). De beschreven testmethode is voldoende gedetailleerd om de test te kunnen uitvoeren en ruimte te bieden voor aanpassingen in de proefopzet afhankelijk van de omstandigheden in bepaalde laboratoria en de verschillende kenmerken van teststoffen.

4. De testmethode heeft ten doel de effecten van een teststof op de voortplanting en de biomassa van de testorganismen te bepalen. De gemeten biologische parameters zijn het totale aantal overlevende wormen en de biomassa (drooggewicht) aan het eind van de blootstelling. Deze gegevens worden geanalyseerd door hetzij met een regressiemodel een schatting te maken van de concentratie die zou leiden tot een afname van x % (bv. EC_{50}, EC_{25} en EC_{10}), hetzij statistische hypothesen te toetsen om de No Observed Effect Concentration (NOEC) en de Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) te bepalen.

5. Hoofdstuk C.27 van deze bijlage, „Test ter bepaling van de toxiciteit voor chironomiden in sedimenten en water m.b.v. verrijkt sediment” (6), verschaft veel essentiële en nuttige nadere gegevens met betrekking tot de uitvoering van de onderhavige testmethode ter bepaling van de toxiciteit in sedimenten. Dit document dient daarom als basis waarop noodzakelijke wijzigingen voor het uitvoeren van tests om met *Lumbriculus variegatus* de toxiciteit in sedimenten te bepalen werden uitgewerkt. Andere documenten waarnaar wordt verwezen, zijn bijvoorbeeld de ASTM-standaardrichtsnoer

▼M6

voor de bepaling van de bioaccumulatie van sedimentgerelateerde verontreinigende stoffen met bentische gewervelde dieren (3), de Amerikaanse EPA-methoden voor het meten van de toxiciteit en bioaccumulatie van sedimentgerelateerde verontreinigende stoffen met gewervelde zoetwaterdieren (7), en de ASTM-standaardrichtsnoer voor het verzamelen, bewaren, kenschetsen en hanteren van sedimenten voor toxicologische tests en voor de selectie van bemonsteringsapparaten voor het verzamelen van benthische gewervelde dieren (12). Daarnaast zijn praktische ervaring die is opgedaan tijdens de ringtest voor de testmethode ((13), rapport over de ringtest), en gedetailleerde gegevens uit de literatuur belangrijke informatiebronnen geweest voor het opstellen van het onderhavige document.

VEREISTE EN BEGELEIDENDE INFORMATIE

6. Vóór het begin van de studie moet informatie over de teststof worden verzameld, zoals voorzorgsmaatregelen, passende opslagomstandigheden en de analysemethoden. Richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat de uitvoering van de test problematisch is, zijn opgenomen in (14).

7. Vóór de uitvoering van een test moet de volgende informatie over de teststof bekend zijn:

   — de triviale naam, chemische naam (bij voorkeur de IUPAC-naam), structuurformule, CAS-registratienummer, zuiverheid;

   — dampspanning;

   — oplosbaarheid in water.

8. De volgende aanvullende informatie wordt geacht van nut te zijn vóór aanvang van de test:

   — octanol/water-verdelingscoëfficiënt, $K_{ow;}$

   — organisch koolstof/water-verdelingscoëfficiënt, uitgedrukt als $K_{oc;}$

   — hydrolyse;

   — fototransformatie in water;

   — biologische afbreekbaarheid;

   — oppervlaktespanning.

9. Informatie over bepaalde kenmerken van het te gebruiken sediment moet worden verkregen vóór de start van de test (7). Zie de punten 22 tot en met 25 voor nadere gegevens.

PRINCIPE VAN DE TEST

10. Wormen in een vergelijkbare fysiologische toestand (gesynchroniseerd als beschreven in aanhangsel 5) worden blootgesteld aan een reeks concentraties van een toxische stof aangebracht op de sedimentfase van een sediment/watersysteem. Kunstmatig sediment en synthetisch water moeten als media worden gebruikt. Testvaten zonder aangebrachte teststof dienen als controle. Het sediment wordt voor elk concentratieniveau in bulk met de teststof verrijkt om de variabiliteit tussen de replicaten van elk concentratieniveau tot een minimum te beperken. Daarna worden de testorganismen aan de testvaten met de gestabiliseerde sediment- en waterconcentraties toegevoegd (zie punt 29). De testdieren worden gedurende een periode van 28 dagen blootgesteld aan de sediment/watersystemen. Gezien het lage gehalte aan voedingsstoffen van het kunstmatige sediment, moet het sediment worden aangepast met een voedingsbron (zie de punten 22 en 23 en aanhangsel 4) om te waarborgen dat de wormen zich onder de controleomstandigheden zullen ontwikkelen en voortplanten. Op deze manier wordt gewaarborgd dat de testdieren via het water en het sediment alsook via hun voedsel worden blootgesteld.

11. Het eindpunt van dit type studie is bij voorkeur de EC_x (bv. EC_{50}, EC_{25} en EC_{10}; effectconcentratie waarbij bij x % van de testorganismen een effect optreedt) voor respectievelijk de voortplanting en biomassa, vergeleken met

▼M6

de controle. Gezien de hoge onzekerheid van een lage EC_x (bv. EC_{10}, EC_{25}) met extreem hoge 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen (bv. (15)) en het statistisch onderscheidingsvermogen berekend tijdens het toetsen van hypothesen, zij echter opgemerkt dat de EC_{50} als het meest robuuste eindpunt wordt beschouwd. Daarnaast kunnen de concentratie zonder waargenomen effecten (NOEC) en de laagste concentratie met waargenomen effecten (LOEC) worden bepaald voor de biomassa, en voor de voortplanting, als de testopzet en de gegevens deze berekeningen ondersteunen (zie de punten 34 tot en met 38). Het doel van de studie, afleiding van de EC_x of NOEC, bepaalt de testopzet.

REFERENTIETEST

12. Er wordt verwacht dat de prestaties van de controle-organismen voldoende aantonen in hoeverre een laboratorium in staat is om de test uit te voeren en, als er historische gegevens beschikbaar zijn, in hoeverre de test herhaalbaar is. Daarnaast kunnen met regelmatige tussenpozen referentietoxiciteitstests worden uitgevoerd met een toxische referentiestof om de gevoeligheid van de test-organismen te beoordelen. Referentietoxiciteitstests van 96 uur in uitsluitend water kunnen op bevredigende wijze de gevoeligheid en toestand van de testdieren aantonen (4)(7). Informatie over de toxiciteit van pentachloorfenol (PCP) in complete tests (28 dagen blootstelling aan verrijkt sediment) is opgenomen in aanhangsel 6 en in het rapport over de ringtest van de testmethode (13). De acute toxiciteit van PCP in uitsluitend water is bijvoorbeeld beschreven in (16). Deze informatie kan worden gebruikt om de gevoeligheid van testorganismen in referentietests met PCP als toxische referentiestof te vergelijken. Kaliumchloride (KCl) of kopersulfaat ($CuSO_4$) zijn aanbevolen als toxische referentiestoffen voor *L. variegatus* (4)(7). Tot op heden is de vaststelling van kwaliteitscriteria op basis van toxiciteitsgegevens voor KCl moeilijk door het ontbreken van literatuurgegevens voor *L. variegatus*. Zie (17) tot en met (21) voor informatie over het toxisch effect van koper op *L. variegatus*.

GELDIGHEID VAN DE TEST

13. Voor een geldige test moet aan de volgende eisen zijn voldaan:

— Uit een ringtest (13) is gebleken dat, voor Lumbriculus variegatus, het gemiddelde aantal levende wormen per replicaat in de controles aan het eind van de blootstelling moet zijn toegenomen met ten minste een factor 1,8 ten opzichte van het aantal wormen per replicaat aan het begin van de blootstelling.

— Het bovenstaande water moet gedurende de hele test een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben.

— Het zuurstofgehalte in het bovenstaande water moet tijdens de test ten minste 30 % van de verzadigingswaarde van lucht bij de testtemperatuur bedragen.

BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Testsysteem

14. Statische systemen zonder verversing van het bovenstaande water worden aanbevolen. Als de sediment/water-verhouding (zie punt 15) juist is, zal voorzichtige beluchting gewoonlijk volstaan om de waterkwaliteit voor de testorganismen op een aanvaardbaar niveau te houden (bv. maximalisatie van het gehalte opgeloste zuurstof, minilae ophoping van excretieproducten). Semistatische of doorstroomsystemen met periodieke of continue verversing van het bovenstaande water mogen alleen in uitzonderlijke gevallen worden gebruikt, omdat verwacht wordt dat regelmatige verversing van het bovenstaande water het chemische evenwicht zal aantasten (bv. verlies van teststof uit het testsysteem).

Testvaten en apparatuur

15. De blootstelling moet plaatsvinden in bekerglazen met een inhoud van bv. 250 ml en een diameter van 6 cm. Ook andere glazen vaten mogen worden gebruikt, mits zij voldoende diep zijn voor het bovenstaande water en het sediment. Elk vat moet een laag van ongeveer 1,5-3 cm geformuleerd sediment krijgen. De verhouding tussen de dikte van de sedimentlaag en de

▼M6

diepte van het bovenliggende water moet 1:4 zijn. De vaten moeten een volume hebben dat geschikt is voor de densiteit, d.w.z. voor het aantal testwormen dat per gewichtseenheid sediment wordt toegevoegd (zie ook punt 39).

16. Testvaten en andere apparatuur die in contact komen met de teststof, moeten volledig van glas of een ander chemisch inert materiaal zijn gemaakt. Voor alle onderdelen van de apparatuur moet het gebruik van materialen die teststoffen kunnen oplossen of absorberen of andere stoffen kunnen logen en die een schadelijk effect op de testdieren hebben, worden vermeden. Voor apparatuur die in contact komt met de testmedia, moet polytetrafluoroethyleen (PTFE), roestvrij staal en/of glas worden gebruikt. Voor organische stoffen waarvan bekend is dat zij aan glas adsorberen, kan het nodig zijn gesilaniseerd glas te gebruiken. In een dergelijk geval moet de apparatuur na gebruik worden verwijderd (geen hergebruik).

Diersoort

17. De testdiersoort die in dit type studies wordt gebruikt, is zoetwater Oligochaeta *Lumbriculus variegatus* (Müller). Deze diersoort verdraagt een breed scala van sedimenttypen en wordt veel gebruikt in tests voor het bepalen van de toxiciteit en de bioaccumulatie in sediment (bv. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)). De herkomst van de testdieren, de bevestiging van de identiteit van de soort (bv. (36)) en de kweekomstandigheden moeten in het verslag worden opgenomen. Er hoeft niet voorafgaand aan iedere test identificatie van de soort plaats te vinden als de organismen uit eigen kweek afkomstig zijn.

Kweken van de testorganismen

18. Om voldoende wormen te hebben voor het uitvoeren van tests ter bepaling van de toxiciteit van sedimenten is het handig de wormen in een permanente laboratoriumcultuur te houden. Aanhangsel 5 bevat een richtsnoer voor methoden voor het kweken van *Lumbriculus variegatus* in een laboratorium, alsook bronnen van starterculturen. Zie de literatuur (3), (7) en (27) voor nadere informatie over het kweken van deze soort.

19. Het wordt ten zeerste aanbevolen culturen van één enkele soort op te zetten, om te waarborgen dat de tests worden uitgevoerd met dieren van dezelfde soort. Zorg ervoor dat de culturen en in het bijzonder de wormen die in de tests gebruikt worden, vrij zijn van waarneembare ziekten en abnormaliteiten.

Water

20. Als bovenstaand water in de tests wordt synthetisch water conform hoofdstuk C.1 van deze bijlage (37) aanbevolen; dit kan ook worden gebruikt voor de laboratoriumculturen van de wormen (zie aanhangsel 2 voor de bereiding). Indien nodig, kant natuurlijk water worden gebruikt. Het gekozen water moet van zodanige kwaliteit zijn dat de testsoort daarin gedurende de acclimatisatie en de looptijd van de test kan groeien en zich kan voortplanten zonder een abnormaal aspect of gedrag te gaan vertonen. Het is aangetoond dat *Lumbriculus variegatus* in dit type water kan overleven, groeien en zich voortplanten (30), en er wordt zo gezorgd voor maximale standaardisatie van de test- en kweekomstandigheden. Als synthetisch water wordt gebruikt, moet de samenstelling daarvan in het testverslag worden opgenomen, en het water moet vóór gebruik worden gekarakteriseerd met ten minste pH, zuurstofgehalte en hardheid (uitgedrukt in mg $CaCO_3$/l). Analyse van het water op microverontreinigingen vóór gebruik kan in dit verband nuttige informatie opleveren (zie bv. aanhangsel 3).

21. Het bovenstaande water moet een pH-waarde tussen 6,0 en 9,0 hebben (zie punt 13). Als een verhoogde ammoniakontwikkeling wordt verwacht, is het nuttig de pH tussen 6,0 en 8,0 te houden. Voor het testen van bv. zwak organische zuren is het raadzaam de pH aan te passen door het in de test te gebruiken water te bufferen als beschreven in bv. (16). De totale hardheid van het in de test te gebruiken water moet voor natuurlijk water tussen 90 en 300 mg $CaCO_3$ per liter liggen. Aanhangsel 3 geeft een overzicht van aanvullende criteria voor aanvaardbaar verdunningswater overeenkomstig OESO-richtsnoer nr. 210 (38).

▼M6

Sediment

22. Aangezien niet-verontreinigde natuurlijke sedimenten uit een bepaalde bron mogelijk niet het hele jaar beschikbaar zijn en inheemse organismen alsook de aanwezigheid van microverontreinigingen de test kunnen beïnvloeden, moet bij voorkeur een geformuleerd sediment (ook gereconstituteerd, kunstmatig of synthetisch sediment genoemd) worden gebruikt. Gebruik van een geformuleerd sediment beperkt de variabiliteit van de testomstandigheden en de introductie van inheemse fauna tot een minimum. Het volgende geformuleerde sediment is gebaseerd op het kunstmatige sediment overeenkomstig (6), (39) en (40). Het wordt aanbevolen voor gebruik in dit type test ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

(a) 4-5 % (drooggewicht) veenmosturf; het is belangrijk turf in poedervorm te gebruiken, mate van decompositie: „medium", fijngemalen (deeltjesgrootte ≤ 0,5 mm), en alleen aan de lucht gedroogd.

(b) 20 ± 1 % (drooggewicht) kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

(c) 75-76 % (drooggewicht) kwartszand (fijn zand; korrelgrootte: ≤ 2 mm, maar > 50 % van de deeltjes moet binnen het bereik 50-200 μm liggen).

(d) Gedeïoniseerd water, 30-50 % van het sediment (drooggewicht), naast de droge sedimentbestanddelen.

(e) Er wordt chemisch zuiver calciumcarbonaat ($CaCO_3$) toegevoegd om de pH van het uiteindelijke sedimentmengsel aan te passen.

(f) Het totale gehalte aan organische koolstof (TOC) van het uiteindelijke mengsel moet 2 % (± 0,5 %) van het drooggewicht van het sediment bedragen en moet worden aangepast door toevoeging van extra turf en zand overeenkomstig (a) en (c).

(g) Voedingsstoffen, bv. poedervormige bladeren van de grote brandnetel (Urtica sp., in overeenstemming met farmaceutische normen, voor menselijke consumptie), of een mengsel van poedervormige bladeren van Urtica sp. en alfacellulose (1: 1), bij 0,4-0,5 % sediment (drooggewicht), naast de droge sedimentbestanddelen; zie aanhangsel 4 voor gedetailleerde gegevens.

23. De bron van de turf, de kaolienklei, de voedingsstoffen en het zand moet bekend zijn. Behalve punt (g), noemt hoofdstuk C.27 van deze bijlage (6) andere plantmaterialen die als voedingsbron kunnen worden gebruikt: gedroogde bladeren van de witte moerbei (*Morus alba*), witte klaver (*Trifolium repens*), spinazie (*Spinacia oleracea*) of graan.

24. De gekozen voedingsbron moet worden toegevoegd vóór of tijdens de verrijking van het sediment met de teststof. De gekozen voedingsbron moet ten minste acceptabele voortplantingsresultaten in de controles mogelijk maken. Analyse van het kunstmatige sediment of de bestanddelen ervan op microverontreinigingen vóór gebruik kan in dit verband nuttige informatie opleveren. In aanhangsel 4 wordt een voorbeeld gegeven van de bereiding van kunstmatig sediment. Menging van droge bestanddelen is ook aanvaardbaar, mits wordt aangetoond dat na toevoeging van het bovenstaande water geen scheiding van de bestanddelen van het sediment plaatsvindt (bv. drijvende turfdeeltjes) en dat de turf of het sediment voldoende geconditioneerd is (zie ook punt 25 en aanhangsel 4). Het kunstmatige sediment moet worden gekarakteriseerd met ten minste de oorsprong van de bestanddelen, de deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei), het totale gehalte aan organische koolstof (TOC), het watergehalte en de pH. Meting van het redoxpotentieel is facultatief.

25. Indien nodig, bv. voor specifieke testdoeleinden, kunnen natuurlijke sedimenten van niet-verontreinigde terreinen ook als test- en/of kweeksediment dienen (3). Als echter natuurlijk sediment wordt gebruikt, moet dit worden gekarakteriseerd met ten minste de oorsprong (plaats van verzamelen), de pH en het ammoniakgehalte van het poriënwater, totaal gehalte aan organische koolstof

▼M6

(TOC) en gehalte aan stikstof, deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei) en procentueel watergehalte (7), en moet het vrij zijn van verontreinigingen en andere organismen die de testorganismen zouden kunnen beconcurreren of consumeren. Meting van het redoxpotentieel en het kationenuitwisselingsvermogen is facultatief. Ook wordt aanbevolen het natuurlijke sediment, voordat het wordt verrijkt met de teststof, zeven dagen te laten rusten onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen. Aan het eind van deze conditioneringsperiode moet het bovenstaande water worden verwijderd en weggegooid.

26. Het te gebruiken sediment moet van zodanige kwaliteit zijn dat de controleorganismen daarin gedurende de blootstelling kunnen overleven en zich kunnen voortplanten zonder een abnormaal aspect of gedrag te gaan vertonen. De controlewormen moeten zich in het sediment ingraven en sediment opnemen. De voortplanting in de controles dient ten minste te voldoen aan het in punt 13 beschreven geldigheidscriterium. De aan- of afwezigheid van fecaal materiaal op het sedimentoppervlak, die duiden op opname van sediment door de wormen, moet worden genoteerd en kan nuttige informatie zijn voor de interpretatie van de testresultaten voor wat betreft de blootstellingsroutes. Aanvullende informatie over opname van sediment kan worden verkregen door de methoden te gebruiken als beschreven in (24), (25), (44) en (45), die sedimentopname of deeltjesselectie in de testorganismen specificeren.

27. Manipulatieprocedures voor natuurlijke sedimenten vóór het gebruik ervan in het laboratorium zijn beschreven in (3), (7) en (12). In aanhangsel 4 wordt een beschrijving gegeven van de bereiding en bewaring van het kunstmatig sediment waarvan het gebruik in de *Lumbriculus*-test wordt aanbevolen.

Het aanbrengen van de teststof

28. Het sediment moet worden verrijkt met de teststof. Omdat van de meeste teststoffen wordt verwacht dat ze slecht in water oplosbaar zijn, moeten ze worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bv. aceton, n-hexaan of cyclohexaan) om de stamoplossing te bereiden. De stamoplossing moet met hetzelfde oplosmiddel worden verdund om de testoplossingen te bereiden. De toxiciteit en vluchtigheid van het oplosmiddel alsmede de oplosbaarheid van de teststof in het gekozen oplosmiddel moeten de voornaamste criteria zijn op basis waarvan een geschikte solubilisator wordt gekozen. Voor elk concentratieniveau moet hetzelfde volume van de corresponderende oplossing worden gebruikt. Om de variabiliteit tussen replicaten van de teststofconcentratie tot een minimum te beperken, moet het sediment voor elk concentratieniveau in bulk worden verrijkt. Elk van deze testoplossingen wordt vervolgens gemengd met kwartszand als beschreven in punt 22 (bv. 10 g kwartszand per testvat). Een volume van 0,20 tot 0,25 ml per g zand is voldoende gebleken om het kwartszand volledig te doordrenken. Daarna moet het oplosmiddel worden verdampt tot het kwartszand droog is. Om verliezen van de teststof door gelijktijdige verdamping (bv. afhankelijk van de dampspanning van de stof) tot een minimum te beperken, moet het gecoate zand onmiddellijk na droging worden gebruikt. Vervolgens wordt het droge zand gemengd met een geschikte hoeveelheid geformuleerd sediment van het corresponderende concentratieniveau. Bij de bereiding van het sediment moet rekening worden gehouden met de hoeveelheid zand die in het mengsel van teststof en zand aanwezig is (het sediment wordt dus met minder zand bereid). Het grote voordeel van deze procedure is dat vrijwel geen oplosmiddel in het sediment terechtkomt (7). Als alternatief, bv. voor veldsediment, kan de teststof worden toegevoegd door een gedroogd en fijngemalen deel van het sediment te verrijken op de wijze zoals hierboven voor kwartszand is beschreven, of door de teststof door het vochtige sediment te roeren, met daarna verdamping indien een solubilisator is gebruikt. De aan het sediment toegevoegde teststof moet zorgvuldig en gelijkmatig over het sediment worden verdeeld. Zo nodig kunnen deelmonsters worden geanalyseerd om de doelconcentraties in het sediment te bevestigen en de homogeniteit te bepalen. Het kan ook nuttig zijn om deelmonsters van de testoplossingen te analyseren om de doelconcentraties in het sediment te bevestigen. Aangezien een oplosmiddel

▼M6

wordt gebruikt om de teststof op het kwartszand te coaten, moet een oplosmiddelcontrole worden ingezet die met dezelfde hoeveelheid oplosmiddel is bereid als de testsedimenten. De verrijkingsmethode en de redenen voor het kiezen van een specifieke verrijkingsprocedure anders dan de hierboven beschreven procedure moeten worden gerapporteerd. De verrijkingsmethode kan worden aangepast aan de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof, bv. om verdampingsverliezen tijdens de verrijking of equilibratie te vermijden. Aanvullende richtsnoeren voor verrijkingsprocedures worden gegeven in Environment Canada (1995) (46).

29. Nadat het verrijkte sediment is bereid, in de replicaattestvaten is gebracht en is overgoten met het testwater, is het wenselijk de teststof zich vanuit het sediment te laten verspreiden naar de waterfase (bv. (3)(7)(9)). Dit moet bij voorkeur gebeuren onder de in de test heersende temperatuur- en beluchtingsomstandigheden. De tijd die nodig is voor equilibratie, hangt af van het sediment en de stoffen en kan variëren van enkele uren tot verscheidene dagen en soms zelfs weken (4-5 weken) (bv. (27)(47)). In deze test wordt niet gewacht tot een evenwicht is ontstaan, maar wordt een equilibratieperiode van 48 uur tot 7 dagen aanbevolen. De tijd voor afbraak van de teststof wordt dus tot een minimum beperkt. Afhankelijk van het doel van de studie, bijvoorbeeld wanneer milieuomstandigheden moeten worden nagebootst, kan het verrijkte sediment gedurende een langere periode geëquilibreerd of „gerijpt” worden.

30. Aan het eind van deze nadere equilibratieperiode worden in het bovenstaande water en het bulksediment, bij ten minste de hoogste en een lagere concentratie, monsters genomen om de concentratie van de teststof te bepalen. Op basis van deze analysen van de teststof zou de massabalans moeten kunnen worden berekend en zouden de resultaten als gemeten beginconcentraties moeten kunnen worden uitgedrukt. In het algemeen verstoort of vernietigt monstername het sediment/watersysteem. Het is daardoor doorgaans niet mogelijk om dezelfde replicaten te gebruiken voor monstername van sediment en wormen. Er moeten extra „analytische” vaten van geschikte grootte worden opgezet die op dezelfde wijze worden behandeld (inclusief toevoeging van testorganismen), maar niet voor biologische waarnemingen worden gebruikt. De grootte van de vaten moet zo worden gekozen dat monsters van de door de analytische methode vereiste omvang kunnen worden genomen. Gedetailleerde informatie over de monstername is beschreven in punt 53.

UITVOERING VAN DE TEST

Inleidende test

31. Als er geen informatie beschikbaar is over het toxisch effect van de teststof op *Lumbriculus variegatus*, kan het nuttig zijn een inleidend experiment uit te voeren om het bereik van concentraties te bepalen dat in de definitieve test moet worden getest, en om de testomstandigheden van de definitieve test te optimaliseren. Daarvoor wordt een reeks sterk gespreide concentraties van de teststof gebruikt. De wormen worden aan elke concentratie van de teststof blootgesteld gedurende een periode (bv. 28 dagen zoals in de definitieve test) die een schatting van de wenselijke testconcentraties mogelijk maakt, en er zijn geen replicaten vereist. Het gedrag van de wormen, bijvoorbeeld vermijding van sediment, dat door de teststof en/of het sediment kan worden veroorzaakt, moet in een inleidende test worden geobserveerd en geregistreerd. Concentraties hoger dan 1 000 mg/kg sediment (drooggewicht) hoeven in de inleidende test niet te worden getest.

Definitieve test

32. In de definitieve test moeten ten minste vijf concentraties worden gebruikt en geselecteerd op basis van bv. de resultaten van de inleidende bereikbepalingstest (punt 31), zoals beschreven in de punten 35 tot en met 38.

▼M6

33. Naast de testreeks wordt ook een controle (zie de punten 36, 37 en 38 voor replicatie) met daarin alle bestanddelen, behalve de teststof, uitgevoerd. Indien voor het aanbrengen van de teststof een solubilisator wordt gebruikt, mag deze geen significante effecten op de testorganismen hebben, hetgeen moet blijken uit een extra controlegroep met uitsluitend oplosmiddel.

Testopzet

34. De testopzet betreft het aantal testconcentraties en de factor waarmee ze van elkaar verschillen, het aantal vaten per concentratieniveau en het aantal toegevoegde wormen per vat. In de punten 35 tot en met 38 wordt een beschrijving gegeven van testopzetten voor de schatting van de EC_x, de schatting van de NOEC en de uitvoering van een limiettest.

35. De in de test gebruikte concentraties moeten de effectconcentratie (bv. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is, omvatten. Extrapolaties ver onder de laagste concentratie die van invloed is op de testorganismen, of boven de hoogste geteste concentratie moeten worden vermeden. Als, in uitzonderlijke gevallen, een dergelijke extrapolatie toch wordt uitgevoerd, moet in het testverslag een volledige toelichting worden gegeven.

36. Als een EC_x moet worden geschat, worden ten minste vijf concentraties getest met ten minste drie replicaten; voor de controle of — indien gebruikt — de oplosmiddelcontrole wordt zes replicaten aanbevolen, teneinde de schatting van de variabiliteit van de controle te verbeteren. In alle gevallen is het raadzaam bij voldoende concentraties te testen om een goede modelschatting mogelijk te maken. Het verschil tussen de concentraties mag niet meer dan een factor 2 bedragen (als de concentratie-responscurve een geringe helling vertoont, kan hiervan eventueel worden afgeweken). Het aantal replicaten voor elke testgroep kan worden verlaagd wanneer het aantal testconcentraties met een respons in het bereik van 5 - 95 % wordt verhoogd. Als het aantal replicaten wordt verhoogd of de intervallen tussen de testconcentraties worden verkleind, worden de betrouwbaarheidsintervallen van de test gewoonlijk kleiner.

37. Als de LOEC-/NOEC moeten worden geschat, worden ten minste vijf concentraties getest met ten minste vier replicaten (voor de controle of — indien gebruikt — de oplosmiddelcontrole wordt zes replicaten aanbevolen om de schatting van de variabiliteit van de controle te verbeteren) en mag het verschil tussen de concentraties niet meer dan een factor 2 bedragen. In aanhangsel 6 wordt informatie gegeven over het statistisch onderscheidingsvermogen bij het toetsen van hypothesen in de ringtest van de testmethode.

38. Er kan een limiettest worden uitgevoerd (één testconcentratie en controlegroep) als geen effecten worden verwacht tot 1 000 mg/kg sediment (drooggewicht) (bv. uit een inleidende bereikbepalingstest), of als het testen van één enkele concentratie voldoende zal zijn om een NOEC-waarde van belang te bepalen. In het laatste geval dient in het testverslag een gedetailleerde onderbouwing van de gekozen limietconcentratie te worden opgenomen. Deze limiettest wordt uitgevoerd bij een concentratie die voldoende hoog is om de besluitvormers in staat te stellen mogelijke toxische effecten van de stof uit te sluiten; deze concentratie wordt vastgesteld op een niveau dat zich naar verwachting in geen enkele situatie zal voordoen. Een concentratie van 1 000 mg/kg (drooggewicht) wordt aanbevolen. Gewoonlijk zijn ten minste zes replicaten voor zowel de testgroep als de controlegroepen nodig. In aanhangsel 6 wordt informatie gegeven over het statistisch onderscheidingsvermogen bij het toetsen van hypothesen in de ringtest van de testmethode.

Blootstellingsomstandigheden

Testorganismen

39. De test wordt uitgevoerd met ten minste 10 wormen voor elk replicaat dat voor de bepaling van biologische parameters wordt gebruikt. Dit aantal wormen komt overeen met ongeveer 50-100 mg natte biomassa. Uitgaande van een drogestofgehalte van 17,1 % (48), levert dit ongeveer 9-17 mg droge biomassa per vat op. U.S. EPA (2000 (7)) beveelt aan een dichtheid

▼M6

te gebruiken van niet meer dan 1: 50 (droge biomassa: TOC). Voor het geformuleerde sediment als beschreven in punt 22 komt dit overeen met ongeveer 43 g sediment (drooggewicht) per 10 wormen bij een TOC-gehalte van 2,0 % van het droog sediment. Indien meer dan 10 wormen per vat worden gebruikt, moeten de hoeveelheden sediment en bovenstaand water dienovereenkomstig worden aangepast.

40. De wormen die in een test worden gebruikt, moeten alle van dezelfde bron afkomstig zijn en moeten dieren in een vergelijkbare fysiologische toestand zijn (zie aanhangsel 5). Er moeten wormen van vergelijkbare grootte worden geselecteerd (zie punt 39). Het verdient aanbeveling vóór de test een steekproef uit de batch of het wormenbestand te wegen om een schatting van het gemiddelde gewicht te verkrijgen.

41. De in een test te gebruiken wormen worden uit de cultuur verwijderd (zie aanhangsel 5 voor details). Grote (volwassen) dieren die geen tekenen van recente fragmentatie vertonen, worden overgebracht naar glazen schalen (bv. petrischalen) met schoon water. Ze worden vervolgens gesynchroniseerd als beschreven in aanhangsel 5. Na een regeneratieperiode van 10 tot 14 dagen moeten voor de test intacte, complete wormen van vergelijkbare grootte worden gebruikt die na een voorzichtige mechanische stimulus actief zwemmen of kruipen. Als de testomstandigheden verschillen van de cultuuromstandigheden (bv. qua temperatuur, lichtregime en bovenstaand water), moet een acclimatiseringsfase van bv. 24 uur bij hetzelfde temperatuur- en lichtregime en met hetzelfde bovenstaande water als in de test volstaan om de wormen aan de testomstandigheden te laten wennen. De geacclimatiseerde Oligochaetae worden willekeurig over de testvaten verdeeld.

Voeding

42. Omdat vóór (of tijdens) het aanbrengen van de teststof voedsel aan het sediment wordt toegevoegd, krijgen de wormen tijdens de test geen extra voedsel verstrekt.

Licht en temperatuur

43. De fotoperiode in de cultuur en de test duurt doorgaans 16 uur (3), (7). De lichtintensiteit moet laag gehouden worden (bv. 100-500 lx) om natuurlijke omstandigheden op het sedimentoppervlak na te bootsen, en moet ten minste één keer in de blootstellingsperiode worden gemeten. De temperatuur moet gedurende de gehele test 20 °C ± 2 °C zijn. Op een gegeven meetdatum mag het verschil in temperatuur tussen de testvaten niet groter zijn dan ± 1 °C. De testvaten moeten op gerandomiseerde wijze in de testincubator of in de testruimte worden geplaatst, bv. om bias in de voortplanting als gevolg van de plaats van een vat tot een minimum te beperken.

Beluchting

44. Het bovenstaande water van de testvaten moet voorzichtig worden belucht (bv. 2-4 bellen per seconde) via een pasteurpipet dat ongeveer 2 cm boven het sedimentoppervlak is geplaatst, om perturbatie van het sediment zo veel mogelijk te beperken. Er moet op worden gelet dat het gehalte aan opgeloste zuurstof niet lager wordt dan 30 % van de verzadigingswaarde van lucht. De luchttoevoer moet op werkdagen ten minste één keer per dag worden gecontroleerd en — indien nodig — worden aangepast.

Metingen van de waterkwaliteit

45. De volgende kwaliteitsparameters moeten in het bovenstaand water worden onderzocht:

Temperatuur:	één keer per week, alsook aan het begin en aan het eind van de blootstellingsperiode ten minste in één testvat van elk concentratieniveau en één testvat van de controles; indien mogelijk, kan ook de temperatuur in het omliggende medium (omgevingslucht of waterbad) worden geregistreerd, bv. om het uur;

▼M6

Gehalte opgeloste zuurstof:	één keer per week, alsook aan het begin en aan het eind van de blootstellingsperiode ten minste in één testvat van elk concentratieniveau en één testvat van de controles; uitgedrukt in mg/l en % verzadigingswaarde van lucht;
Luchttoevoer:	moet op werkdagen ten minste één keer per dag worden gecontroleerd en — indien nodig — worden aangepast;
pH:	één keer per week, alsook aan het begin en aan het eind van de blootstellingsperiode ten minste in één testvat van elk concentratieniveau en één testvat van de controles;
Totale hardheid van water:	ten minste in één replicaat van de controles en één testvat bij de hoogste concentratie aan het begin en aan het eind van de blootstellingsperiode; uitgedrukt in mg/l $CaCO_3$;
Totale ammoniakgehalte:	ten minste in één replicaat van de controles en één testvat bij elk concentratieniveau aan het begin en aan het eind van de blootstellingsperiode, en daarna drie keer per week; uitgedrukt in mg/l NH_4^+ of NH_3 of totaal ammoniak-N.

Als voor het meten van de parameters van de waterkwaliteit aanzienlijke watermonsters uit de vaten moeten worden genomen, kan het raadzaam zijn om aparte vaten voor de waterkwaliteitsmetingen op te zetten om de water/sediment-volumeverhouding niet te wijzigen.

Biologische waarnemingen

46. De testvaten moeten tijdens de blootstelling worden geobserveerd om visueel eventuele verschillen in gedrag tussen de wormen en de controles te beoordelen (bv. vermijden van sediment, zichtbare aanwezigheid van fecaal materiaal op het sedimentoppervlak). De waarnemingen moeten worden geregistreerd.

47. Aan het eind van de test wordt elk replicaat onderzocht (extra vaten ten behoeve van chemische analysen mogen van het onderzoek worden uitgesloten). Alle wormen moeten met een geschikte methode uit de testvaten worden verwijderd. Er dient op te worden gelet dat de wormen bij de verwijdering geen letsel oplopen. Een van de mogelijke methoden is de wormen uit het sediment te zeven. Daarvoor kan een roestvrij staalgaas met een gepaste maaswijdte worden gebruikt. Het grootste deel van het bovenstaand water wordt voorzichtig gedecanteerd, en het overblijvende sediment en water worden geschud zodat een suspensie wordt verkregen, die daarna door de zeef kan worden gegoten. Bij gebruik van een gaas met openingen van 500 μm zullen de meeste sedimentdeeltjes heel snel door de zeef stromen; het zeven moet echter snel gebeuren om te voorkomen dat de wormen in of door het gaas kruipen. Gebruik van een gaas met openingen van 250 μm verhindert dat de wormen in of door het gaas kruipen; er moet echter op worden gelet dat zo min mogelijk sedimentdeeltjes in het gaas achterblijven. De gezeefde suspensie van elk replicaatvat kan een tweede keer door de zeef worden gespoeld om te waarborgen dat alle wormen eruit worden gezeefd. Een alternatieve methode is het sediment te verwarmen door de testvaten in een waterbad van 50-60 °C te plaatsen; de wormen zullen het sediment verlaten en kunnen met een gevuurpolijst pipet met brede mond van het sedimentoppervlak worden verzameld. Een alternatief is een sedimentsuspensie te maken en deze suspensie op een ondiepe schaal van geschikte grootte te gieten. De wormen kunnen met een stalen naald of horlogemakerspincet (te gebruiken als een vork in plaats van als een pincet om beschadiging van de wormen te voorkomen) uit de ondiepe schaal met suspensie worden geschept en in schoon water worden overgebracht. Wanneer de wormen zijn gescheiden van de sedimentsuspensie, worden ze gespoeld in testmedium en geteld.

48. Onafhankelijk van de gebruikte methode, moeten laboratoria aantonen dat hun personeelsleden in staat zijn om gemiddeld ten minste 90 % van de

▼M6

organismen uit het hele sediment te halen. Er kan bijvoorbeeld een bepaald aantal testorganismen aan het controlesediment of de testsedimenten worden toegevoegd, waarna na 1 uur het recoverypercentage kan worden bepaald (7).

49. Het totale aantal levende en dode dieren per replicaat moet worden geregistreerd en beoordeeld. De volgende groepen wormen worden als dood beschouwd:

a) er is geen reactie na een voorzichtige mechanische stimulus

b) er zijn tekenen van ontbinding (in combinatie met „a")

c) het aantal wormen dat ontbreekt

Daarnaast kunnen de levende wormen in een van de volgende drie groepen worden ingedeeld:

a) grote complete wormen (volwassen dieren) zonder geregenereerde gebieden van het lichaam

b) complete wormen met geregenereerde, lichter gekleurde gebieden van het lichaam (d.w.z. met een nieuw achterste deel, met een nieuw voorste deel of met zowel een nieuw achterste als voorste deel)

c) incomplete wormen (d.w.z. onlangs gefragmenteerde wormen met niet geregenereerde gebieden van het lichaam)

Deze aanvullende waarnemingen zijn niet verplicht, maar kunnen worden gebruikt voor aanvullende interpretatie van de biologische resultaten (bijvoorbeeld, een hoog aantal wormen in groep c kan duiden op een vertraagde voortplanting of regeneratie in een bepaalde testgroep). Als verschillen in uiterlijk (bv. laesies van het integument, oedemateuze delen van het lichaam) worden waargenomen tussen behandelde wormen en controlewormen, moeten ook deze verschillen worden geregistreerd.

50. Onmiddellijk na de telling/beoordeling worden de levende wormen die in elk replicaat zijn aangetroffen, overgebracht naar droge, vooraf gewogen en gelabelde weegschalen (één per replicaat) en gedood met een druppel ethanol per schaal. De weegschalen worden een nacht lang in een droogoven bij 100 ± 5 °C geplaatst om te drogen, waarna ze in een droogkast worden geplaatst om af te koelen, worden gewogen en het drooggewicht van de wormen wordt bepaald (bij voorkeur in g met ten minste 4 cijfers achter de komma).

51. Behalve het totale drooggewicht, kan het asvrije drooggewicht worden bepaald als beschreven in (49) om rekening te houden met anorganische bestanddelen die afkomstig zijn van opgenomen sediment dat aanwezig is in het spijsverteringskanaal van de wormen.

52. De biomassa wordt bepaald als de totale biomassa per replicaat, inclusief volwassen en jonge wormen. Bij de bepaling van de biomassa per replicaat worden de dode wormen niet meegerekend.

Verificatie van de concentraties van de teststof

Monstername

53. Monsters voor de chemische analyse van de teststof moeten worden genomen bij ten minste de hoogste en een lagere concentratie, ten minste aan het eind van de equilibratieperiode (vóór toevoeging van de testorganismen) en aan het eind van de test. Voor de analyse moeten ten minste monsters worden genomen van het bulksediment en het bovenstaande water. Op elke monsternamedatum moeten per matrix en behandeling ten minste twee monsters worden genomen. Een van de twee monsters kan als reserve worden bewaard (bv. om te analyseren in geval het resultaat van de eerste analyse meer dan 20 % afwijkt van de nominale concentratie). In geval van specifieke chemische eigenschappen, bv. als een snelle afbraak van het

▼M6

testmateriaal wordt verwacht, kan het analyseschema op basis van het oordeel van deskundigen worden verfijnd (bv. frequentere monstername, analyse van meer concentratieniveaus). Er kunnen dan monsters worden genomen op tussenliggende dagen (bv. op dag zeven na het begin van de blootstelling).

54. Het bovenstaande water moet worden bemonsterd door het bovenstaande water voorzichtig te decanteren of af te hevelen, zodat de perturbatie van het sediment tot een minimum wordt beperkt. Het volume van de monsters moet worden geregistreerd.

55. Na de verwijdering van het bovenstaande water moet het sediment worden gehomogeniseerd en overgebracht in een geschikte houder. Het gewicht van het natte sedimentmonster wordt geregistreerd.

56. Als daarnaast de teststof in het poriënwater moet worden geanalyseerd, moeten de gehomogeniseerde en gewogen sedimentmonsters worden gecentrifugeerd om het poriënwater te verkrijgen. Ongeveer 200 ml nat sediment kan bijvoorbeeld worden overgebracht in centrifugebekers van 250 ml. Daarna moeten de monsters zonder filtering worden gecentrifugeerd om het poriënwater te isoleren, bv. bij 10 000 ± 600 × *g* gedurende 30 tot 60 minuten bij een temperatuur die de testtemperatuur niet overschrijdt. Na het centrifugeren wordt de bovenliggende vloeistof gedecanteerd of gepipetteerd, waarbij erop wordt gelet dat geen sedimentdeeltjes worden meegenomen, en wordt het volume geregistreerd. Het gewicht van het resterende sedimentmateriaal wordt geregistreerd. De massabalans of de recovery van de teststof in het water/sediment-systeem kan mogelijk gemakkelijker worden geschat als op elke monsternamedatum het drooggewicht van het sediment wordt bepaald. In sommige gevallen kan analyse van de concentraties in het poriewater onmogelijk zijn doordat het monster te klein is.

57. Wanneer de analyse niet onmiddellijk plaatsvindt, moeten alle monsters op passende wijze worden bewaard, bv. onder bewaaromstandigheden als aanbevolen voor een minimale afbraak van de specifieke teststof (milieumonsters worden bv. doorgaans bewaard in het donker bij – 18 °C). Verzamel vóór aanvang van het onderzoek informatie over de juiste bewaaromstandigheden voor de betreffende teststof (bv. bewaarduur en -temperatuur, extractieprocedures enz.).

Analysemethode

58. De gehele procedure wordt in feite bepaald door de nauwkeurigheid, precisie en gevoeligheid van de analytische methode die voor de teststof wordt gebruikt. Controleer daarom experimenteel dat de precisie en reproduceerbaarheid van de chemische analyse, alsook de recovery van de teststof uit water- en sedimentmonsters bij ten minste de laagste en hoogste testconcentratie bevredigend zijn voor de betreffende methode. Controleer ook dat de teststof in de controlekamers niet detecteerbaar is in hogere concentraties dan de bepaalbaarheidsgrens. Corrigeer, indien nodig, de nominale concentraties voor de recovery van verrijkte kwaliteitscontrolemonsters (bv. wanneer de recovery buiten het bereik van 80-120 % van de verrijkte hoeveelheid ligt). Hanteer alle monsters tijdens de gehele test zodanig dat verontreiniging en verlies (bv. als gevolg van adsorptie van de teststof aan het bemonsteringsapparaat) tot een minimum worden beperkt.

59. De recovery van de teststof, de bepaalbaarheidsgrens en de detectiegrens in sediment en water moeten worden geregistreerd en gerapporteerd.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

60. De belangrijkste verplichte responsvariabelen van de test die statistisch moeten worden geëvalueerd, zijn de biomassa en het totale aantal wormen per replicaat. Facultatief kunnen ook de voortplanting (toename van de aantallen wormen) en groei (toename van de droge biomassa) worden geëvalueerd. In dit geval moet een schatting van het drooggewicht van de wormen aan het begin van de blootstelling worden verkregen, bv. door meting van het drooggewicht van een representatief deelmonster van de batch gesynchroniseerde wormen die voor de test zal worden gebruikt.

▼M6

61. Hoewel mortaliteit geen eindpunt van deze test is, moeten de mortaliteiten toch zo veel mogelijk worden geëvalueerd. Om de mortaliteiten te schatten moeten de wormen die geen reactie vertonen op een voorzichtige mechanische stimulus, wormen die tekenen van ontbinding vertonen en de ontbrekende wormen als dood worden beschouwd. De mortaliteiten moeten ten minste worden geregistreerd en er moet rekening mee worden gehouden bij de interpretatie van de testresultaten.

62. Effectieve concentraties moeten worden uitgedrukt in mg/kg sediment (drooggewicht). Als de recovery van de teststof gemeten in het sediment, of in het sediment en het bovenstaande water aan het begin van de blootstelling, tussen 80 % en 120 % van de nominale concentraties ligt, mogen de effectieve concentraties (EC_x, NOEC, LOEC) worden uitgedrukt op basis van de nominale concentraties. Als de recovery van de nominale concentraties meer dan ± 20 % afwijkt van de nominale concentraties, moeten de effectieve concentraties (EC_x, NOEC, LOEC) worden gebaseerd op de aanvankelijk gemeten concentraties aan het begin van de blootstelling, bv. om rekening te houden met de massabalans van de teststof in het testsysteem (zie punt 30). In deze gevallen kan aanvullende informatie worden verkregen uit analyse van de stam- en/of aanbrengingsoplossingen om te bevestigen dat de testsedimenten juist werden bereid.

EC_x

63. EC_x-waarden voor de in punt 60 beschreven parameters worden berekend met behulp van passende statistische methoden (bv. probit-analyse, logistische of Weibull-functie, getrimde Spearman-Karber-methode of eenvoudige interpolatie). Zie (15) en (50) voor richtsnoeren voor de statistische evaluatie. Een EC_x wordt verkregen door de waarde die correspondeert met x % van het controlegemiddelde in de gevonden vergelijking in te vullen. Voor de berekening van de EC_{50} of een andere EC_x kunnen de gemiddelden ($\overline{X}$) per behandeling worden onderworpen aan een regressieanalyse.

NOEC/LOEC

64. Als het doel van een statistische analyse is de NOEC/LOEC te bepalen, zijn statistieken per vat noodzakelijk (individuele vaten worden als replicaten beschouwd). Er moeten geschikte statistische methoden worden gebruikt. In het algemeen worden schadelijke effecten van de teststof ten opzichte van de controle onderzocht met een toets voor een eenzijdige (kleinere) nulhypothese bij $p \leq 0{,}05$. In de onderstaande punten worden voorbeelden gegeven. Zie (15) en (50) voor richtsnoeren voor de keuze van geschikte statistische methoden.

65. Of gegevens normaal verdeeld zijn, kan worden getoetst met bv. de Kolmogorov-Smirnovtoets voor goodness-of-fit, de toets op het quotiënt van het bereik en de standaarddeviatie ('Range to standard deviation ratio'-toets) of de Shapiro-Wilk-toets, (tweezijdig, $p \leq 0{,}05$). De Cochran-toets, Levenetoets of Bartlett-toets (tweezijdig, $p \leq 0{,}05$) kunnen worden gebruikt om op homogeniteit van variantie te toetsen. Als aan de voorwaarden van parametrische toetsprocedures (normaliteit, homogeniteit van variantie) is voldaan, kunnen een éénwegs variantieanalyse (ANOVA, One-way Analysis of Variance) en daaropvolgende toetsen voor meervoudige vergelijkingen worden uitgevoerd. Paarsgewijze vergelijkingen (bv. t-toets van Dunnett) of stap-omlaag-trendtoetsen (bv. Williams-toets) kunnen worden gebruikt om na te gaan of er significante verschillen ($p \leq 0{,}05$) zijn tussen de controles en de verschillende concentraties van de teststof. Anders moeten verdelingsvrije toetsen (bv. Bonferroni-toets volgens Holm of de Jonckheere-Terpstra-trendtoets) worden gebruikt om de NOEC en LOEC te bepalen.

Limiettest

66. Als een limiettest (vergelijking van de controle en slechts één behandeling) is uitgevoerd en er is voldaan aan de voorwaarden van parametrische toetsprocedures (normaliteit, homogeniteit), kunnen metrische responsen (totaal aantal wormen, en de biomassa als drooggewicht wormen) worden geëvalueerd met de t-toets. Als niet aan die voorwaarden wordt voldaan, kan de t-toets voor ongelijke varianties (Welch-toets) of een verdelingsvrije toets, zoals de Mann-Whitney-toets, worden gebruikt. In aanhangsel 6 wordt informatie gegeven over het statistisch onderscheidingsvermogen bij het toetsen van hypothesen in de ringtest van de methode.

▼M6

67. Om significante verschillen tussen de controles (controle en oplosmiddelcontrole) vast te stellen, kunnen de replicaten van de beide controles worden getoetst als beschreven voor de limiettest. Als uit deze toetsen geen significante verschillen naar voren komen, mogen alle replicaten van de controle en oplosmiddelcontrole worden gepoold. Anders dienen alle behandelingen te worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole.

Interpretatie van de resultaten

68. De resultaten moeten voorzichtig worden geïnterpreteerd als van deze testmethode is afgeweken, of als testconcentraties zijn gemeten die dicht bij de detectiegrens van de gebruikte analytische methode liggen. Alle afwijkingen van deze testmethode moeten worden genoteerd.

Testverslag

69. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

— *Teststof:*

— identificatiegegevens van de stof (triviale naam, chemische naam, structuurformule, CAS-nummer enz.) met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van de teststof; oorsprong van de teststof en, in voorkomend geval, identiteit en concentratie van het gebruikte oplosmiddel.

— alle beschikbare informatie over de fysische toestand en fysisch-chemische kenmerken als verkregen vóór het begin van de test (bv. oplosbaarheid in water, dampspanning, verdelingscoëfficiënt in de bodem (of in sediment, indien beschikbaar), log K_{ow}, stabiliteit in water enz.);

— *Diersoort:*

— wetenschappelijke naam, oorsprong, eventuele voorafgaande behandeling, acclimatisatie, kweekomstandigheden enz.

— *Testomstandigheden:*

— gebruikte testprocedure (bv. statisch, semistatisch of doorstroom);

— testopzet (bv. aantal, materiaal en grootte van de testbakken, watervolume per vat, sedimentmassa en -volume per vat, (voor doorstroom- of semistatische procedures: verversingssnelheid van het water), gebruikte beluchting vóór en tijdens de test, aantal replicaten, aantal wormen per replicaat bij begin van de blootstelling, aantal testconcentraties, duur van de conditionerings-, equilibratie- en blootstellingsperioden, frequentie van de bemonstering);

— dikte van de sedimentlaag en diepte van het bovenliggende water;

— methode van voorafgaande behandeling en verrijking/aanbrenging van teststof;

— de nominale testconcentraties, details over de bemonstering voor chemische analyse, en de analytische methoden waarmee concentraties van de teststof zijn verkregen;

— kenmerken van het sediment als beschreven in de punten 24 en 25, en alle andere metingen die zijn verricht; bereiding van het geformuleerde sediment;

— bereiding van het testwater (bij gebruik van synthetisch water) en eigenschappen (zuurstofgehalte, pH, geleidbaarheid, hardheid en alle andere metingen die zijn verricht) vóór het begin van de test;

— details over het voedsel, met inbegrip van soort voedsel, bereiding, hoeveelheid en voederregime;

▼**M6**

— lichtintensiteit en fotoperiode(n);

— de gebruikte methoden voor de bepaling van alle biologische parameters (bv. monstername, inspectie, weging van testorganismen) en alle abiotische parameters (bv. kwaliteitsparameters voor water en sediment);

— volumes en/of gewichten van alle monsters voor chemische analyse;

— gedetailleerde informatie over de verwerking van alle monsters voor chemische analyse, met inbegrip van details van de bereiding, bewaring, verrijkingsprocedures, extractie en analyseprocedures (en -precisie) voor de teststof, en de recovery van de teststof.

— *Resultaten:*

— kwaliteit van het water in de testvaten (pH, temperatuur, gehalte opgeloste zuurstof, hardheid, ammoniakgehaltes en alle andere metingen die zijn verricht);

— totaal gehalte organische koolstof (TOC), de verhouding tussen drooggewicht en natgewicht, pH van het sediment en alle andere metingen die zijn verricht;

— het totale aantal wormen en, indien bepaald, het aantal complete en incomplete wormen in elke testbak aan het eind van de test;

— drooggewicht van de wormen in elke testbak aan het eind van de test en, indien bepaald, drooggewicht van een deelmonster van de wormen aan het eind van de test;

— alle waargenomen abnormale gedragingen in vergelijking met de controles (bv. vermijding van sediment, aanwezigheid of afwezigheid van fecaal materiaal);

— alle waargenomen mortaliteiten;

— schattingen van toxische eindpunten (bv. EC_x, NOEC en/of LOEC), en de statistische methoden waarmee zij zijn bepaald;

— de nominale testconcentraties, de gemeten testconcentraties en de resultaten van alle analysen die zijn verricht om de concentratie van de teststof in de testvaten te bepalen;

— alle afwijkingen van de geldigheidscriteria.

— *Evaluatie van de resultaten:*

— overeenstemming van de resultaten met de in punt 13 vermelde geldigheidscriteria;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van een eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR

(1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. & 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.

(6) Hoofdstuk C.27 van deze bijlage, „Test ter bepaling van de toxiciteit voor chironomiden in sedimenten en water m.b.v. verrijkt sediment".

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, 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., Heimbach, F. (eds), 1993. Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments. From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & 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. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä A., Halme A., 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., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. blz. 205-215. In: J.C. Eaton, P.R. Parrish, & A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼M6

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & 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. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Verplicht Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & 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 & 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. & Winger, P.V. (1995). 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. & 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. & 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. & 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., & 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. & 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. & 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. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & 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 & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, blz. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼M6

(33) Leppänen M.T. & 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. & 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. & 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) Hoofdstuk C.1 van deze bijlage, Acute toxiciteitstest voor vissen.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Parijs.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel & 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. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. & Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. & C. Rodrigues. (1995). 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. & 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. & 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. & 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. & 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) OESO, 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & 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. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. blz. 107-119.

Aanvullende literatuur over statistische procedures:

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. (1978). (1971). Probit Analysis (3rd ed.), blz. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D. J. (1978). (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo & R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correctie: 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. & F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. 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. & 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

Aanhangsel 1

Definities

Voor de toepassing van deze testmethode worden de volgende definities gehanteerd:

Stof betekent een substantie of mengsel.

De **conditioneringsperiode** wordt gebruikt om het microbiële deel van het sediment te stabiliseren en bv. ammoniak afkomstig van sedimentbestanddelen te verwijderen; deze conditionering vindt plaats voordat het sediment wordt verrijkt met de teststof. Gewoonlijk wordt het bovenstaande water na de conditionering weggegooid.

De $\mathbf{EC_x}$ is de concentratie van de teststof in het sediment die binnen een bepaalde blootstellingsperiode leidt tot een effect op een biologische parameter van x % (bv. 50 %).

De **equilibratieperiode** wordt gebruikt om de teststof zich over de vaste fase, het poriënwater en het bovenstaande water te laten verspreiden; deze equilibratie vindt plaats nadat het sediment met de teststof is verrijkt en voordat de testorganismen worden toegevoegd.

De **blootstellingsfase** is de periode gedurende welke de testorganismen aan de teststof worden blootgesteld.

„kunstmatig sediment" (ook wel bereid, gereconstitueerd of synthetisch sediment genoemd): een mengsel van materialen waarmee de fysische bestanddelen van natuurlijk sediment worden nagebootst;

De **Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)** is de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een significant toxisch effect ($p \leq 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een effect hebben dat ten minste gelijk is aan het bij de LOEC waargenomen effect. Wanneer niet aan deze twee voorwaarden kan worden voldaan, moet een volledige toelichting worden gegeven op de wijze waarop de LOEC (en dus de NOEC) is bepaald.

De **No Observed Effect Concentration (NOEC)** is de testconcentratie direct onder de LOEC die, in vergelijking met de controle, geen statistisch significant effect heeft ($p \leq 0,05$) binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

De **octanol/water-verdelingscoëfficiënt** (K_{ow}; soms ook aangeduid als P_{ow}) is de verhouding tussen de oplosbaarheid van een stof in n-octanol en water bij evenwicht en geeft de lipofiliciteit van een stof weer (hoofdstuk A.24 van deze bijlage). K_{ow} of de logaritme van K_{ow} (log K_{ow}) wordt gebruikt als een indicatie van het bioaccumulatiepotentieel van een chemische stof door in het water levende organismen.

De **organischekoolstof/water-verdelingscoëfficiënt** (K_{oc}) is de verhouding tussen de concentratie van een stof in of op de fractie organische koolstof van een sediment en de concentratie van die stof in water in een toestand van evenwicht.

Bovenstaand water is het water dat in het testvat op het sediment staat.

Poriënwater, ook wel interstitieel water genoemd, is het water in de ruimten tussen de sediment- of bodemdeeltjes.

Verrijkt sediment is sediment waaraan teststof is toegevoegd.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼**M6**

Aanhangsel 2

Samenstelling van het aanbevolen synthetisch water

(gebaseerd op hoofdstuk C.1 van deze bijlage (1))

(a) *Calciumchlorideoplossing*

Los 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

(b) *magnesiumsulfaatoplossing*

Los 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

(c) *Natriumbicarbonaatoplossing*

Los 2,59 g $NaHCO_3$ op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

(d) *Kaliumchlorideoplossing*

Los 0,23 g KCl op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het geleidend vermogen van het gedestilleerde of gedeïoniseerde water mag niet groter zijn dan 10 $\mu S\ cm^{-1}$.

25 ml van elk van de oplossingen (a) tot en met (d) wordt gemengd en het totale volume wordt met gedeïoniseerd water aangevuld tot 1 l. Het totaal van de calcium- en magnesiumionen in deze oplossingen is 2,5 mmol/l.

De verhouding van Ca-ionen:Mg-ionen is 4:1 en die van Na-ionen:K-ionen 10:1. Het zuurbindend vermogen $K_{S4.3}$ van deze oplossing is 0,8 mmol/l.

Belucht het oplossingswater tot het is verzadigd met zuurstof, en bewaar het oplossingswater daarna zonder verdere beluchting gedurende ongeveer twee dagen tot gebruik.

REFERENTIE

(1) Hoofdstuk C.1 van deze bijlage, Acute toxiciteitstest voor vissen.

▼**M6**

Aanhangsel 3

Fysisch-chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater

Onderdeel	Concentraties
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 µg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchloorgehalte	< 10 µg/l
Totaal organofosforpesticiden	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l
(overgenomen uit OECD (1992) (1))	

REFERENTIE

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Parijs.

▼M6

Aanhangsel 4

Aanbevolen kunstmatig sediment — aanbevelingen voor de voorbereiding en opslag

Bestanddelen van sediment

Bestanddeel	Kenmerken	% van het sediment (drooggewicht)
Turf	Veenmosturf, mate van decompositie: „medium", aan de lucht gedroogd, geen zichtbare plantenresten, fijngemalen (deeltjesgrootte≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kwartszand	Korrelgrootte: ≤ 2 mm, maar > 50 % van de deeltjes moet binnen het bereik 50-200 µm liggen	75 - 76
Kaolienklei	Gehalte aan kaoliniet ≥ 30 %	20 ± 1
Voedselbron	bv. Urtica-poeder (Folia urticae), bladeren van Urtica dioica (grote brandnetel), fijngemalen (deeltjesgrootte ≤ 0,5 mm); in overeenstemming met farmaceutische normen, voor menselijke consumptie; naast droog sediment	0,4 - 0,5 %
Organische koolstof	Aangepast door toevoeging van turf en zand	2 ± 0,5
Calciumcarbonaat	$CaCO_3$, verpulverd, chemisch zuiver, naast droog sediment	0,05 - 1
Gedeïoniseerd water	Geleidend vermogen ≤ 10 µS/cm,, naast droog sediment	30 - 50

Noot: Als verhoogde ammoniakconcentraties worden verwacht, bv. als bekend is dat de teststof de nitrificatie remt, kan het nuttig zijn om 50 % van het stikstofrijke urtica-poeder te vervangen door cellulose (bv. α-cellulosepoeder, chemisch zuiver, deeltjesgrootte ≤ 0,5 mm; (1) (2)).

Voorbereiding

De turf wordt aan de lucht gedroogd en tot een fijn poeder vermalen. Er wordt een suspensie van de vereiste hoeveelheid turfpoeder in gedeïoniseerd water bereid met een kwalitatief hoogwaardig homogeniseerapparaat. De pH van deze suspensie wordt aangepast tot 5,5 ± 0,5 met $CaCO_3$. De suspensie wordt ten minste twee dagen lang onder zachtjes roeren bij 20 ± 2 °C geconditioneerd om de pH te stabiliseren en een stabiele microbiële component te verkrijgen. De pH wordt opnieuw gemeten en moet nu 6,0 ± 0,5 bedragen. Vervolgens wordt de turfsuspensie met de andere bestanddelen (zand en kaolienklei) en gedeïoniseerd water vermengd om een homogeen sediment te verkrijgen met een watergehalte van 30-50 % van het drooggewicht van het sediment. De pH van het uiteindelijke mengsel wordt nogmaals gemeten en zo nodig met $CaCO_3$ tot 6,5-7,5 aangepast. Als een verhoogde ammoniakontwikkeling wordt verwacht, kan het echter nuttig zijn de pH van het sediment onder 7 (bv. tussen 6,0 en 6,5) te houden. Er worden monsters van het sediment genomen om het drooggewicht en het gehalte aan organische koolstof te bepalen. Als een verhoogde ammoniakontwikkeling wordt verwacht, kan het kunstmatige sediment zeven dagen worden geconditioneerd onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen (bv. sediment/water-verhouding 1: 4, dikte van de sedimentlaag als in de testvaten),

▼M6

voordat het wordt verrijkt met de teststof, d.w.z. het moet worden overgoten met water, dat moet worden belucht. Aan het eind van de conditioneringsperiode moet het bovenstaande water worden verwijderd en weggegooid. Daarna wordt het verrijkte kwartszand gemengd met het sediment voor elk behandelingsniveau, wordt het sediment over de replicaattestvaten verdeeld en overgoten met het testwater. De vaten worden daarna geïncubeerd onder dezelfde omstandigheden die ook in de test heersen. Hier begint de equilibratieperiode. Het bovenstaande water moet worden belucht.

De gekozen voedingsbron moet worden toegevoegd vóór of tijdens de verrijking van het sediment met de teststof. Het voedsel kan in eerste instantie door de turfoplossing worden gemengd (zie hierboven). Overmatige achteruitgang van de voedselbron vóór de toevoeging van de testorganismen — bv. in geval van een lange equilibratieperiode — kan echter worden voorkomen door de tijdsperiode tussen de toevoeging van het voedsel en het begin van de blootstelling zo kort mogelijk te houden. Om te waarborgen dat het voedsel met de teststof wordt verrijkt, moet de voedselbron uiterlijk op de dag waarop het sediment wordt verrijkt met de teststof, door het sediment worden gemengd.

Opslag

De droge bestanddelen van het kunstmatige sediment kunnen op een droge en koele plaats bij kamertemperatuur worden bewaard. Het bereide, met de teststof verrijkte sediment moet onmiddellijk in de test worden gebruikt. Monsters van verrijkt sediment kunnen tot de analyse onder de voor de desbetreffende teststof aanbevolen omstandigheden worden bewaard.

LITERATUUR

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & 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. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. blz. 107-119.

▼M6

Aanhangsel 5

Kweekmethoden voor Lumbriculus variegatus

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta is een bewoner van zoetwatersedimenten en wordt veel gebruikt in ecotoxicologische tests. Hij is gemakkelijk onder laboratoriumomstandigheden te kweken. Hieronder wordt een kort overzicht van de kweekmethoden gegeven.

Kweekmethoden

De kweekomstandigheden voor *Lumbriculus variegatus* zijn in detail beschreven in Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Hieronder wordt een korte samenvatting van deze omstandigheden gegeven. Een groot voordeel van *L. variegatus* is zijn snelle voortplanting, die leidt tot snel toenemende biomassa in populaties die in het laboratorium worden gekweekt (bv. (1), (3), (4), (5)).

De wormen kunnen worden gekweekt in grote aquaria (57-80 l) bij 23 °C met een 16 L:8 D fotoperiode (100-1 000 lx) en met natuurlijk water dat elke dag wordt ververst (45-50 l per aquarium). Het substraat wordt bereid door ongebleekte bruine papieren handdoeken in repen te knippen en deze enkele seconden te mengen met kweekwater, zodat kleine stukjes papiersubstraat ontstaan. Dit substraat kan direct in de kweekaquaria voor *Lumbriculus* worden gebruikt door de bodem van de bak ermee te bedekken, of het kan in gedeïoniseerd water worden ingevroren voor later gebruik. Nieuw substraat in de bak zal doorgaans een houdbaarheid van ongeveer twee maanden hebben.

Elke wormcultuur wordt begonnen met 500 tot 1 000 wormen en wordt 3 keer per week onder verversings- of doorstroomomstandigheden gevoed met een 10 ml-suspensie met 6 g startvoer voor forellen. Statische of semistatische culturen moeten een lagere dosering voer krijgen om bacterie- en schimmelgroei te voorkomen. .

Onder deze omstandigheden verdubbelt het aantal dieren in de cultuur doorgaans in ongeveer 10 tot 14 dagen.

Als alternatief kan *Lumbriculus variegatus* ook worden gekweekt in een systeem bestaande uit een laag kwartszand zoals gebruikt voor het kunstmatig sediment (1-2 cm dik), en synthetisch water. Als kweekvaten kunnen glazen of roestvrijstalen bakken met een hoogte van 12 tot 20 cm worden gebruikt. Het water moet voorzichtig worden belucht (bv. 2 bellen per seconde) via een pasteurpipet dat ongeveer 2 cm boven het sedimentoppervlak is geplaatst. Om ophoping van bv. ammoniak te voorkomen, moet het bovenstaande water worden ververst, hetzij via een doorstroomsysteem of, ten minste één keer per week, handmatig. De Oligochaetae kunnen worden gehouden bij kamertemperatuur met een fotoperiode van 16 uur licht (intensiteit 100 tot 1 000 lx) en 8 uur donker. In de semistatische kweek (waterverversing één keer per week) worden de wormen twee keer per week gevoerd met TetraMin (bv. 0,6-0,8 mg per cm^2 sedimentoppervlak), dat kan worden toegediend als een suspensie van 50 mg TetraMin per ml gedeïoniseerd water.

Lumbriculus variegatus kan uit de culturen worden verwijderd door bv. substraat met fijnmazig gaas, of organismen met een gevuurpolijste glazen pipet met brede mond (diameter van ongeveer 5 mm) naar een aparte beker over te brengen. Als er ook substraat naar deze beker wordt overgebracht, moet de beker met daarin de wormen en het substraat een nacht onder doorstroomomstandigheden rusten, waardoor het substraat uit de beker zal verdwijnen, terwijl de wormen op de bodem van de beker zullen achterblijven. De wormen kunnen daarna in nieuw voorbereide kweekbakken worden geplaatst of voor de test verder worden verwerkt zoals uiteengezet in (3) en (4) of zoals hierna beschreven.

Een punt waar goed rekening mee moet worden gehouden bij gebruik van *L. variegatus* in sedimenttests, is de wijze van voortplanting van de soort (architomie of morphallaxis, bv. (6)). Deze aseksuele voortplanting leidt tot twee fragmenten, die gedurende enige tijd geen voedsel tot zich nemen, tot het kop- of staartdeel is geregenereerd (bv. (7), (8)). Dit betekent dat er in *L. variegatus* geen ononderbroken blootstelling via opname van verontreinigd sediment is.

▼M6

Er moet daarom een synchronisatie plaatsvinden om ongecontroleerde voortplanting en regeneratie en latere hoge variatie in de testresultaten zoveel mogelijk te beperken. Een dergelijke grote variatie kan optreden wanneer sommige dieren die zich in stukken hebben gedeeld en dus gedurende enige tijd geen voer tot zich nemen, minder worden blootgesteld aan de teststof dan dieren die zich tijdens de test niet in stukken delen (9), (10), (11). 10 tot 14 dagen vóór het begin van de blootstelling moeten de wormen kunstmatig in stukken worden gedeeld (synchronisatie). Voor de synchronisatie moeten grote (volwassen) wormen worden geselecteerd die bij voorkeur geen tekenen van recente morphallaxis vertonen. Deze wormen kunnen op een glazen objectglaasje in een druppel kweekwater worden gelegd en met een scalpel in het middendeel van het lichaam in stukken worden gedeeld. Er dient op te worden gelet dat de achterste einden van gelijke grootte zijn. De achterste einden moeten vervolgens in een kweekvat met daarin hetzelfde substraat als gebruikt in de cultuur en hetzelfde synthethische water tot het begin van de blootstelling met rust gelaten worden om nieuwe koppen te regenereren. Wanneer de gesynchroniseerde wormen zich ingraven in het substraat, is dit een teken van regeneratie van nieuwe koppen (de aanwezigheid van geregenereerde koppen kan worden bevestigd door een representatieve steekproef onder een stereoscopische microscoop te inspecteren). De testorganismen zullen daarna naar verwacht in een vergelijkbare fysiologische toestand verkeren. Dit betekent dat, wanneer zich tijdens de test bij gesynchroniseerde wormen voortplanting door morphallaxis voordoet, vrijwel alle dieren naar verwacht in gelijke mate zullen zijn blootgesteld aan het verrijkte sediment. Het voeren van de gesynchroniseerde wormen dient één keer plaats te vinden, zodra de wormen zich in het substraat beginnen in te graven, of 7 dagen na de dissectie. Het voederregime moet vergelijkbaar zijn met dat van de reguliere culturen, maar het kan raadzaam zijn de gesynchroniseerde wormen dezelfde voedselbronnen te geven als in de test zullen worden gebruikt. De wormen moeten worden gehouden bij de testtemperatuur, bij 20 ± 2 °C. Na de regeneratieperiode moeten voor de test intacte, complete wormen worden gebruikt die na een voorzichtige mechanische stimulus actief zwemmen of kruipen. Verwondingen of autotomie van de wormen moeten worden voorkomen, bv. door voor het hanteren van deze wormen pipetten met gevuurpolijste randen of roestvrijstalen tandenstokers te gebruiken.

Bronnen van starterculturen voor *Lumbriculus variegatus* (adressen in de VS overgenomen uit (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Duitsland

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Duitsland

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Duitsland

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

Verenigde Staten

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

LITERATUUR

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. & 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.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & 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. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. & 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. & 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. & 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. & 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 & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, blz. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & 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

Aanhangsel 6

Samenvatting van de resultaten van de ringtest

„Toxiciteitstest voor *Lumbriculus variegatus* in sediment”

Tabel 1

Resultaten van afzonderlijke uitvoeringen van de ringtest: Gemiddelde aantal wormen in de controles en oplosmiddelcontroles aan het eind van de test; SD = standaarddeviatie; CV = variatiecoëfficiënt.

	gemiddelde aantal wormen in de controles	SD	CV (%)	n	gemiddelde aantal wormen in de oplosmiddel-controles	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
interlaboratorium-gemiddelde	**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

Tabel 2

Resultaten van afzonderlijke uitvoeringen van de ringtest: Gemiddeld totaal drooggewicht van de wormen per replicaat in de controles en oplosmiddelcontroles aan het eind van de test; SD = standaarddeviatie; CV = variatiecoëfficiënt.

	totaal droog-gewicht van wormen per replicaat (controles)	SD	CV (%)	n	totaal drooggewicht van wormen per replicaat (oplosmiddel-controles)	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
Interlabo-ra-torium-gemiddel-de	**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

Tabel 3

Toxiciteit van PCP: Samenvatting van de eindpunten in de ringtest; interlaboratoriumgemiddelden voor EC50, NOEC en LOEC; SD = standaarddeviatie; CV = variatiecoëfficiënt.

biologische parameter		Inter-laboratorium-gemiddelde (mg/kg)	min.	max.	Inter-laboratorium-factor	SD	CV (%)	Meet-kundig gemiddelde (mg/kg)
totaal aantal wormen	**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				
totaal drooggewicht van wormen	**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				
mortaliteit/ overleving	**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
voortplanting (toename aantal wormen per replicaat)	**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				
groei (toename biomassa per replicaat)	**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: minimum detectable difference (kleinst detecteerbare verschil) van de controlewaarden tijdens het toetsen van een hypothese; gebruikt als maat voor het statistisch onderscheidingsvermogen

REFERENTIE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. VOORTPLANTINGSTEST MET ROOFMIJTEN (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) IN BODEM

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 226 (2008) van de OESO. De testmethode is opzet om de effecten van stoffen in de bodem op het voortplantingsresultaat van de in de bodem levende roofmijtensoort *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) te beoordelen en zo de remming van de groei van de specifieke populatie te kunnen schatten (1, 2). Onder voortplantingsresultaat wordt hier verstaan het aantal nakomelingen aan het eind van de testperiode. *H. aculeifer* vertegenwoordigt een extra trofisch niveau naast dat van de soorten waarvoor al testmethoden beschikbaar zijn. Voor de toepassing van deze testmethode wordt een voortplantingstest zonder onderscheid tussen en kwantificering van de verschillende fasen van de voortplantingscyclus als toereikend beschouwd. Voor chemische stoffen met een ander blootstellingsscenario dan via de bodem kunnen andere benaderingen geschikt zijn (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* wordt beschouwd als een relevante vertegenwoordiger van de bodemfauna en van de roofmijten in het bijzonder. De soort komt over de gehele wereld voor (5) en kan gemakkelijk worden verzameld en in een laboratorium worden grootgebracht. Aanhangsel 7 bevat een overzicht van de biologie van *H. aculeifer*. Achtergrondinformatie over de ecologie van de mijtensoort en het gebruik van de soort in ecotoxicologische tests is te vinden in (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCIPE VAN DE TEST

3. Volwassen vrouwelijke mijten worden blootgesteld aan een concentratiebereik van de teststof die door de grond is gemengd. De test wordt begonnen met 10 volwassen vrouwtjes per replicaatvat. Er worden in de test geen mannelijke mijten gebruikt, omdat de ervaring heeft geleerd dat vrouwtjes onmiddellijk of kort nadat ze uit het deutonymfstadium zijn gekomen, paren als er mannetjes aanwezig zijn. Wanneer mannetjes in de test zouden worden opgenomen, zou de test bovendien zoveel langer duren dat het noodzakelijk zou zijn het veeleisende onderscheid tussen de leeftijdsfasen te maken. Paring maakt zelf dus geen deel uit van de test. De vrouwtjes worden 28-35 dagen na het begin van de legperiode in de synchronisatie (zie aanhangsel 4) in de test gebracht, omdat dan mag worden aangenomen dat de vrouwtjes hebben gepaard en de pre-ovipositieperiode achter zich hebben. Bij 20 °C eindigt de test op dag 14 na de plaatsing van de vrouwtjes (dag 0), zodat de eerst controlenakomelingen het deutonymfstadium kunnen bereiken (zie aanhangsel 4). Als hoofdvariabelen worden het aantal nakomelingen per testvat en verder het aantal overlevende vrouwelijke mijten bepaald. Het voortplantingsresultaat van de mijten die zijn blootgesteld aan de teststof, wordt vergeleken met dat van de controles om de EC_x (bv. EC10, EC50) of de concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (no observed effect concentration, NOEC) (zie aanhangsel 1 voor definities) te bepalen, afhankelijk van de testopzet (zie punt 29). In aanhangsel 8 wordt een overzicht van het testschema gegeven.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

4. Bij voorkeur zijn de oplosbaarheid in water, de log K_{ow}, de grond/water-verdelingscoëfficiënt en de dampspanning van de teststof bekend. Aanvullende informatie over het lot van de teststof in de bodem, zoals de snelheid van de biotische en abiotische afbraak, is gewenst.

5. Deze testmethode kan zowel voor in water oplosbare als voor in water onoplosbare stoffen worden gebruikt. De wijze van aanbrengen van de teststof zal echter verschillen. De testmethode is niet van toepassing op vluchtige stoffen, d.w.z. stoffen waarvoor de Henry-constante of de lucht/water-verdelingscoëfficiënt groter dan één is, of stoffen waarvoor de dampspanning bij 25 °C groter dan 0,0133 Pa is.

▼M6

GELDIGHEID VAN DE TEST

6. Wil het testresultaat geldig zijn, dan moet in de onbehandelde controlegroepen aan de volgende criteria worden voldaan:

— De gemiddelde mortaliteit van volwassen vrouwelijke dieren mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 20 %.

— Het gemiddelde aantal nakomelingen per replicaat (met 10 volwassen vrouwelijke dieren geplaatst) moet aan het eind van de test ten minste 50 zijn

— De voor het aantal nakomelingen per replicaat berekende variatiecoëfficiënt mag aan het eind van de definitieve test niet hoger dan 30 % zijn.

REFERENTIESTOF

7. De ECx en/of NOEC van een referentiestof moet worden bepaald om zekerheid te verkrijgen dat de testomstandigheden in het laboratorium toereikend zijn en om na te gaan dat de respons van de testorganismen in de loop van de tijd niet is gewijzigd. Dimethoaat (CAS 60-51-5) is een geschikte referentiestof waarvan bekend is dat deze de populatiegrootte beïnvloedt (4). Als alternatieve referentiestof kan boorzuur (CAS 10043-35-3) worden gebruikt. Met deze stof is minder ervaring opgedaan. Er zijn twee opzetten mogelijk:

— De referentiestof kan worden getest tegelijk met de bepaling van de toxiciteit van elke teststof bij één bepaalde concentratie, waarvan vooraf in een dosis-responsonderzoek moet zijn aangetoond dat zij tot een afname van het aantal nakomelingen met > 50 % leidt. In dit geval moet het aantal replicaten gelijk zijn aan dat voor de controles (zie punt 29).

— Als alternatief kan de referentiestof 1 of 2 keer per jaar in een dosis-responstest worden getest. Afhankelijk van de gekozen opzet, verschillen weliswaar het aantal concentraties en replicaten en de intervalsfactor (zie punt 29), maar moet toch een respons van 10 % tot 90 % effect worden bereikt (intervalsfactor van 1,8). De EC_{50} voor dimethoaat op basis van het aantal nakomelingen moet tussen 3,0 en 7,0 mg actieve stof/kg grond (drooggewicht) liggen. Op basis van de tot nu toe met boorzuur verkregen resultaten zou de EC50 voor boorzuur op basis van het aantal nakomelingen tussen 100 en 500 mg/kg grond (drooggewicht) moeten liggen.

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Testvaten en apparatuur

8. Er moeten testvaten worden gebruikt met een diameter van 3-5 cm (grondlaag van ≥1,5 cm dik), van glas of een ander chemisch inert materiaal en met een goed sluitende afsluiting. Een schroefdeksel heeft de voorkeur. In dat geval kunnen de vaten twee keer per week worden belucht. Als alternatief kunnen afsluitingen worden gebruikt die directe gasuitwisseling tussen het substraat en de omgeving toelaten (bv. gaas). Omdat het vochtgehalte tijdens de test voldoende hoog moet worden gehouden, is het van essentieel belang tijdens de test het gewicht van elk proefvat te controleren en, indien nodig, water aan te vullen. Dit kan in het bijzonder van belang zijn als geen schroefdeksels beschikbaar zijn. Als een niet-transparant testvat wordt gebruikt, moet de afsluiting zijn gemaakt van materiaal dat licht doorlaat (bv. een geperforeerd transparant deksel), maar verhindert dat de mijten ontsnappen. De grootte en het type van het testvat hangt af van de extractiemethode (zie aanhangsel 5 voor details). Als warmte-extractie direct op het vat wordt toegepast, kan een bodemgaas met een passende maaswijdte worden toegevoegd (afgesloten tot de extractie), en moet de dikte van de grondlaag voldoende zijn om een temperatuur en vochtigheidsgradiënt mogelijk te maken.

▼M6

9. Een standaard-laboratoriumuitrusting is vereist, in het bijzonder:

— bij voorkeur glazen vaten met schroefdeksels;

— droogkast;

— stereomicroscoop;

— borstels voor het overbrengen van de mijten;

— pH-meter en luxmeter;

— geschikte nauwkeurige weegschalen;

— adequate apparatuur voor temperatuurregeling;

— adequate apparatuur voor luchtvochtigheidsregeling (niet noodzakelijk als de blootstellingsvaten worden afgedekt door een deksel);

— incubator of kleine kast met temperatuurregeling;

— uitrusting voor extractie (zie aanhangsel 5) (13).

— aanstralend lichtpaneel met lichtregelaar;

— verzamelpotten voor geëxtraheerde mijten.

Bereiding van de kunstmatige grond

10. Voor deze test wordt een kunstmatige grond gebruikt. De kunstmatige grond bestaat uit de volgende bestanddelen (alle waarden gebaseerd op droge massa):

— 5 % veenmosturf, luchtdroog en fijngemalen (een deeltjesgrootte van 2 ± 1 mm is aanvaardbaar);

— 20 % kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

— ongeveer 74 % luchtdroog industrieel zand (afhankelijk van de benodigde hoeveelheid $CaCO_3$), overwegend bestaande uit fijn zand; meer dan 50 % van de deeltjes moet een grootte tussen 50 en 200 micron hebben. De exacte hoeveelheid zand hangt af van de hoeveelheid $CaCO_3$ (zie hieronder); samen moeten ze 75 % vormen.

— < 1,0 % calciumcarbonaat ($CaCO_3$, verpulverd, analytisch zuiver) om een pH van 6,0 ± 0,5 te verkrijgen; de toe te voegen hoeveelheid calciumcarbonaat hangt in beginsel af van de kwaliteit/aard van de turf (zie noot 1).

Noot 1: De benodigde hoeveelheid $CaCO_3$ zal afhangen van de bestanddelen van het grondsubstraat en moet worden bepaald door meting van de pH van gronddeelmonsters direct vóór de test (14).

Noot 2: Het turfgehalte van de kunstmatige grond wijkt af van dat in andere testmethoden met bodemorganismen, waarbij in de meeste gevallen 10 % turf wordt gebruikt (bv. (15)). Volgens de EPPO (16) heeft een typische landbouwbodem echter niet meer dan 5 % organisch materiaal, en de verlaging van het turfgehalte weerspiegelt dus de geringere mogelijkheden van een natuurlijke bodem tot adsorptie van de teststof aan organische koolstof.

Noot 3: Indien nodig, bv. voor specifieke testdoeleinden, kunnen natuurlijke gronden van niet-verontreinigde terreinen ook als test- en/of kweeksubstraat dienen. Als echter natuurlijke grond wordt gebruikt, moet deze worden gekarakteriseerd met ten minste de oorsprong (plaats van verzameling), pH, textuur (deeltjesgrootteverdeling) en gehalte aan organisch materiaal. Indien beschikbaar, moeten het type en de naam van de grond volgens de

▼M6

bodemclassificatie worden opgenomen, en de grond moet vrij zijn van verontreinigingen. In geval de teststof een metaal of organometaal is, moet ook de kationuitwisselingscapaciteit (CEC) van de natuurlijke grond worden bepaald. Er moet in het bijzonder op worden gelet dat aan de geldigheidscriteria wordt voldaan, want achtergrondinformatie over natuurlijke bodems is doorgaans zeldzaam.

11. De droge bestanddelen van de grond worden grondig gemengd (bv. in een grote laboratoriummenger). Voor de bepaling van de pH moet een mengsel van grond en een oplossing van 1 M kaliumchloride (KCl) of 0,01 M calciumchloride ($CaCl_2$) in een verhouding van 1:5 worden gebruikt (zie (14) en aanhangsel 3). Als de grond zuurder is dan het vereiste bereik (zie punt 10), kan de zuurgraad worden verlaagd door toevoeging van een passende hoeveelheid $CaCO_3$. Als de grond te alkalisch is, kan hij worden aangepast door toevoeging van meer van het mengsel van de eerste drie bestanddelen die in punt 10 zijn genoemd, maar zonder de $CaCO_3$.

12. Het maximale waterhoudend vermogen (WHV) van de kunstmatige grond wordt bepaald overeenkomstig de procedures als beschreven in aanhangsel 2. Twee tot zeven dagen voor aanvang van de test wordt de droge kunstmatige grond vooraf bevochtigd door genoeg gedestilleerd of gedeïoniseerd water toe te voegen om ongeveer de helft van het uiteindelijke watergehalte te verkrijgen, d.w.z. 40 tot 60 % van WHV_{max}. Het vochtgehalte wordt aangepast tot 40-60 % van WHV_{max} door de oplossing van de teststof toe te voegen en/of gedestilleerd of gedeïoniseerd water toe te voegen (zie de punten 16-18). Een aanvullende ruwe controle van het vochtgehalte van de grond wordt verkregen door de grond lichtjes in de hand te knijpen. Als het vochtgehalte in orde is, moeten kleine druppels water tussen de vingers verschijnen.

13. Het vochtgehalte van de grond wordt aan het begin en aan het eind van de test bepaald door droging tot een constant gewicht bij 105 °C overeenkomstig ISO 11465 (17), en de pH-waarde van de grond wordt bepaald overeenkomstig aanhangsel 3 of ISO 10390 (14). Deze metingen moeten worden uitgevoerd in aanvullende monsters zonder mijten, zowel van de controlegrond als van elke testconcentratiegrond. De pH-waarde van de grond mag niet worden aangepast wanneer zure of basische stoffen worden getest. Het vochtgehalte moet gedurende de gehele test worden bewaakt door de vaten periodiek te wegen (zie de punten 20 en 24).

Selectie en voorbereiding van de proefdieren

14. De soort die in de test wordt gebruikt, is *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Om met de test te beginnen zijn volwassen vrouwelijke mijten nodig die zijn verkregen uit een gesynchroniseerd cohort. De mijten moeten worden geplaatst circa 7-14 dagen nadat ze volwassen zijn geworden, 28-35 dagen na het begin van de leg in de synchronisatie (zie punt 3 en aanhangsel 4). De herkomst van de mijten of de leverancier en gegevens over de instandhouding van de laboratoriumcultuur moeten worden geregistreerd. Als een laboratoriumcultuur wordt gehouden, wordt aanbevolen de identiteit van de soort ten minste één keer per jaar te bevestigen. Een identificatieblad is opgenomen als aanhangsel 6.

Bereiding van testconcentraties

15. De teststof wordt door de grond gemengd. Organische oplosmiddelen die als hulpstof worden gebruikt bij de behandeling van de grond met de teststof, moeten worden gekozen op basis van hun lage toxiciteit voor mijten, en in de testopzet moet een geschikte oplosmiddelcontrole worden opgenomen (zie punt 29).

In water oplosbare teststof

16. Een oplossing van de teststof wordt in gedeïoniseerd water bereid in een hoeveelheid die voldoende is voor alle replicaten van één testconcentratie. Aanbevolen wordt een passende hoeveelheid water te gebruiken om het vereiste vochtgehalte te bereiken, d.w.z. 40 tot 60 % van WHV_{max} (zie punt 12). Elke oplossing van de teststof wordt grondig door één batch vooraf bevochtigde grond gemengd voordat de grond in het testvat wordt gedaan.

▼M6

In water onoplosbare teststof

17. Indien de teststof niet in water oplosbaar is, maar wel oplosbaar in organische oplosmiddelen, kan de teststof worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bv. aceton). Enkel vluchtige oplosmiddelen mogen worden gebruikt. Wanneer dergelijke oplosmiddelen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties en de controle dezelfde minimale hoeveelheid van het oplosmiddel bevatten. Het oplosmiddel wordt op een kleine hoeveelheid, bv. 10 g, fijn kwartszand gespoten of daarmee vermengd. Het totale zandgehalte van het substraat moet voor deze hoeveelheid worden gecorrigeerd. Het oplosmiddel wordt verwijderd door het gedurende ten minste één uur in een afzuigkast te verdampen. Het mengsel van kwartszand en teststof wordt toegevoegd aan de vooraf bevochtigde grond en grondig gemengd na toevoeging van een passende hoeveelheid gedeïoniseerd water om het vereiste vochtgehalte te verkrijgen. Het uiteindelijke mengsel wordt in de testvaten gedaan. Er zij opgemerkt dat sommige oplosmiddelen een toxisch effect kunnen hebben op mijten. Het wordt daarom aanbevolen een extra watercontrole zonder oplosmiddel te gebruiken als het toxisch effect van het oplosmiddel op mijten niet bekend is. Als afdoend is aangetoond dat het oplosmiddel (in de toe te passen concentraties) geen effecten heeft, mag de watercontrole achterwege worden gelaten.

In water en organische oplosmiddelen slecht oplosbare teststof

18. Voor chemische stoffen die slecht in water en in organische oplosmiddelen oplosbaar zijn, kan het equivalent van 2,5 g fijn gemalen kwartszand per testvat (bijvoorbeeld 10 g fijn kwartszand voor vier replicaten) worden gemengd met de hoeveelheid teststof die nodig is om de gewenste testconcentratie te verkrijgen. Het totale zandgehalte van het substraat moet voor deze hoeveelheid worden gecorrigeerd. Het mengsel van kwartszand en teststof wordt toegevoegd aan de vooraf bevochtigde grond en grondig gemengd na toevoeging van een passende hoeveelheid gedeïoniseerd water om het vereiste vochtgehalte te verkrijgen. Het uiteindelijke mengsel wordt verdeeld over de testvaten. De procedure wordt voor iedere testconcentratie herhaald en tevens wordt een passende controlegroep bereid.

PROCEDURE

Test-en controlegroepen

19. Voor elk controlevat en behandelingsvat wordt aanbevolen tien volwassen vrouwelijke dieren in 20 g droge massa van de kunstige grond te gebruiken. De testorganismen moeten binnen twee uur na de bereiding van het definitieve testsubstraat (d.w.z. na aanbrenging van de teststof) worden geplaatst. In specifieke gevallen (bv. wanneer veroudering als een bepalende factor wordt beschouwd) kan de tijd tussen de bereiding van het definitieve testsubstraat en de plaatsing van de mijten worden verlengd (zie (18) voor gedetailleerde informatie over dergelijke veroudering). In dergelijke gevallen moet echter een wetenschappelijke onderbouwing worden gegeven.

20. Nadat de mijten op de grond zijn geplaatst, worden ze gevoerd en moet het begingewicht van elk testvat worden bepaald, zodat dit gedurende de test als referentie kan dienen voor het bewaken van het vochtgehalte van de grond als beschreven in punt 24. De testvaten worden vervolgens afgesloten als beschreven in punt 8 en in de testruimte geplaatst.

21. Voor elk van de aanbrengingsmethoden van de teststof worden passende controles bereid als beschreven in de punten 15 tot en met 18. Voor de voorbereiding van de controles worden de beschreven toepasselijke procedures gevolgd, zij het dat geen teststof wordt gevoegd. Voor zover van toepassing worden dus organische oplosmiddelen, kwartszand of andere media op de controles aangebracht in concentraties/hoeveelheden als in de behandelingen. Wanneer een oplosmiddel of ander medium wordt gebruikt om de teststof aan te brengen, moet ook een extra controle zonder het medium of de teststof worden voorbereid en getest in geval de toxiciteit van het medium niet bekend is (zie punt 17).

▼M6

Testomstandigheden

22. De testtemperatuur moet 20 ± 2 °C zijn. De temperatuur moet ten minste elke dag worden geregistreerd en, indien nodig, aangepast. De test wordt uitgevoerd bij gecontroleerde licht-donkercycli (bij voorkeur 16 uur licht en 8 uur donker) met een verlichting van 400 tot 800 lux in de nabijheid van de testvaten. Ten behoeve van de vergelijkbaarheid zijn deze omstandigheden dezelfde als in andere ecotoxicologische tests in bodems (bv. (15)).

23. Indien schroefdeksels worden gebruikt, moet gasuitwisseling worden gewaarborgd door de testvaten ten minste twee keer per week te beluchten. Indien gaasafsluitingen worden gebruikt, moet bijzondere aandacht worden geschonken aan behoud van het vochtgehalte van de bodem (zie de punten 8 en 24).

24. Het watergehalte van het grondsubstraat in de testvaten wordt gedurende de hele test op peil gehouden door de testvaten periodiek (bv. één keer per week) te wegen en, indien nodig, opnieuw water te geven. Het verloren vocht wordt, indien nodig, aangevuld met gedeïoniseerd water. Het vochtgehalte mag tijdens de test niet meer dan 10 % afwijken van de beginwaarde.

Voeding

25. Er is aangetoond dat kaasmijten (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) een geschikte voedselbron zijn. Kleine collembola (springstaarten) (bv. jonge *Folsomia candida* Willem, 1902 of Onychiurus *fimatus* (19), (20), enchytreeën (bv. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) of nematoden (rondwormen) (bv. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) kunnen ook geschikt zijn (21). Het wordt aangeraden het voedsel te controleren voordat het in een test wordt gebruikt. Het type en de hoeveelheid voeding moet waarborgen dat er een toereikend aantal nakomelingen wordt geproduceerd om aan de geldigheidscriteria te voldoen (punt 6). Bij de keuze van de prooi-organismen moet rekening worden gehouden met het type werking van de teststof (een acaricide kan bv. ook een toxisch effect op de voedselmijten hebben, zie punt 26).

26. Voeding moet *ad libitum* worden verstrekt, d.w.z. elke keer in een kleine hoeveelheid (punt van een spatel). Voor dit doel kan ook een afzuigventilator met geringe zuigkracht als voorgesteld in de collembolatest of een fijn penseel worden gebruikt. Doorgaans volstaat het om aan het begin van de test en daarna twee of drie keer per week voeding te verstrekken. Wanneer de teststof toxisch blijkt te zijn voor de prooi-organismen, moet een verhoogde dosering van de voeding en/of een alternatieve voedselbron worden overwogen.

Selectie van testconcentraties

27. Wanneer er vooraf iets bekend is over de toxiciteit van de teststof, bijvoorbeeld uit bereikbepalingstests, kan dit nuttig zijn bij het kiezen van geschikte testconcentraties. Indien nodig wordt een bereikbepalingstest uitgevoerd met vijf teststofconcentraties in het bereik van 0,1 tot 1 000 mg/kg droge grond, met ten minste één replicaat voor behandelingen en controle. De duur van de bereikbepalingstest is 14 dagen, waarna de mortaliteit van de volwassen mijten en het aantal nakomelingen worden bepaald. Het concentratiebereik in de definitieve test moet bij voorkeur zo worden gekozen dat het de concentraties omvat waarbij een effect op het aantal nakomelingen optreedt, maar de overleving van de moedergeneratie niet wordt beïnvloed. Voor stoffen die bij vrijwel dezelfde concentraties letale en subletale effecten hebben, kan dit echter onmogelijk zijn. De in de test gebruikte concentraties moeten de effectconcentratie (bv. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is, omvatten. Extrapolaties ver onder de laagste concentratie die van invloed is op de testorganismen, of ver boven de hoogste geteste concentratie moeten uitsluitend in uitzonderlijke gevallen worden uitgevoerd, en in het verslag moet een volledige toelichting worden gegeven.

Proefopzet

Dosis-responstests

28. Op basis van de aanbevelingen voortvloeiende uit een andere ringtest (voortplantingstest met Enchytraeidae (22)) worden drie testopzetten voorgesteld.

▼M6

De algemene geschiktheid van al deze opzetten werd bevestigd door de uitkomst van een validatie met *H. aculeifer*.

29. Bij de vaststelling van het concentratiebereik moet aandacht worden geschonken aan het volgende:

— Voor de bepaling van de EC_x (bv. EC_{10}, EC_{50}), moeten twaalf concentraties worden getest. Aanbevolen wordt ten minste twee replicaten voor elke testconcentratie plus zes controles te gebruiken. De intervalsfactor kan variëren, d.w.z. kleiner dan of gelijk aan 1,8 in het verwachte effectbereik en groter dan 1,8 bij de hogere en lagere concentraties.

— Voor de bepaling van de NOEC moeten ten minste vijf concentraties worden getest die een meetkundige reeks vormen. Aanbevolen wordt vier replicaten voor elke testconcentratie plus acht controles te gebruiken. De concentraties moeten worden gekozen met intervallen die onderling verschillen met een factor van niet meer dan 2,0.

— Een gecombineerde aanpak maakt het mogelijk om zowel de NOEC als ECx te bepalen. Er moeten acht behandelingsconcentraties die een meetkundige reeks vormen, worden gebruikt. Aanbevolen wordt vier replicaten voor iedere behandeling plus acht controles te gebruiken. De concentraties moeten worden gekozen met intervallen die onderling verschillen met een factor van niet meer dan 1,8.

Limiettest

30. Als bij de hoogste concentratie in de bereikbepalingstest (d.w.z. 1 000 mg/kg drooggewicht grond) geen effecten worden waargenomen, kan de definitieve voortplantingstest worden uitgevoerd als een limiettest, waarbij 1 000 mg/kg drooggewicht grond als testconcentratie wordt gebruikt. Een limiettest biedt de mogelijkheid om aan te tonen dat de NOEC of de EC_{10} voor de voortplanting groter is dan de hoogste concentratie, en het aantal gebruikte mijten in de test tot een minimum te beperken. Er moeten acht replicaten worden gebruikt voor zowel de behandelde grond als de controle.

Testduur en metingen

31. Alle waargenomen verschillen tussen het gedrag en de morfologie van de mijten in de controle en van die in de behandelde vaten moeten worden geregistreerd.

32. Op dag 14 worden de overlevende mijten uit de grond geëxtraheerd door warmte/licht-extractie of via een andere passende methode (zie aanhangsel 5). De aantallen nakomelingen (d.w.z. larven, protonymfen en deutonymfen) en volwassen mijten worden apart geteld. Alle volwassen mijten die op dit moment niet worden aangetroffen, moeten als dood worden geregistreerd, omdat moet worden aangenomen dat deze mijten vóór de beoordeling zijn overleden en ontbonden. De efficiëntie van de extractie moet een of twee keer per jaar worden gevalideerd in controles met bekende aantallen volwassen en jonge dieren. De gecombineerde efficiëntie voor alle ontwikkelingsstadia moet gemiddeld groter dan 90 % zijn (zie aanhangsel 5). De tellingen van de volwassen dieren en jonge dieren worden niet gecorrigeerd voor de efficiëntie.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

33. De punten 36 tot en met 41 bevatten informatie over de statistische methoden die kunnen worden gebruikt voor de analyse van de testresultaten. Daarnaast moet document 54 van de OESO, „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: Guidance to Application” (31), worden geraadpleegd.

34. Het belangrijkste eindpunt van de test is het voortplantingsresultaat, dat hier het aantal geproduceerde nakomelingen per replicaattestvat is (bij 10 geplaatste volwassen vrouwelijke dieren). De statistische analyse vereist dat

▼M6

het rekenkundig gemiddelde (X) en de variantie (s^2) voor het voortplantingsresultaat per behandeling en per controle worden berekend. X en s^2 worden gebruikt voor ANOVA-procedures zoals de t-toets, toets van Dunnett of Williams-toets alsook voor de berekening van 95 %-betrouwbaarheidsintervallen.

Noot: Dit belangrijkste eindpunt is gelijk aan de vruchtbaarheid gemeten als het aantal levende jonge dieren dat tijdens de test is voortgebracht, gedeeld door het aantal ouderdieren dat aan het begin van de test is geplaatst.

35. Het aantal overlevende vrouwelijke dieren in de onbehandelde controles is een belangrijk geldigheidscriterium en moet worden gedocumenteerd. Net als in de bereikbepalingstest moeten ook alle andere schadelijke tekenen in het eindverslag worden geregistreerd.

ECx

36. ECx-waarden en de bijbehorende onder- en bovengrens van het 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de in punt 34 beschreven parameter worden berekend met behulp van passende statistische methoden (bv. probit-analyse, logistische of Weibull-functie, getrimde Spearman-Karber-methode of eenvoudige interpolatie). Een EC_x wordt verkregen door de waarde die correspondeert met x % van het controlegemiddelde in de gevonden vergelijking in te vullen. Voor de berekening van de EC50 of een andere EC_x kunnen de gemiddelden (X) per behandeling worden onderworpen aan een regressieanalyse.

NOEC/LOEC

37. Als het doel van een statistische analyse is de NOEC/LOEC te bepalen, zijn statistieken per vat nodig (individuele vaten worden als replicaten beschouwd). Er moeten passende statistische methoden worden gebruikt (conform document 54 van de OESO, „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application"). In het algemeen worden schadelijke effecten van de teststof ten opzichte van de controle onderzocht met een toets voor een eenzijdige (kleinere) nulhypothese bij $p \leq 0{,}05$. In de onderstaande punten worden voorbeelden gegeven.

38. Een normale verdeling van gegevens kan worden getoetst met bv. de Kolmogorov-Smirnovtoets voor goodness-of-fit, de toets op het quotiënt van het bereik en de standaarddeviatie ('Range to standard deviation ratio'-toets) of de Shapiro-Wilk-toets (tweezijdig, $p \leq 0{,}05$). De Cochran-toets, Levenetoets of Bartlett-toets (tweezijdig, $p \leq 0{,}05$) kunnen worden gebruikt om op homogeniteit van variantie te toetsen. Als aan de voorwaarden van parametrische toetsprocedures (normaliteit, homogeniteit van variantie) is voldaan, kunnen een éénwegs variantieanalyse (ANOVA, One-way Analysis of Variance) en daaropvolgende toetsen voor meervoudige vergelijkingen worden uitgevoerd. Toetsen voor meervoudige vergelijkingen (bv. t-toets van Dunnett) of stap-omlaag-trendtoetsen (bv. Williams-toets in geval van een monotone dosis-responsrelatie) kunnen worden gebruikt om na te gaan of er significante verschillen ($p \leq 0{,}05$) zijn tussen de controles en de verschillende concentraties van de teststof (selectie van de aanbevolen toets overeenkomstig document 54 van de OESO, „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application"). Anders moeten verdelingsvrije toetsen (bv. Bonferroni-toets volgens Holm of de Jonckheere-Terpstra-trendtoets) worden gebruikt om de NOEC en LOEC te bepalen.

Limiettest

39. Als een limiettest (vergelijking van de controle en slechts één behandeling) is uitgevoerd en er is voldaan aan de voorwaarden van parametrische toetsprocedures (normaliteit, homogeniteit), kunnen metrische responsen worden geëvalueerd met de t-toets. Als niet aan die voorwaarden wordt voldaan, kan de t-toets voor ongelijke varianties (Welch-toets) of een verdelingsvrije toets, zoals de Mann-Whitney-toets, worden gebruikt.

40. Om significante verschillen tussen de controles (controle en oplosmiddelcontrole) vast te stellen, kunnen de replicaten van de beide controles worden getoetst als beschreven voor de limiettest. Als uit deze toetsen geen

▼M6

significante verschillen naar voren komen, mogen alle replicaten van de controle en oplosmiddelcontrole worden gepoold. Anders dienen alle behandelingen te worden vergeleken met de oplosmiddelcontrole.

Testverslag

41. In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen:

— *Teststof*

— de identificatie van de teststof, naam, batch, partij en CAS-nummer, zuiverheid;

— fysisch-chemische eigenschappen van de teststof (bv. log K_{ow}, oplosbaarheid in water, dampspanning, Henry-constante (H) en bij voorkeur informatie over het lot van de teststof in de bodem).

— *Testorganismen*

— identificatie en leverancier van de testorganismen, beschrijving van de kweekomstandigheden;

— leeftijdsbereik van de testorganismen.

— *Testomstandigheden*

— beschrijving van de testopzet en procedure;

— gegevens over de voorbereiding van de testgrond; gedetailleerde specificatie als natuurlijke grond wordt gebruikt (oorsprong, geschiedenis, deeltjesgrootteverdeling, pH, gehalte organische materialen en, indien beschikbaar, de bodemclassificatie);

— het maximale waterhoudend vermogen van de grond;

— een beschrijving van de techniek die is gebruik voor het aanbrengen van de teststof op de grond;

— gedetailleerde gegevens over hulpstoffen gebruikt bij de toediening van de teststof;

— grootte van de testvaten en de droge massa van de testgrond per vat;

— testomstandigheden: lichtintensiteit, duur van licht-donkercycli, temperatuur;

— een beschrijving van het voedingsschema, het type en de hoeveelheid voedsel dat in de test is gebruikt, voedingsdatums;

— de pH en het watergehalte van de grond aan het begin en tijdens de test (voor de controle en alle behandelingen);

— gedetailleerde beschrijving van de extractiemethode en de efficiëntie van de extractie.

— *Testresultaten*

— het aantal nakomelingen in elk testvat dat aan het eind van de test is bepaald;

— het aantal volwassen vrouwelijke dieren en de mortaliteit van de volwassen dieren (%) in elk testvat aan het eind van de test;

— een beschrijving van de zichtbare symptomen of opvallende veranderingen in het gedrag;

— de resultaten verkregen met de referentieteststof;

— samenvattende statistieken (EC_x en/of NOEC), met inbegrip van 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen en een beschrijving van de berekeningsmethode;

▼**M6**

— een grafiek van de concentratie-responsrelatie;

— afwijkingen van de procedures beschreven in deze testmethode en alle ongebruikelijke voorvallen tijdens de test.

LITERATUUR

(1) Casanueva, M.E. (1993). 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. & 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. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition. In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 blz.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: blz. 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: blz. 621-628.

(8) Krogh, P.H. & Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. & van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, blz. 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. & Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. & Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. & 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. & 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. & 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 (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼**M6**

(15) Hoofdstuk C.8 van deze bijlage — Toxiciteit voor regenwormen..

(16) EPPO (2003). Norm Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Hoofdstuk 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. & 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). Ges. allg. angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J. & Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool. Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. & 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) Hoofdstuk C.32 van deze bijlage — Voortplantingstest met Enchytraeidae.

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 blz.

(25) Dunger, W. & Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 blz.

(26) Lesna, I. & 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. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, 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. & 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 No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼**M6**

Aanhangsel 1

Definities

Voor de toepassing van deze testmethode worden de volgende definities gehanteerd (in deze test worden alle effectconcentraties uitgedrukt als massa van de teststof per droge massa van de testgrond):

Stof betekent een substantie of mengsel.

NOEC (No Observed Effect Concentration) is de hoogste concentratie van de teststof waarbij geen effect wordt waargenomen. In deze test heeft de concentratie die overeenkomt met de NOEC geen statistisch significant effect ($p < 0,05$) binnen een bepaalde blootstellingsperiode in vergelijking met de controle.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) is de laagste concentratie van de teststof die binnen een bepaalde blootstellingstijd tot een statistisch significant effect ($p < 0,05$) leidt in vergelijking met de controle.

EC_x (Effect concentration for x % effect) is de concentratie die binnen een bepaalde blootstellingstijd x % van een effect op testorganismen veroorzaakt ten opzichte van een controle. De EC_{50} is bijvoorbeeld de geschatte concentratie die gedurende een bepaalde blootstellingsperiode bij 50 % van een blootgestelde populatie een effect op een testeindpunt zal hebben.

Teststof betekent alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

▼M6

Aanhangsel 2

Bepaling van het maximale waterhoudend vermogen van de grond

De volgende methode voor de bepaling van het maximale waterhoudend vermogen van de grond wordt geschikt geacht. Zij is beschreven in bijlage C van ISO DIS 11268-2 („Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction" (23)).

Verzamel met een geschikt bemonsteringsapparaat (grondboorbuis enz.) een vastgestelde hoeveelheid van het testgrondsubstraat (bv. 5 g). Bedek de onderkant van de buis met een stuk filterpapier, vul een waterbad en plaats de buis op een rek in het bad. De buis zou geleidelijk onder water moeten komen te staan, tot het water de bovenkant van de grond bereikt. Laat de buis gedurende ongeveer drie uur in het water. Niet alle water dat door de bodemcapillairen wordt geabsorbeerd, kan worden vastgehouden. Laat het grondmonster daarom gedurende twee uur uitlekken door de buis op een bed van zeer nat fijngemalen kwartszand in een afgesloten vat te plaatsen (om droging te voorkomen). Het monster moet vervolgens worden gewogen, gedroogd tot een constante massa bij 105 °C. Het waterhoudend vermogen (WHV) kan vervolgens als volgt worden berekend:

$$\text{WHV (in \% van droge massa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

waarbij:

S = met water verzadigd substraat + massa van buis + massa van filterpapier

T = leeggewicht (massa van buis + massa van filterpapier)

D = droge massa van substraat

▼M6

Aanhangsel 3

Bepaling van de pH van de grond

De volgende methode voor het bepalen van de pH van een grondmonster is gebaseerd op de beschrijving in ISO DIS 10390: Bodemkwaliteit — Bepaling van de pH-waarde (16).

Een vastgestelde hoeveelheid grond wordt gedurende ten minste 12 uur bij kamertemperatuur gedroogd. Vervolgens wordt een suspensie van de grond (die ten minste 5 g grond bevat) gemaakt in vijf keer zijn volume van hetzij een 1 M-oplossing analytisch zuiver kaliumchloride (KCl) of een 0,01 M-oplossing van analytisch zuiver calciumchloride ($CaCl_2$). De suspensie wordt daarna vijf minuten goed geschud. Na het schudden krijgt de suspensie ten minste 2 uur, maar niet langer dan 24 uur, gelegenheid om te bezinken. Daarna wordt de pH van de vloeibare fase gemeten met een pH-meter die vóór elke meting is geijkt met een passende reeks bufferoplossingen (bv. pH 4,0 en 7,0).

▼M6

Aanhangsel 4

Kweken van *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, voedselmijten en synchronisatie van cultuur

Kweken van Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Culturen kunnen worden gehouden in plastic vaten of glazen potten gevuld met een mengsel van pleisterkalk en houtskoolpoeder (verhouding 9:1). De pleisterkalk kan vochtig worden gehouden door, indien nodig, enkele druppels gedestilleerd of gedeïoniseerd water toe te voegen. De optimale kweektemperatuur is 20 ± 2 °C, en het licht/donker-regime is voor deze soort niet van belang. Als prooiorganismen kunnen Typrophagus putrescentiae of Caloglyphus sp. mijten worden gebruikt (met voedselmijten moet voorzichtigheid worden betracht, omdat ze bij mensen allergieën kunnen veroorzaken), maar nematoden, enchytreeën en collembola zijn ook geschikt als prooi. Hun herkomst moet worden geregistreerd. De ontwikkeling van een populatie kan beginnen met één enkel vrouwelijk dier, want de mannetjes ontwikkelen zich in niet-bevruchte eitjes. De generaties overlappen elkaar grotendeels. Een vrouwtje kan ten minste 100 dagen oud worden en kan tijdens haar leven ongeveer 100 eitjes leggen. Tussen 10 en 40 dagen na het bereiken van het volwassen stadium wordt met 2,2 eitjes per vrouwtje per dag de piek van de leg bereikt. De ontwikkeltijd van eitje tot volwassen vrouwelijk dier is bij 20 °C ongeveer 20 dagen. Er moet meer dan één cultuur in stand worden gehouden en als reserve worden aangehouden.

Kweken van Typrophagus putrescentiae:

De mijten worden gehouden in een glazen vat gevuld met fijn brouwersgistpoeder dat in een plastic emmer gevuld met KNO_3-oplossing wordt geplaatst om ontsnappen te voorkomen. De voedselmijten worden op dit poeder geplaatst. Daarna worden ze met een spatel voorzichtig door het poeder gemengd (dat twee keer per week moet worden vervangen).

Synchronisatie van de cultuur:

Exemplaren die in de test worden gebruikt, moeten van vergelijkbare leeftijd zijn (ca. 7 dagen na het bereiken van het volwassen stadium). Bij een kweektemperatuur van 20 °C wordt dit bereikt door

Vrouwtjes over te brengen naar een schoon kweekvat en voldoende voedsel toe te voegen

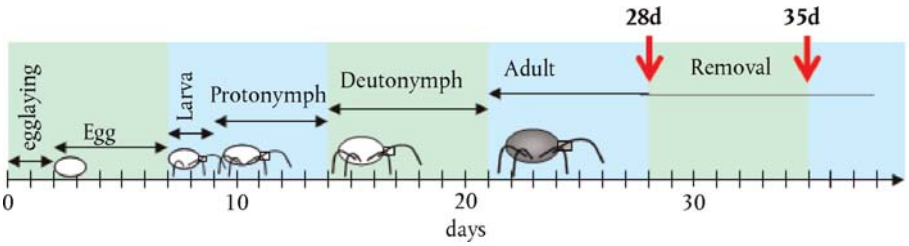
— Geef de vrouwtjes twee tot drie dagen gelegenheid om eitjes te leggen, en verwijder daarna de vrouwtjes

— Neem voor de test tussen dag 28 en dag 35 na het begin volwassen vrouwtjes uit het vat en plaats ze in schone kweekvaten.

Volwassen vrouwtjes zijn gemakkelijk te onderscheiden van mannetjes en andere ontwikkelingsstadia door hun grotere afmetingen, opgeblazen vorm en bruine dorsale schild (mannetjes zijn slanker en plat, onvolwassen dieren zijn wit tot crèmekleurig). De ontwikkeling van de mijten verloopt bij 20 °C ongeveer volgens het hieronder beschreven patroon (figuur): Eitje 5d, Larve 2d, Protonymf 5d, Deutonymf 7d, pre-ovipositieperiode van het vrouwtje 2d. Daarna zijn de mijten volwassen.

Figuur

Ontwikkeling van Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer bij 20 °C. ('verwijdering' = verwijdering van vrouwtjes die voor de test worden gebruikt)



▼**M6**

De volwassen testdieren worden tussen dag 28 en dag 35, nadat de moederdieren zijn begonnen met eitjes leggen (d.w.z. 7-14 dagen nadat ze het volwassen stadium hebben bereikt), uit de gesynchroniseerde cultuur verwijderd en in de testvaten geplaatst. Dit waarborgt dat de testdieren hun pre-ovipositieperiode al achter de rug hebben en hebben gepaard met mannetjes die ook in het kweekvat aanwezig zijn. Waarnemingen in laboratoriumculturen wijzen erop dat vrouwtjes onmiddellijk of kort na het bereiken van het volwassen stadium paren als er mannetjes aanwezig zijn (Ruf, Vaninnen, persoonlijke waarnemingen). De periode van zeven dagen is gekozen om de integratie in de laboratoriumroutine te vergemakkelijken en om een buffer te vormen voor variabiliteit in de individuele ontwikkeling van de mijten. De ovipositie moet worden aangevangen met ten minste hetzelfde aantal vrouwtjes als uiteindelijk benodigd is voor de test. (Als in de test bijvoorbeeld 400 vrouwtjes benodigd zijn, moeten ten minste 400 vrouwtjes twee tot drie dagen gelegenheid krijgen om eitjes te leggen. Het uitgangspunt voor de gesynchroniseerde populatie is ten minste 1 200 eitjes (sekse-ratio ca. 0,5, mortaliteit ca. 0,2). Om kannibalisme te voorkomen, is het handiger om niet meer dan 20 tot 30 eitjes leggende vrouwtjes in één vat te houden.

▼**M6**

Aanhangsel 5

Extractiemethoden

Voor microgeleedpotigen is een warmtebehandeling een geschikte methode om exemplaren van de grond/het substraat te scheiden (zie onderstaande figuur). De methode is gebaseerd op de activiteit van de organismen, dus alleen mobiele exemplaren maken kans om te worden geregistreerd. Het beginsel van warmte-extractie is dat de omstandigheden voor de organismen in het monster geleidelijk slechter worden gemaakt, zodat ze het substraat zullen verlaten en in een fixeervloeistof vallen (bv. ethanol). Cruciale punten zijn de duur van de extractie en de gradiënt van goede naar matige naar slechte omstandigheden voor de organismen. De duur van de extractie voor ecotoxicologische tests moet zo kort mogelijk zijn, omdat elke populatiegroei tijdens de extractie de resultaten vertekent. Aan de andere kant moeten de temperatuur- en vochtigheidsomstandigheden in het monster altijd binnen een bereik liggen dat de mijten in staat stelt te bewegen. De verwarming van een grondmonster leidt tot uitdroging van het substraat. Als de uitdroging te snel plaatsvindt, kunnen ook sommige mijten uitdrogen voordat ze erin slagen te ontsnappen.

Daarom wordt de volgende procedure voorgesteld (24) (25):

Apparatuur Tullgren-trechter of vergelijkbare methoden zoals bv. McFadyen (verwarming van boven, het monster wordt boven een trechter geplaatst)

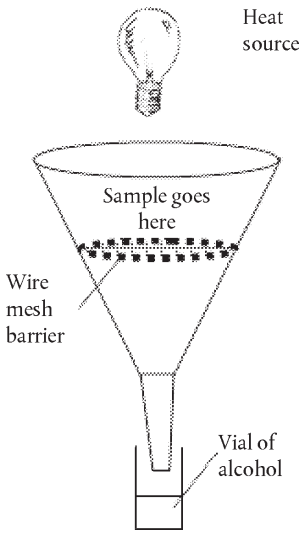
Verwarmingsregime: 25 °C gedurende 12 uur, 35 °C gedurende 12 uur, 45 °C gedurende 24 uur (in totaal 48 uur). De temperatuur moeten in het substraat worden gemeten.

Fixatievloeistof: 70 % ethanol

Details vismachtiging: Neem een glazen fles die voor de test is gebruikt. Verwijder het deksel en wikkel een stuk gaas of stof om de halsopening. De stof moet een maaswijdte van 1,0 tot 1,5 mm hebben. Zet de stof vast met een elastische band. Draai de fles voorzichtig op zijn kop en plaats hem in het extractieapparaat. De stof verhindert dat het substraat in de fixatievloeistof druppelt, maar laat wel toe dat mijten het monster verlaten. Begin het verwarmingsproces pas wanneer alle flessen zijn geplaatst. Beëindig de extractie na 48 uur. Verwijder de fixatie van de flessen en tel de mijten met behulp van een stereomicroscoop.

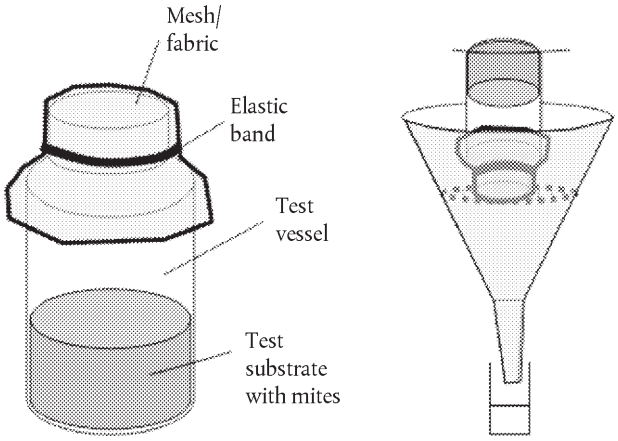
De efficiëntie van de gekozen extractiemethode moet één of twee keer per jaar zijn bepaald met vaten die een bekend aantal jonge mijten en volwassen mijten bevatten die in onbehandeld testsubstraat worden gehouden. De gecombineerde efficiëntie voor alle ontwikkelingsstadia moet gemiddeld groter dan 90 % zijn.

Tullgren-achtig extractieapparaat



▼**M6**

Wijze van voorbereiden van de testfles na beëindiging van de test, vóór de extractie



▼**M6**

Aanhangsel 6

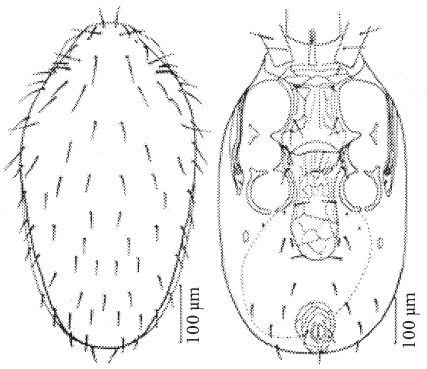
Identificatie van Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Onderklasse/klasse/onderorde:	Familie:	Geslacht/ondergeslacht/soort:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

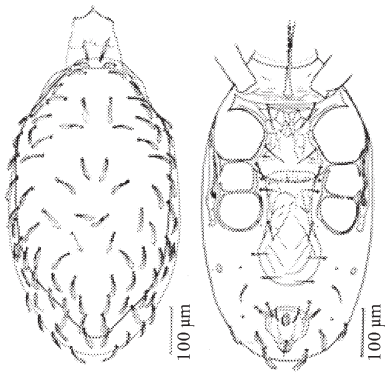
Auteur en datum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 januari 2007

Geraadpleegde literatuur:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2e herziene editie: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 blz. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 blz.

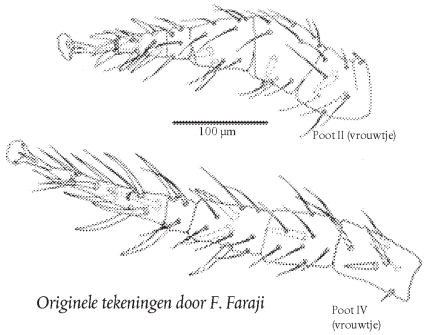
Deterministische kenmerken:	Tectum met afgeronde getande rand; hypostomale groeven met meer dan 6 dentikels; caudale dorsale setae van Z4 niet erg lang; dorsale setae borstelvormig; genitaal schild normaal, niet erg vergroot en reikt niet tot het anaal schild; achterste helft van dorsaal schild zonder ongepaarde setae; poten II en IV met enkele dikke macrosetae; dorsale seta Z5 ongeveer twee keer zo groot als J5; vaste vingers van cheliceren met 12-14-tanden en beweegbare vinger met 2 tanden; idiosoma 520-685 µm lang. Hypoaspis miles wordt ook gebruikt in biologische bestrijding en wordt soms verward met H. aculeifer. Het belangrijkste verschil is: H. miles behoort tot het ondergeslacht Cosmolaelaps en heeft mesachtige dorsale setae, terwijl H. aculeifer tot het ondergeslacht Geolaelaps behoort en borstelvormige dorsale setae heeft.



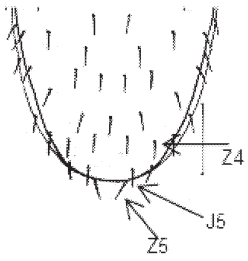
Hypoaspis aculeifer Naar Hughes, 1976



Hypoaspis miles Naar Hughes, 1976



Originele tekeningen door F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
dorsaal schild met karakteristieke setae

▼M6

Aanhangsel 7

Basisinformatie over de biologie van *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer behoort tot de familie van de Lealapidae, orde Acari (mijten), klasse Arachnida, tak Arthropoda. Ze komen voor in allerlei soorten grond en voeden zich met andere mijten, nematoden, enchytreeën en collembola (26). Bij voedseltekort stappen ze over op kannibalisme (27). Roofmijten zijn gesegmenteerd in een idiosoma en gnathosoma. Een duidelijke differentiatie van het idiosoma in een prosoma (kopborststuk) en opisthosoma (achterlijf) ontbreekt. Het gnathosoma (hoofdschild) bevat de instrumenten om te eten, zoals palpen (tasters) en cheliceren. De cheliceren zijn in drieën gevorkt en hebben tanden van verschillende vorm. Behalve voor de opname van voedsel gebruiken de mannetjes hun cheliceren hoofdzakelijk om de spermatoforen naar de vrouwtjes over te brengen. Een dorsaal schild bedekt het idiosoma vrijwel volledig. Een groot deel van het idiosoma van vrouwtjes wordt in beslag genomen door de voortplantingsorganen, die met name kort voor de afzetting van eitjes duidelijk herkenbaar is. Er zijn twee schilden aan de buikzijde, het sternale schild en het genitale schild. Alle poten zijn voorzien van borstelharen en doornen. De borstelharen worden door de dieren gebruikt om zich vast te grijpen wanneer ze zich in of op de grond voortbewegen. Het eerste paar poten wordt hoofdzakelijk als antenne gebruikt. Het tweede paar poten wordt niet alleen gebruikt voor de voortbeweging, maar ook om prooien vast te grijpen. De doornen van het vierde paar poten kunnen als bescherming en als 'voortbewegingsmotor' dienen (28). Mannetjes zijn 0,55 tot 0,65 mm lang en wegen 10 tot 15 µg. Vrouwtjes zijn 0,8 tot 0,9 mm lang en wegen 50 tot 60 µg (8) (28) (figuur 1).

Figuur 1

Vrouwtje, mannetje, protonymf en larve van H. aculeifer.



Bij 23 °C worden de mijten seksueel rijp na respectievelijk 16 dagen (vrouwtjes) en 18 dagen (mannetjes) (6). De vrouwtjes brengen de zaadcellen via de solenostom over naar het ovarium. In het ovarium rijpen de zaadcellen en worden ze opgeslagen. Bevruchting vindt pas plaats wanneer de zaadcellen in het ovarium rijp zijn. De bevruchte of onbevruchte eitjes worden door de vrouwtjes afgezet in klompjes of apart, bij voorkeur in spleten of holen. Vrouwtjes die hebben gepaard, kunnen nakomelingen van beide seksen voortbrengen, terwijl uit eitjes van vrouwtjes die niet hebben gepaard, uitsluitend mannelijke nakomelingen komen. Tijdens de ontwikkeling tot volwassen dier worden vier ontwikkelingsstadia doorlopen (eitje — larve, larve — protonymf, protonymf — deutonymf en deutonymf — volwassen dier).

Het eitje is melkwit, glasachtig, elliptisch en ongeveer 0,37 mm lang met een stevige mantel. Volgens (8) zijn de larven 0,42 tot 0,45 mm groot. Ze hebben slechts drie paar poten. In het kopgedeelte worden palpen (tasters) en cheliceren ontwikkeld. De cheliceren, die een paar kleine dentikels hebben, worden gebruikt om uit het eitje te komen. Na de eerste vervelling, 1 tot 2 dagen na het uitkomen, worden de protonymfen ontwikkeld. Deze zijn ook wit, hebben een grootte van 0,45 tot 0,62 mm (8) en hebben vier paar poten. Op de cheliceren zijn de tanden al volledig aanwezig. Vanaf dit stadium beginnen de mijten te foerageren. Daartoe wordt de cuticula van de prooi door de cheliceren doorboord en wordt in

▼**M6**

de prooi een secretie uitgescheiden voor de vertering buiten de darm. De voedselbrij kan daarna door de mijt worden opgezogen. De cheliceren kunnen ook worden gebruikt om grotere delen uit voedselklompjes te scheuren (28). Na nog een vervelling worden de deutonymfen ontwikkeld. Deze zijn 0,60 tot 0,80 mm groot (8) en geel tot lichtbruin van kleur. Vanaf dit stadium kunnen de dieren worden gescheiden in vrouwtjes en mannetjes. Na nog een vervelling, gedurende welke de dieren inactief zijn en het bruine schild zich ontwikkelt (ongeveer na 14 dagen), zijn de mijten volwassen (28) (29) (30). Hun levensduur is 48 tot 100 dagen bij 25 °C (27).

▼M6

Aanhangsel 8

Samenvatting en tijdschema van de belangrijkste handelingen die voor het uitvoeren van de Hypoaspis-test moeten worden verricht

Tijd (dagen) begin van test = dag 0	Activiteit/taak
Dag – 35 tot – 28	Breng vrouwtjes uit de stamcultuur over naar schone vaten om de synchronisatie te beginnen 2 dagen later: verwijdering van vrouwtjes twee of drie keer week: verstrek voldoende voedsel
Dag – 5 (+/– 2)	Bereid de kunstmatige grond
Dag – 4 (+/– 2)	Bepaal WHV van de kunstmatige grond Droog gedurende de nacht Volgende dag: weeg monsters en bereken WHV
Dag – 4 (+/– 2)	Bevochtig vooraf de kunstmatige grond tot 20 - 30 % van WHV
Dag 0	Begin de test: voeg de teststof toe aan de kunstmatige grond Breng 10 vrouwtjes in elk replicaat Weeg elk replicaat Zet abiotische controles voor het vochtgehalte en de pH op, 2 replicaten voor elke behandeling Droog de controles voor het vochtgehalte gedurende de nacht Volgende dag: weeg de controles voor het vochtgehalte Volgende dag: meet de pH van de gedroogde abiotische controles
Dag 3, 6, 9, 12 (ongeveer)	Voeg aan elk replicaat voldoende prooi-organismen toe Weeg elk replicaat en voeg het verdampte water weer toe
Dag 14	Beëindig de test, zet de extractie op met alle replicaten, alsmede controles voor de efficiëntie van de extractie Droog de controles voor het watergehalte gedurende de nacht Volgende dag: weeg de controles voor het watergehalte Volgende dag: meet de pH van de gedroogde controles
Dag 16	Beëindig de extractie
Dag 16+	Registreer het aantal volwassen dieren en het aantal nakomelingen in het geëxtraheerde materiaal Doe verslag van de resultaten in de sjabloontabellen Doe verslag van de testprocedure op de testprotocolbladen.

▼M6

C.37. 21-DAAGSE VISTEST: KORTETERMIJNSCREENING OP OESTROGENE EN ANDROGENE ACTIVITEIT EN OP AROMATASEREMMERS

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan OESO-testrichtsnoer (TG) 230 (2009). De noodzaak om een vistest te ontwikkelen en te valideren waarmee bepaalde actieve endocriene chemische stoffen kunnen worden gedetecteerd, komt voort uit de bezorgdheid dat de chemicaliënniveaus in het milieu schadelijke effecten kunnen hebben bij mensen en dieren als gevolg van de interactie van deze chemicaliën met het hormoonstelsel. In 1998 is de OESO een actie gestart om bestaande richtsnoeren te herzien en nieuwe richtsnoeren te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars. Eén onderdeel van de actie was de ontwikkeling van een testrichtsnoer voor het screenen van chemische stoffen die uitwerken op het hormoonstelsel van vissoorten. De 21-daagse endocriene screeningtest bij vissen heeft een uitgebreid validatieprogramma ondergaan, bestaande uit interlaboratoriumstudies met geselecteerde chemicaliën om de relevantie en betrouwbaarheid van de test voor de detectie van oestrogene aromatase-remmende chemicaliën (1, 2, 3, 4, 5) aan te tonen in de drie onderzochte vissoorten (de Amerikaanse dikkop-elrits, het Japanse rijstvisje en de zebravis). Detectie van androgene activiteit is mogelijk in de dikkop-elrits en het rijstvisje, maar niet in de zebravis. Met deze testmethode is het niet mogelijk anti-androgene chemicaliën te detecteren. De validatiewerkzaamheden zijn collegiaal getoetst door een panel van deskundigen die zijn benoemd door de nationale coördinatoren van het programma voor testrichtsnoeren (6). De test is niet ontworpen voor de herkenning van specifieke mechanismen van hormonale ontwrichting omdat de proefdieren een intacte hypothalamus-hypofyse-gonade-as (HPG-as) hebben, die kan reageren op chemische stoffen die op verschillende niveaus uitwerken op de HPG-as. De test voor kortetermijneffecten op de voortplanting van vissen (testrichtsnoer (TG) 229 van de OESO) heeft betrekking op de fertiliteit en, indien van toepassing, de gonade histopathologie van de Amerikaanse dikkop-elrits, evenals alle eindpunten die in deze testmethode zijn opgenomen. TG 229 van de OESO voorziet in een screening van chemische stoffen die van invloed zijn op de voortplanting door middel van verschillende mechanismen, waaronder endocriene middelen. Dit moet in aanmerking worden genomen voordat de meest geschikte testmethode wordt gekozen.

2. Deze testmethode beschrijft een screening in vivo waarbij geslachtsrijpe mannetjes- en kuitschietende vrouwtjesvissen bij elkaar worden gehouden en gedurende een beperkt deel van hun levenscyclus (21 dagen) worden blootgesteld aan een chemische stof. Na afloop van de 21-daagse blootstellingsperiode worden, afhankelijk van de gebruikte soort, een of twee eindpunt-biomerkers bij de mannetjes en de vrouwtjes gemeten als indicatoren van oestrogene, aromatase-remmende of androgene activiteit van de teststof; deze eindpunten zijn vitellogenine en secundaire geslachtskenmerken. De vitellogenine wordt gemeten bij de Amerikaanse dikkop-elrits, het Japanse rijstvisje en de zebravis, terwijl de secundaire geslachtskenmerken alleen worden gemeten bij de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje.

3. Deze bioassay dient als in-vivoscreeningtest voor bepaalde endocriene werkingsmechanismen en de toepassing ervan moet worden beschouwd in het kader van het begrippenkader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende chemische stoffen (28).

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

4. Vitellogenine (VTG) wordt gewoonlijk geproduceerd door de lever van vrouwelijke gewervelde oviparen in reactie op doorstromend endogeen oestrogeen. Vitellogenine is een precursor van eidooierproteïnen en wordt vanuit de lever in de bloedbaan naar het ovarium getransporteerd en daar opgenomen en gemodificeerd door de zich ontwikkelende eieren. Vitellogenine is vrijwel niet detecteerbaar in het plasma van onvolwassen vrouwtjes- en mannetjesvissen omdat deze over onvoldoende circulerend oestrogeen beschikken; hun lever is echter wel in staat om vitellogenine samen te stellen en af te scheiden in reactie op exogene oestrogeenstimulatie.

▼M6

5. Het meten van vitellogenine dient om chemische stoffen met verschillende oestrogene werkingsmechanismen te detecteren. De detectie van oestrogene chemicaliën is mogelijk door de inductie van vitellogenine in mannetjesvissen te meten en is overvloedig gedocumenteerd in de collegiaal getoetste wetenschappelijke literatuur (bijvoorbeeld (7)). Vitellogenine-inductie is ook aangetoond na blootstelling aan aromatiseerbare androgenen (8, 9). Een vermindering in het circulatieniveau van oestrogenen bij vrouwtjes, bijvoorbeeld door de remming van de aromatase die het endogene androgeen omzet in het natuurlijke oestrogeen 17β -estradiol, veroorzaakt een afname van het vitellogenineniveau, dat wordt gebruikt om chemicaliën met aromatase-remmende eigenschappen te detecteren (10, 11). De biologische relevantie van de vitellogeninereactie na remming van oestrogenen/aromatase is vastgesteld en ruimschoots gedocumenteerd. Mogelijk wordt de productie van VTG bij vrouwtjes echter ook beïnvloed door algemene toxiciteit en niet-endocriene toxische werkingsmechanismen, bijvoorbeeld hepatotoxiciteit.

6. Er zijn verschillende meetmethoden ontwikkeld en gestandaardiseerd voor routinegebruik. Dit is het geval bij soortspecifieke methoden van Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) waarbij gebruik wordt gemaakt van immunochemie voor de kwantificering van vitellogenine die wordt geproduceerd in kleine bloed- of levermonsters van afzonderlijke vissen (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Voor de VTG-meting worden bloedmonsters van de Amerikaanse dikkop-elrits, bloedmonsters of een kop-/staarthomogenaat van de zebravis, en levermonsters van het Japanse rijstvisje genomen. Bij het rijstvisje is er een goede correlatie tussen de in het bloed en in de lever gemeten VTG (19). In aanhangsel 6 worden de aanbevolen procedures voor monsterneming ten behoeve van vitellogenine-analyse beschreven. Uitrustingen voor het meten van vitellogenine zijn op grote schaal beschikbaar. Dergelijke uitrustingen moeten zijn gebaseerd op een gevalideerde soortspecifieke ELISA-methode.

7. Secundaire geslachtskenmerken van bepaalde soorten mannetjesvissen zijn extern zichtbaar en kwantificeerbaar, en reageren op circulatieniveaus van endogene androgenen. Dit geldt voor de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje, maar niet voor de zebravis, die geen kwantificeerbare secundaire geslachtskenmerken heeft. Vrouwtjes behouden de mogelijkheid om mannelijke secundaire geslachtskenmerken te ontwikkelen wanneer ze worden blootgesteld aan androgene chemicaliën in water. Er bestaan in de wetenschappelijke literatuur verscheidene studies waarin dit type reactie is gedocumenteerd bij de Amerikaanse dikkop-elrits (20) en het Japanse rijstvisje (21). Een afname van de secundaire geslachtskenmerken bij mannetjes moet met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd vanwege het geringe statistische onderscheidingsvermogen en dient te worden gebaseerd op het oordeel van deskundigen en het gewicht van het bewijs. De bruikbaarheid van zebravissen in deze test is beperkt in verband met het ontbreken van kwantificeerbare secundaire geslachtskenmerken die reageren op androgeen werkende chemische stoffen.

8. Bij de Amerikaanse dikkop-elrits is de voornaamste indicator van exogene androgene blootstelling het aantal nuptiale papillen op de bek van het vrouwtje. Bij het Japanse rijstvisje vormt het aantal papillaire uitsteeksels de voornaamste aanwijzing voor exogene blootstelling aan androgene chemicaliën bij de vrouwtjesvis. In aanhangsels 5A en 5B worden de procedures aanbevolen die moeten worden gevolgd voor de evaluatie van geslachtskenmerken bij respectievelijk de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje.

9. De in deze testmethode gebruikte definities staan in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

10. In deze test worden mannetjes- en vrouwtjesvissen in geslachtsrijpe staat samen blootgesteld in testbakken. Hun volwassen en geslachtsrijpe staat maakt een duidelijk onderscheid naar sekse en daardoor een sekse-afhankelijke analyse van elk eindpunt mogelijk, en waarborgt hun gevoeligheid

▼M6

voor exogene chemische stoffen. Aan het eind van de test wordt het geslacht bevestigd door macroscopisch onderzoek van de geslachtsklieren na opening van het onderlijf aan de buikzijde met een schaar. Een overzicht van de toepasselijke bioassay-omstandigheden staat in aanhangsel 2. De test wordt gewoonlijk begonnen met vissen die als steekproef zijn genomen uit een populatie die tot kuitschieten in staat is; oudere dieren moeten niet worden gebruikt. Richtsnoeren voor de leeftijd van de vissen en hun reproductieve status worden gegeven in het onderdeel over de selectie van vissen. De test wordt uitgevoerd met drie concentraties van blootstelling aan chemicaliën en een controlegroep in water, alsook, indien nodig, een controlegroep in een oplossing. Er worden twee bakken of duplo's per behandeling gebruikt (met in elke bak 5 mannetjes en 5 vrouwtjes) voor het Japanse rijstvisje en de zebravis, terwijl er vier bakken of duplo's per behandeling worden gebruikt (met in elke bak 2 mannetjes en 4 vrouwtjes) voor de Amerikaanse dikkop-elrits. Deze indeling is aangepast aan het territoriumgedrag van het dikkop-elritsmannetje en waarborgt tevens voldoende onderscheidend vermogen. De blootstelling vindt plaats gedurende 21 dagen en de monsters van de vissen worden genomen op dag 21 van de blootstelling.

11. Bij de monsterneming op dag 21 worden alle dieren op humane wijze gedood. Secundaire geslachtskenmerken worden gemeten bij de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje (zie aanhangsels 5A en 5B); bloedmonsters worden genomen voor de vaststelling van vitellogenine bij de zebravis en de Amerikaanse dikkop-elrits, als alternatief kan de kop/staart worden genomen voor de vaststelling van vitellogenine bij de zebravis (aanhangsel 6); voor de VTG-analyse van het Japanse rijstvisje wordt de lever uitgenomen (aanhangsel 6).

AANVAARDBAARHEIDSCRITERIA VOOR DE TEST

12. De uitkomsten van de test zijn alleen aanvaardbaar als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

— het sterftecijfer in de controlegroepen in water (oplosmiddel) mag aan het eind van de blootstellingsperiode niet hoger zijn dan 10 %;

— het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele blootstellingsperiode minimaal 60 % van de verzadigingswaarde van lucht zijn geweest;

— het verschil in watertemperatuur tussen de testbakken mag op geen enkel moment tijdens de blootstellingsperiode groter zijn dan ± 1,5 °C. Tevens mag de watertemperatuur niet meer dan 2 °C hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 2);

— er moet bewijs beschikbaar zijn waaruit blijkt dat de gehalten aan teststof in de oplossing binnen ± 20 % van de gemiddelde gemeten waarden zijn gehouden.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

13. Standaardlaboratoriumapparatuur, met name:

a) zuurstof- en pH-meters;

b) apparatuur voor het bepalen van de hardheid en alkaliteit van water;

c) geschikte apparatuur voor de temperatuurregeling en bij voorkeur ook voor continue bewaking;

d) bakken van chemisch inert materiaal met een inhoud die geschikt is voor de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad (zie aanhangsel 2);

e) kuitsubstraat voor de Amerikaanse dikkop-elrits en de zebravis (zie aanhangsel 4 voor de nodige details);

f) weegschaal met een toereikende nauwkeurigheid (d.w.z. nauwkeurig tot op ± 0,5 mg).

▼M6

Water

14. Water waarin de gekozen testsoort langdurig kan overleven en groeien is geschikt als testwater. Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde moet binnen een bereik van 6,5 tot 8,5 blijven, maar tijdens een test mag deze niet meer dan ± 0,5 pH-eenheden schommelen. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof), moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} en SO_4^{2-}), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld het totaalgehalte aan organofosforpesticiden en het totaalgehalte aan organochloorpesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar. In aanhangsel 3 worden enkele chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater vermeld.

Testoplossingen

15. De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt. Het gebruik van een draagvloeistof wordt niet aanbevolen. Indien echter een oplosmiddel noodzakelijk is, moet gelijktijdig een controletest met het oplosmiddel worden uitgevoerd, met dezelfde oplosmiddelconcentratie als voor de chemische behandelingen wordt gebruikt. Voor moeilijke teststoffen kan een oplosmiddel uit technisch oogpunt de beste keuze zijn; raadpleeg hiervoor de OESO-leidraad voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (22). De keuze van het juiste oplosmiddel hangt af van de chemische eigenschappen van de teststof. In de OESO-leidraad wordt een maximum van 100 µl/l aanbevolen, dat in acht dient te worden genomen. In een recente bespreking (23) worden echter aanvullende bedenkingen geuit over het gebruik van oplosmiddelen voor het testen van endocriene activiteit. Derhalve wordt aanbevolen de oplosmiddelconcentratie, indien nodig, tot het minimum te beperken als dit technisch uitvoerbaar is (afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof).

16. Er moet gebruik worden gemaakt van een doorstroomtestsysteem. Een dergelijk systeem verdeelt en verdunt continu de stamoplossing van de teststof (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem) om ervoor te zorgen dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend. De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Er moet goed op worden gelet dat het gebruik van laagwaardige plastic slangen en andere materialen die biologisch actieve chemicaliën kunnen bevatten, worden vermeden. Bij de keuze van het materiaal voor het doorstroomsysteem moet rekening worden gehouden met mogelijke adsorptie van de teststof aan dit materiaal.

Leefomstandigheden van de vis

17. De testvissen moeten worden geselecteerd uit een laboratoriumpopulatie, bij voorkeur van één stam, die bij het begin van de test minimaal twee weken gehouden is onder omstandigheden die qua waterkwaliteit en verlichting overeenkomen met die tijdens de test. Het is van belang dat de densiteit en de bezettingsgraad (zie voor definities aanhangsel 1) worden afgestemd op de gekozen vissoort (zie aanhangsel 2).

18. Na een aanpassingsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast:

▼M6

— sterfte groter dan 10 % van de populatie in zeven dagen: de hele partij wordt afgekeurd;

— sterfte tussen 5 % en 10 % van de populatie: acclimatisering gedurende nog zeven dagen; als de sterfte gedurende deze zeven dagen hoger dan 5 % is, wordt de gehele partij afgekeurd;

— sterfte minder dan 5 % van de populatie binnen zeven dagen: de gehele partij wordt geaccepteerd.

19. Vissen mogen tijdens de acclimatiseringsperiode, de pre-blootstellingsperiode of de blootstellingsperiode niet worden behandeld voor ziekten.

Pre-blootstellingsperiode en selectie van de vissen

20. Aanbevolen wordt de dieren gedurende een pre-blootstellingsperiode van één week in bakken te houden die soortgelijk zijn aan de testbakken. De vissen kunnen tijdens deze periode en de blootstellingsfase naar believen worden gevoederd. De blootstellingsfase begint met seksueel dimorfe volwassen vissen uit een laboratoriumaanbod van geslachtsrijpe dieren (bijvoorbeeld met duidelijk zichtbare secundaire geslachtskenmerken bij de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje) die actief kuitschieten. Slechts als algemene richtsnoer (niet toe te passen zonder aandacht te schenken aan de feitelijke reproductieve status van een gegeven partij vissen) geldt dat Amerikaanse dikkop-elritsen ongeveer 20 (± 2) weken oud moeten zijn, aangenomen dat ze hun hele leven zijn gehouden bij 25 (± 2) °C. Japanse rijstvisjes moeten ongeveer 16 (± 2) weken oud zijn, aangenomen dat ze hun hele leven zijn gehouden bij 25 (± 2) °C. Zebravissen moeten ongeveer 16 (± 2) weken oud zijn, aangenomen dat ze hun hele leven zijn gehouden bij 26 (± 2) °C.

TESTOPZET

21. Er wordt gebruikgemaakt van drie concentraties van de teststof, één controletest (met water) en indien nodig één controletest met oplosmiddel. De gegevens kunnen worden geanalyseerd om statistisch significante verschillen vast te stellen tussen de reacties op behandeling en op de controles. Deze analyses brengen aan het licht of nadere langdurige tests op schadelijke effecten (op het gebied van overleven, ontwikkeling, groei en voortplanting) eerder nodig zijn voor de teststof dan voor gebruik ten behoeve van risicobeoordeling (24).

22. Voor de zebravis en het Japanse rijstvisje worden op dag 21 van het experiment mannetjes en vrouwtjes van elke behandelingsconcentratie (5 mannetjes en 5 vrouwtjes in elk van beide duplo's) en van de controlegroep(en) genomen voor het meten van de vitellogenine en, voor zover van toepassing, de secundaire geslachtskenmerken. Voor de Amerikaanse dikkop-elrits worden op dag 21 van de blootstelling mannetjes en vrouwtjes (2 mannetjes en 4 vrouwtjes in elk van de vier duplo's) en van de controlegroep(en) genomen voor het meten van de vitellogenine en de secundaire geslachtskenmerken.

Selectie van testconcentraties

23. Voor de doeleinden van deze test moet de hoogste testconcentratie worden ingesteld op de laagste van de volgende waarden: de maximale toegelaten concentratie (MTC), die wordt bepaald met een dosisbereikstest of op basis van andere toxiciteitsgegevens, 10 mg/l of de maximale oplosbaarheid in water. De MTC is gedefinieerd als de hoogste testconcentratie van de teststof die tot minder dan 10 % sterfte leidt. In deze benadering wordt ervan uitgegaan dat er empirische gegevens over acute toxiciteit of andere toxiciteitsgegevens bestaan op basis waarvan de MTC kan worden geschat. Omdat de schatting van de MTC onnauwkeurig kan zijn is een deskundig oordeel normaliter noodzakelijk.

▼M6

24. Drie testconcentraties met een constante tussenliggende factor van maximaal 10, en een verdunningswatercontrole (en indien nodig een oplosmiddelcontrole), zijn verplicht. Aanbevolen wordt een bereik van tussenliggende factoren van 3,2 tot 10.

PROCEDURE

Selectie en weging van de testvissen

25. Het is belangrijk om de variatie in het gewicht van de vissen aan het begin van de test zoveel mogelijk te beperken. In aanhangsel 2 worden geschikte gewichtbereiken aangegeven voor de verschillende vissoorten die worden aanbevolen voor deze test. Voor de gehele partij vissen die in deze test wordt gebruikt, geldt dat het bereik van het afzonderlijke gewicht van mannetjes en vrouwtjes aan het begin van de test indien mogelijk binnen ± 20 % van het rekenkundig gemiddelde van het betreffende geslacht moet worden gehouden. Het verdient aanbeveling om voorafgaande aan de test een steekproef te nemen om het gemiddelde gewicht te bepalen.

Blootstellingsomstandigheden

Duur

26. De test duurt 21 dagen, volgend op een pre-blootstellingsperiode. De aanbevolen pre-blootstellingsperiode is één week.

Voeding

27. De vissen dienen naar believen voldoende te worden gevoederd met passende voeding (aanhangsel 2) om hun lichamelijke conditie op peil te houden. Bacteriegroei en troebelheid van het water moeten zoveel mogelijk worden voorkomen. Als algemene richtsnoer geldt dat de dagelijkse hoeveelheid voeder kan worden verdeeld in twee of drie gelijke porties voor meer dan één voeding per dag, met ten minste drie uur tijd tussen elke voeding. Eén grotere portie is ook aanvaardbaar, met name tijdens weekeinden. De vissen dienen niet gevoederd te worden gedurende de 12 uur voorafgaande aan de monsterneming/necropsie.

28. Het visvoeder dient te worden gecontroleerd op de aanwezigheid van verontreinigende stoffen zoals organochloorpesticiden, polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en polychloorbifenylen (PCB's). Voeder met een verhoogd gehalte aan fyto-oestrogenen die de testreactie op een bekende oestrogeenagonist (bijvoorbeeld 17ß-oestradiol) kunnen verstoren, dient te worden vermeden.

29. Ongebruikt voeder en fecaal materiaal moet ten minste tweemaal per week uit de testbakken worden verwijderd, bijvoorbeeld door de bodem van elke tank zorgvuldig te reinigen met een hevel.

Licht en temperatuur

30. De fotoperiode en watertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (zie aanhangsel 2).

Frequentie van de analytische bepalingen en metingen

31. Voor aanvang van de blootstellingsperiode moet de juiste werking van het afgiftesysteem van de teststof zijn gewaarborgd. Alle noodzakelijke analysemethoden moeten zijn vastgesteld, inclusief voldoende kennis over de chemische stabiliteit in het testsysteem. Tijdens de test worden de concentraties van de teststof regelmatig als volgt gemeten: de stroomsnelheid van het verdunningswater en de toxische stamoplossing moet bij voorkeur dagelijks, maar minimaal tweemaal per week, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Het is raadzaam de feitelijke concentraties van de teststof in alle bakken bij aanvang van de test en vervolgens met wekelijkse tussenpozen te meten.

32. Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Indien de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test goed binnen een marge van ± 20 % van de nominale concentratie is gehouden, mogen de resultaten echter worden gebaseerd op nominale of gemeten waarden.

33. Monsters moeten mogelijk worden gefilterd (bijvoorbeeld met een 0,45 μm poriëngrootte) of gecentrifugeerd. Indien nodig verdient centrifugeren de voorkeur. Als het testmateriaal echter niet aan filters adsorbeert, is filtratie mogelijk een aanvaardbaar alternatief.

▼M6

34. In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de temperatuur en de pH in alle testbakken ten minste één keer per week worden gemeten. De totale hardheid en alkaliteit moeten ten minste één keer per week worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. De temperatuur moet bij voorkeur in ten minste één testbak continu worden gecontroleerd.

Waarnemingen

35. In de loop van de test of na afloop van de test worden een aantal algemene reacties (bijvoorbeeld overleven) en biologische reacties (bijvoorbeeld de vitellogenineniveaus) bepaald. Meting en beoordeling van deze eindpunten worden hierna beschreven.

Overleven

36. De vissen moeten gedurende de test dagelijks worden onderzocht. De sterfte moet worden geregistreerd en de dode vissen moeten zo snel mogelijk worden verwijderd. Dode vissen mogen noch in de controle- noch in de behandelbakken worden vervangen. Het geslacht van de vissen die tijdens de test sterven, moet worden vastgesteld door macroscopisch onderzoek van de geslachtsklieren.

Gedrag en uiterlijk

37. Elke vorm van afwijkend gedrag (ten opzichte van de controlegroepen) moet worden genoteerd. Dit kan zich uitstrekken tot tekenen van algemene toxiciteit waaronder hyperventilatie, ongecoördineerd zwemmen, evenwichtsverlies en atypisch(e) onbeweeglijkheid of eetgedrag. In aanvulling hierop moeten ook externe afwijkingen (zoals bloedingen, ontkleuring) worden genoteerd. Dergelijke tekenen van toxiciteit dienen bij de interpretatie van de gegevens zorgvuldig in beschouwing te worden genomen, omdat ze kunnen duiden op concentraties waarbij biomerkers van endocriene activiteit niet meer betrouwbaar zijn. Dergelijke gedragswaarnemingen kunnen ook bruikbare kwalitatieve informatie opleveren voor mogelijke vistestvoorschriften in de toekomst. Zo is bijvoorbeeld agressief territoriumgedrag waargenomen bij normale mannetjes of gemasculiniseerde vrouwtjes van Amerikaanse dikkop-elritsen bij blootstelling aan androgenen; bij zebravissen wordt het kenmerkende paar- en paaigedrag na zonsopgang verminderd of verstoord door blootstelling aan oestrogenen of anti-androgenen.

38. Omdat sommige aspecten van het uiterlijk (vooral de kleur) bij behandeling snel kunnen veranderen, is het van belang dat kwalitatieve waarnemingen worden genoteerd voordat dieren uit het testsysteem worden gehaald. De ervaringen die tot nu toe met Amerikaanse dikkop-elritsen zijn opgedaan, duiden erop dat sommige endocrien actieve stoffen in eerste instantie veranderingen in de volgende externe kenmerken teweeg kunnen brengen: lichaamskleur (licht of donker), kleurpatronen (aanwezigheid van verticale banen) en lichaamsvorm (kop en borstregio). Er dienen derhalve tijdens de test en aan het einde van het onderzoek waarnemingen te worden genoteerd over het fysieke voorkomen van de vissen.

Op humane wijze doden van de vissen

39. Op dag 21, d.w.z. bij beëindiging van de blootstelling, dienen de vissen te worden geëuthanaseerd met passende hoeveelheden tricaïne (tricaïne-methaansulfonaat, metacaïne, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l gebufferd met 300 mg/l $NaHCO_3$ (natriumbicarbonaat, CAS 144-55-8)) ter vermindering van slijmvliesirritatie; vervolgens worden bloed- of weefselmonsters genomen om het vitellogenineniveau te bepalen, zoals toegelicht in het onderdeel over vitellogenine.

▼M6

Waarneming van secundaire geslachtskenmerken

40. Sommige endocrien actieve stoffen kunnen tot veranderingen leiden in bepaalde secundaire geslachtskenmerken (aantal nuptiale papillen bij het mannetje van de Amerikaanse dikkop-elrits, papillaire uitsteeksels bij het mannetje van het Japanse rijstvisje). Met name stoffen met bepaalde werkingsmechanismen kunnen een abnormaal optreden van secundaire geslachtskenmerken veroorzaken bij dieren van de andere sekse. Zo kunnen androgene receptoragonisten, zoals trenbolone, methyltestosteron en dihydrotestosteron, tot gevolg hebben dat vrouwelijke dikkop-elritsen geprononceerde nuptiale papillen ontwikkelen of dat vrouwelijke rijstvisjes papillaire uitsteeksels ontwikkelen (11, 20, 21). Ook is beschreven dat oestrogene receptoragonisten het aantal nuptiale papillen en de grootte van de dorsale nekverdikking bij volwassen mannetjes kunnen verminderen (25, 26). Dergelijke morfologische waarnemingen kunnen bruikbare kwalitatieve en kwantitatieve informatie opleveren voor mogelijke vistestvoorschriften in de toekomst. Het aantal en de grootte van nuptiale papillen bij Amerikaanse dikkop-elritsen en papillaire uitsteeksels bij Japanse rijstvisjes kunnen hetzij direct, hetzij meer praktisch bij geconserveerde specimina worden gekwantificeerd. De aanbevolen procedures voor de beoordeling van secundaire geslachtskenmerken bij Amerikaanse dikkop-elritsen en Japanse rijstvisjes zijn respectievelijk beschikbaar in aanhangsel 5A en 5B.

Vitellogenine (VTG)

41. Er wordt bloed afgenomen uit de staartader of -slagader met een geheparineerd microhematocriet capillair buisje, of door een hartpunctie met een injectiespuit. Afhankelijk van de grootte van de vissen lopen de af te nemen hoeveelheden bloed gewoonlijk uiteen van 5 tot 60 µl per stuk voor Amerikaanse dikkop-elritsen en van 5 tot 15 µl per stuk voor zebravissen. Het plasma wordt van het bloed gescheiden door middel van centrifuge en bij – 80 °C bewaard met een proteaseremmer totdat het wordt onderzocht op vitellogenine. Als alternatief wordt bij Japanse rijstvisjes de lever gebruikt en kan bij zebravissen het kop-/staarthomogenaat worden gebruikt als weefselbron voor de bepaling van vitellogenine (aanhangsel 6). De VTG-meting moet zijn gebaseerd op een gevalideerde homologe ELISA-methode met homologe VTG-norm en homologe antilichamen. Aanbevolen wordt een methode te gebruiken waarmee VTG-niveaus kunnen worden gemeten van slechts een paar ng/ml plasma (of ng/mg weefsel), dat wil zeggen het basisniveau bij niet-blootgestelde mannetjesvissen.

42. De kwaliteitscontrole van de vitellogenineanalyse wordt verricht door het gebruik van normen, blanco-bepalingen en ten minste analyse in duplo. Voor elke ELISA-methode moet het matrixeffect (effect van de verdunning van het monster) worden getest om de minimale verdunningsfactor per monster te bepalen. Elke ELISA-plaat die voor VTG-analyses wordt gebruikt, dient de volgende kwaliteitscontrolemonsters te bevatten: ten minste 6 kalibratienormen die het bereik van de verwachte vitellogenineconcentraties bestrijken en ten minste één assayblanco met niet-specifieke binding (in duplo geanalyseerd). De absorptie van deze blanco's moet minder bedragen dan 5 % van de maximale absorptie volgens de kalibratienorm. Er worden ten minste twee aliquots (tankduplicaten) van elk verdunningsmonster geanalyseerd. Tankduplicaten die meer dan 20 % verschillen, dienen opnieuw te worden geanalyseerd.

43. De correlatiecoëfficiënt (R^2) voor kalibratiecurves moet groter zijn dan 0,99. Een hoge correlatie is echter niet voldoende om een toereikende voorspelling van de concentratie in het gehele bereik te waarborgen. Behalve dat de correlatie voor de kalibratiecurve voldoende hoog moet zijn, moet de concentratie van elke norm, zoals berekend vanuit de kalibratiecurve, altijd

▼M6

tussen 70 en 120 % van de nominale concentratie van die norm vallen. Als de nominale concentraties gaan afwijken van de kalibratieregressielijn (bijvoorbeeld bij lagere concentraties), kan het noodzakelijk zijn de kalibratiecurve te splitsen in een laag en een hoog bereik of een non-lineair model toe te passen dat past bij de absorptiegegevens. Als de curve wordt gesplitst, moet voor beide lijnsegmenten gelden dat $R^2 > 0,99$.

44. De detectiegrens wordt gedefinieerd als de concentratie van de laagste analysenorm en de kwantificeringsgrens als de concentratie van de laagste analysenorm vermenigvuldigd met de laagste verdunningsfactor.

45. Op elke dag dat er vitellogeninetests worden uitgevoerd, wordt een verrijkt monster geanalyseerd dat is gemaakt volgens een testonafhankelijke referentienorm (aanhangsel 7). De verhouding tussen de verwachte concentratie en de gemeten concentratie wordt gerapporteerd samen met de resultaten van elke set tests die op die dag is uitgevoerd.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van biomerkerreacties door variantieanalyse

46. Om mogelijke endocriene activiteit van een stof te constateren, worden de reacties van behandel- en controlegroepen vergeleken met behulp van variantieanalyse. Wanneer een oplosmiddelcontrole wordt gebruikt, moet een passende statistische test worden uitgevoerd op het verdunningswater en de oplosmiddelcontroles voor elk eindpunt. Richtsnoeren voor de behandeling van gegevens over verdunningswater en oplosmiddelcontroles in de daaropvolgende statistische analyse zijn te vinden in het OESO-document over actuele benaderingen van de statistische analyse van milieugiftigheidsgegevens (OESO 2006c) (27). Alle gegevens over biologische reacties moeten worden geanalyseerd en gerapporteerd naar geslacht. Als niet wordt voldaan aan de vereiste voorwaarden voor parametermethoden — niet-normale verdeling (bijvoorbeeld de test van Shapiro-Wilk) of heterogene variantie (test van Barlett of test van Levene) — moet worden overwogen om de gegevens te transformeren om varianties te homogeniseren alvorens de variantieanalyse of een gewogen variantieanalyse uit te voeren. De (parametrische) test van Dunnett op meerdere paarsgewijze vergelijkingen of een (niet-parametrische) Mann-Whitney-test met Bonferroni-correctie kan worden gebruikt voor een niet-monotone dosisrespons. Andere statistische tests zijn mogelijk (bijvoorbeeld die van Jonckheere-Terpstra of van Williams) als de dosisrespons bij benadering monotoon is. In aanhangsel 8 wordt een statistisch stroomdiagram gepresenteerd dat kan helpen bij de keuze voor het gebruik van de meest geschikte statistische test. Aanvullende informatie is ook te vinden in het OESO-document over actuele benaderingen van de statistische analyse van milieugiftigheidsgegevens (27).

Rapportage van testresultaten

47. Het onderzoeksrapport moet de volgende gegevens bevatten:

Testfaciliteit:

— verantwoordelijke medewerkers en hun verantwoordelijkheden in het onderzoek;

— elk laboratorium dient aantoonbare bekwaamheid in het gebruik van een aantal representatieve chemische stoffen te hebben.

Teststof:

— karakterisering van de teststof;

— fysische aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

▼**M6**

— methode en frequentie van bereiding van testconcentraties;

— informatie over stabiliteit en biologische afbreekbaarheid.

Oplosmiddel:

— karakterisering van oplosmiddel (kenmerken, gebruikte concentratie);

— motivering van de keuze van het oplosmiddel (wanneer dat geen water is).

Proefdieren:

— soort en stam;

— leverancier en diens specifieke faciliteit;

— leeftijd van vissen bij aanvang test en reproductie-/paaistatus;

— gegevens over acclimatiseringsprocedure voor de dieren;

— lichaamsgewicht van vissen bij aanvang blootstelling (van een substeekproef uit totaal aantal vissen).

Testomstandigheden:

— gebruikte testprocedure (testtype, densiteit, bezettingsgraad, enz.);

— bereidingswijze van stamoplossingen en testconcentraties;

— de nominale testconcentraties, wekelijks gemeten concentraties van de testoplossingen en gebruikte analysemethode, gemiddelden van de gemeten waarden en standaarddeviaties in de testbakken, en bewijs dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in ware oplossing;

— karakteristieken van verdunningswater (waaronder pH-graad, hardheid, alkaliteit, temperatuur, opgeloste zuurstofconcentratie, chloorresiduen, totaalgehalte aan organische koolstof, zwevende deeltjes en andere metingen die zijn gedaan);

— de waterkwaliteit in testbakken: pH-graad, hardheid, temperatuur en opgeloste zuurstofconcentratie;

— gedetailleerde informatie over voeding (e.g. soort voeding, oorsprong, toegediende hoeveelheid en frequentie, en indien beschikbaar analyses van relevante verontreinigende stoffen (bijvoorbeeld PCB's, PAK's en organochloorpesticiden).

Resultaten:

— bewijs dat de controles voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria van de test;

— gegevens over de sterftecijfers in de testconcentraties en de controlegroepen;

— de gebruikte statistische analysetechnieken, behandeling van gegevens en motivering van toegepaste technieken;

— gegevens over biologische waarnemingen van de morfologie, waaronder secundaire geslachtskenmerken en vitellogenine;

▼M6

— resultaten van data-analyses, bij voorkeur in de vorm van tabellen en diagrammen;

— gevallen van abnormale reacties van vissen en zichtbare effecten die zijn veroorzaakt door de teststof.

RICHTSNOEREN VOOR INTERPRETATIE EN AANVAARDING VAN DE TESTRESULTATEN

48. Dit hoofdstuk bevat een aantal overwegingen die in aanmerking dienen te worden genomen bij de interpretatie van testresultaten voor de verschillende gemeten eindpunten. De resultaten moeten zorgvuldig worden geïnterpreteerd wanneer de teststof klaarblijkelijk openlijke toxiciteit veroorzaakt of gevolgen heeft voor de algemene conditie van het proefdier.

49. Teneinde een zinvolle interpretatie van de gegevens mogelijk te maken, moet bij de vaststelling van het bereik van testconcentraties erop worden toegezien dat de maximale toegelaten concentratie niet wordt overschreden. Het is van belang dat er ten minste één behandeling is zonder tekenen van toxische effecten. Tekenen van ziekte en van toxische effecten dienen grondig te worden beoordeeld en gerapporteerd. Mogelijk wordt de productie van VTG bij vrouwtjes bijvoorbeeld ook beïnvloed door algemene toxiciteit en niet-endocriene toxische werkingsmechanismen, zoals hepatotoxiciteit. De interpretatie van effecten kan echter worden versterkt door andere behandelniveaus die niet zijn verstoord door systemische toxiciteit.

50. Er zijn enkele aspecten die in aanmerking moeten worden genomen bij de aanvaarding van testresultaten. Als richtsnoer geldt dat de VTG-niveaus in controlegroepen van mannetjes en vrouwtjes zich van elkaar moeten onderscheiden met ongeveer een factor drie bij de Amerikaanse dikkop-elritsen en de zebravissen en met ongeveer een factor één bij de Japanse rijstvisjes. Voorbeelden van het waardenbereik dat wordt aangetroffen in controle- en behandelgroepen zijn beschikbaar in de validatierapporten (1, 2, 3, 4). Hoge VTG-waarden bij controlemannetjes zouden ten koste kunnen gaan van de gevoeligheid van de test en het vermogen om zwakke oestrogene agonisten te detecteren. Lage VTG-waarden bij controlevrouwtjes zouden ten koste kunnen gaan van de gevoeligheid van de test en het vermogen om aromataseremmers en oestrogene antagonisten te detecteren. Deze richtsnoer is gebaseerd op de validatiestudies.

51. Als een laboratorium de test niet eerder heeft uitgevoerd of als er sprake is van materiële wijzigingen (bijvoorbeeld een verandering van visstam of leverancier), wordt aanbevolen een technische bekwaamheidsstudie uit te voeren. Het verdient aanbeveling stoffen te gebruiken die uiteenlopende werkingsmechanismen of effecten op een aantal van de testeindpunten bestrijken. In de praktijk wordt elk laboratorium aangemoedigd zijn eigen historische controlegegevens voor mannetjes en vrouwtjes samen te stellen en een positieve controlestof te gebruiken voor oestrogene activiteit (bijvoorbeeld met 100 ng/l 17β-estradiol, of een bekende zwakke agonist) die resulteert in een verhoogde VTG-waarde bij mannetjesvissen, alsmede een positieve controlestof voor aromataseremming (bijvoorbeeld 300 µg/l fadrozole of prochloraz) die resulteert in een verlaagde VTG-waarde bij vrouwtjesvissen, en een positieve controlestof voor androgene activiteit (bijvoorbeeld 5 µg/l 17β-trenbolone) die leidt tot de inductie van secundaire geslachtskenmerken bij vrouwelijke Amerikaanse dikkop-elritsen en Japanse rijstvisjes. Al deze gegevens kunnen worden vergeleken met beschikbare gegevens uit de validatiestudies (1, 2, 3) om de bekwaamheid van het laboratorium te waarborgen.

52. In het algemeen moeten vitellogeninemetingen als positief worden beschouwd als er een statistisch significante toename van de VTG-waarde bij mannetjes optreedt ($p < 0,05$), of een statistisch significante afname bij vrouwtjes ($p < 0,05$), althans bij de hoogste geteste dosis, in vergelijking met de controlegroep, en in afwezigheid van tekenen van algemene toxiciteit. Een positief resultaat wordt verder ondersteund doordat een biologisch plausibele relatie tussen de dosis en de responscurve wordt aangetoond. Zoals vermeld, is de daling van de vitellogeninewaarde mogelijk niet geheel van endocriene oorsprong. Toch dient een positief resultaat in het algemeen te worden opgevat als bewijs van endocriene activiteit *in vivo* en normaal gesproken te leiden tot maatregelen voor verdere opheldering.

▼**M6**

LITERATUUR

(1) OESO (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) OESO (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) OESO (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 JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (bekeken 18.9.2008).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Ongepubliceerd verslag van 15 december 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 blz.

(6) OESO, 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 and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, 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 JM, Nash JP, Korsgaard B, 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 GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (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 GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (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 LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (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 GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 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, Brussel, België.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., 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 GI, Korsgaard B, Pedersen KL, 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, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, 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 IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, 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 and 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 GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (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, 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. No. 23. ENV/JM/MONO(2000)6

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; blz. 69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 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, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and 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) OESO (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

(28) OESO (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼M6

Aanhangsel 1

Afkortingen en definities

Chemische stof: een stof of mengsel.

VC: variatiecoëfficiënt.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

Densiteit: het natte gewicht van de vissen per volume water.

Bezettingsgraad: het aantal vissen per volume water.

VTG (Vitellogenine): phospholipoglycoproteïne precursor van eidooierproteïne die gewoonlijk voorkomt bij seksueel actieve vrouwtjes van alle ovipare soorten.

HPG-as: hypothalamus-hypofyse-gonade-as.

MTC: maximale toegelaten concentratie, dat wil zeggen circa 10 % van de LC_{50}.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M6

Aanhangsel 2

Proefvoorwaarden voor de endocriene screeningtest bij vissen

1. Aanbevolen soort	**Amerikaanse dikkop-elrits** (*Pimephales promelas*)	**Japans rijstvisje** (*Oryzias latipes*)	**Zebravis** (*Danio rerio*)
2. Type test:	Doorstroomtest	Doorstroomtest	Doorstroomtest
3. Watertemperatuur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Verlichting	Fluorescentielampen (breed spectrum)	Fluorescentielampen (breed spectrum)	Fluorescentielampen (breed spectrum)
5. Lichtsterkte	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, of 50-100 ft-c (laboratoriumomgeving)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, of 50-100 ft-c (laboratoriumomgeving)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, of 50-100 ft-c (laboratoriumomgeving)
6. Fotoperiode (overgangen naar zonsopgang/-ondergang zijn optioneel, maar worden niet noodzakelijk geacht)	16 uur licht, 8 uur donker	12-16 uur licht, 12-8 uur donker	12-16 uur licht, 12-8 uur donker
7. Densiteit	< 5 g per l	< 5 g per l	< 5 g per l
8. Inhoud testkamer	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Hoeveelheid testoplossing	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Verwisselingen van testoplossingen	Minimaal 6 per dag	Minimaal 5 per dag	Minimaal 5 per dag
11. Leeftijd van testorganismen	Zie punt 20	Zie punt 20	Zie punt 20
12. Het natte gewicht van volwassen vis bij benadering (g)	Vrouwtjes: 1,5 ± 20 % Mannetjes: 2,5 ± 20 %	Vrouwtjes: 0,35 ± 20 % Mannetjes: 0,35 ± 20 %	Vrouwtjes: 0,65 ± 20 % Mannetjes: 0,4 ± 20 %
13. Aantal vissen per testbak	6 (2 mannetjes, 4 vrouwtjes)	10 (5 mannetjes, 5 vrouwtjes)	10 (5 mannetjes, 5 vrouwtjes)
14. Aantal behandelingen	= 3 (plus afdoende controles)	= 3 (plus afdoende controles)	= 3 (plus afdoende controles)
15. Aantal bakken per behandeling	Min. 4	Min. 2	Min. 2
16. Aantal vissen per testconcentratie	16 volwassen vrouwtjes en 8 mannetjes (4 vrouwtjes en 2 mannetjes in elke replicaatbak)	10 volwassen vrouwtjes en 10 mannetjes (5 vrouwtjes en 5 mannetjes in elke replicaatbak)	10 volwassen vrouwtjes en 10 mannetjes (5 vrouwtjes en 5 mannetjes in elke replicaatbak)
17. Voederregime	Levende of bevroren volwassen of larvale pekelkreeftjes twee of drie maal daags (naar believen), in de handel verkrijgbaar voedsel, of een combinatie van beide	Larvale pekelkreeftjes twee of drie maal daags (naar believen), in de handel verkrijgbaar voedsel, of een combinatie van beide	Larvale pekelkreeftjes twee of drie keer daags (naar believen), in de handel verkrijgbaar voedsel, of een combinatie van beide

▼M6

18. Beluchting	Geen, tenzij concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % van de verzadigingswaarde van de lucht komt	Geen, tenzij concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % van de verzadigingswaarde van de lucht komt	Geen, tenzij concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % van de verzadigingswaarde van de lucht komt
19. Verdunningswater	Schoon oppervlakte- of bronwater, synthetisch water of ontchloord kraanwater	Schoon oppervlakte- of bronwater, synthetisch water of ontchloord kraanwater	Schoon oppervlakte- of bronwater, synthetisch water of ontchloord kraanwater
20. Pre-blootstellingsperiode	7 dagen (aanbevolen)	7 dagen (aanbevolen)	7 dagen (aanbevolen)
21. Duur van de blootstelling	21 dagen	21 dagen	21 dagen
22. Biologische eindpunten	overleving gedrag sec. gesl.kenmerken VTG	overleving gedrag sec. gesl.kenmerken VTG	overleving gedrag VTG
23. Aanvaardbaarheid van de test	Opgeloste zuurstof > 60 % van verzadigingswaarde; gem. temperatuur van 25 ± 2 °C; 90 % overlevende vissen in de controlegroepen; gemeten testconcentraties binnen 20 % van gemiddelde gemeten waarden per behandelingsniveau.	Opgeloste zuurstof > 60 % van verzadigingswaarde; gem. temperatuur van 24 ± 2 °C; 90 % overlevende vissen in de controlegroepen; gemeten testconcentraties binnen 20 % van gemiddelde gemeten waarden per behandelingsniveau.	Opgeloste zuurstof > 60 % van verzadigingswaarde; gem. temperatuur van 26 ± 2 °C; 90 % overlevende vissen in de controlegroepen; gemeten testconcentraties binnen 20 % van gemiddelde gemeten waarden per behandelingsniveau.

▼**M6**

Aanhangsel 3

Enkele chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater

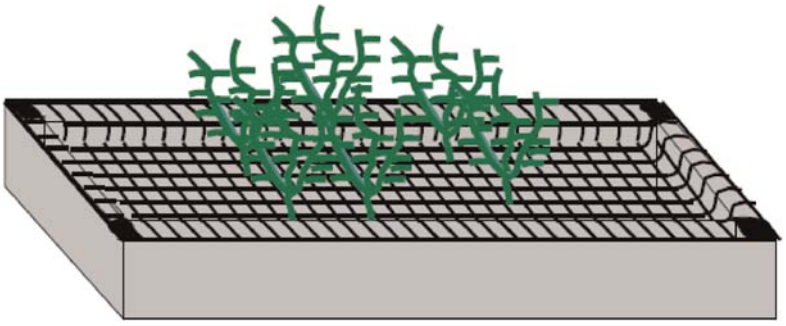
Onderdeel	Concentraties
Deeltjes	< 20 mg/l
Totale hoeveelheid organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonium	< 1 µg/l
Chloorresiduen	< 10 µg/l
Totale hoeveelheid organofosfaat-bestrijdingsmiddelen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organochloor-bestrijdingsmiddelen plus polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organisch chloor	< 25 ng/l

▼**M6**

Aanhangsel 4A

Kuitsubstraat voor de zebravis

Paaiblad: geheel glazen instrumentenschaal, bijvoorbeeld van 22 × 15 × 5,5 cm (l × b × d), bedekt met verwijderbaar roestvrijstalen gaas (met openingen van 2 mm breed). Het gaas moet de opening van de instrumentenschaal bedekken op een niveau dat onder de rand ligt.



Op het gaas dient kuitsubstraat te worden bevestigd. Het moet de vissen een structuur bieden die ze kunnen binnengaan. Kunstmatige aquariumplanten van groen kunststofmateriaal zijn hiervoor bijvoorbeeld geschikt. (N.B. Houd rekening met mogelijke adsorptie van de teststof aan het kunststofmateriaal.) Het kunststofmateriaal moet gedurende voldoende tijd worden uitgeloogd in een ruime hoeveelheid warm water om te waarborgen dat geen chemische stoffen kunnen worden afgegeven aan het testwater. Bij het gebruik van glasmateriaal moet erop worden toegezien dat de vissen niet gewond of beklemd raken tijdens hun krachtige bewegingen.

De afstand tussen het blad en de glazen wanden dient ten minste 3 cm te bedragen om te waarborgen dat het paaien niet buiten het blad plaatsvindt. De op het blad gelegde eitjes vallen door het gaas; 45-60 minuten na het begin van de belichting kunnen er monsters van worden genomen. De transparante eitjes kleven niet en kunnen gemakkelijk worden geteld met behulp van transversaal licht. Wanneer 5 vrouwtjes per bak worden gebruikt, kunnen aantallen tot 20 per dag als laag, tot 100 per dag als gemiddeld en boven de 100 per dag als hoog worden beschouwd. Zo laat mogelijk in de avond of zo vroeg mogelijk in de ochtend moet het paaiblad worden verwijderd om de eitjes te verzamelen en vervolgens het paaiblad weer aan te brengen in de testbak. De tijd tussen het verwijderen en weer aanbrengen van het blad mag niet langer dan 1 uur bedragen omdat anders de komst van het kuitsubstraat kan leiden tot afzonderlijk paren en paaien op een ongebruikelijk tijdstip. Als de situatie met zich meebrengt dat het paaiblad later moet worden aangebracht, dient dit ten minste 9 uur na het begin van de belichting te geschieden. Op zo'n laat tijdstip wordt geen paaigedrag meer uitgelokt.

▼M6

Aanhangsel 4B

Kuitsubstraat voor de amerikaanse dikkop-elrits

In elk van de testkamers worden twee of drie gecombineerde paaibuizen en -bladen van kunststof/keramiek/glas of roestvrij staal geplaatst, bijvoorbeeld een grijze halfronde buis van 80 mm lengte op een blad met opstaande rand van 130 mm lengte (zie afbeelding). Goed geacclimatiseerde buizen van pvc of keramiek zijn aantoonbaar geschikt als kuitsubstraat (Thorpe et al., 2007).

Aanbevolen wordt geschuurde buizen te gebruiken om de adhesie te verbeteren. Ook moet het blad worden afgeschermd om te voorkomen dat de vissen de gevallen eitjes bereiken, tenzij de adhesiewerking voor het gebruikte kuitsubstraat is aangetoond.



De bladbodem is zo ontworpen dat deze alle eitjes bevat die zich niet aan het buisoppervlak hechten en anders op de bodem van de bak zouden vallen (en de eitjes die rechtstreeks op de platte kunststofbodem worden gelegd). Alle kuitsubstraten moeten voor gebruik minimaal 12 uur worden uitgeloogd in verdunningswater.

VERWIJZINGEN

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

Aanhangsel 5A

Beoordeling van secundaire geslachtskenmerken bij amerikaanse dikkop-elritsen voor de opsporing van bepaalde endocrien actieve chemische stoffen

Overzicht

Potentieel belangrijke kenmerken van het fysieke voorkomen van volwassen Amerikaanse dikkop-elritsen tijdens tests met hormoonontregelaars zijn de lichaamskleur (licht/donker), kleurpatronen (aan- of afwezigheid van verticale banen), lichaamsvorm (vorm van de kop en borstregio, zwelling van de buik) en speciale secundaire geslachtskenmerken (aantal en grootte van nuptiale papillen, grootte van de nekverdikking en de legbuis).

Nuptiale papillen bevinden zich op de kop (nekverdikking) van seksueel actieve mannetjes van de Amerikaanse dikkop-elrits, gewoonlijk in een tweezijdig symmetrisch patroon (Jensen et al. 2001). Controlevrouwtjes en jonge mannetjes en vrouwtjes vertonen geen papillaire ontwikkeling (Jensen et al. 2001). Er kunnen zich tot acht afzonderlijke papillen rond de ogen en tussen de neusgaten van de mannetjes bevinden. De meeste en de grootste papillen worden in twee evenwijdige lijnen direct onder de neusgaten en boven de bek aangetroffen. Veel vissen hebben groepen papillen onder de onderkaak. Die welke het dichtst bij de bek zitten, vormen meestal één paar, terwijl de reeks dichter bij de buik kan bestaan uit maximaal vier papillen. Het feitelijke aantal papillen is zelden meer dan 30 (bereik van 18-28; Jensen et al. 2001). De overheersende papillen (in aantal) zijn aanwezig als een enkele, relatief ronde structuur met een hoogte die ongeveer gelijk is aan de diameter. De meeste seksueel actieve mannetjes hebben ook ten minste een aantal papillen die zo vergroot en geprononceerd zijn dat ze niet als afzonderlijke structuren te onderscheiden zijn.

Sommige soorten hormoonverstorende stoffen kunnen leiden tot abnormaal optreden van bepaalde secundaire geslachtskenmerken bij de andere sekse. Zo kunnen androgene receptoragonisten, zoals 17β-methyltestosteron of 17β-trenbolone, bijvoorbeeld bij vrouwelijke Amerikaanse dikkop-elritsen de ontwikkeling van nuptiale papillen veroorzaken (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), terwijl oestrogene receptoragonisten het aantal of de grootte van nuptiale papillen bij mannetjes kunnen verkleinen (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Hierna volgt een beschrijving van de kenmerken van nuptiale papillen bij Amerikaanse dikkop-elritsen op basis van procedures die worden gebruikt in het laboratorium van het Amerikaanse Environmental Protection Agency in Duluth (Minnesota). Specifieke producten en/of apparaten kunnen worden vervangen door vergelijkbare beschikbare materialen.

De beste weergave wordt bereikt met behulp van een verlicht vergrootglas of 3x vergrotende verlichte ontleedmicroscoop. Geef de vis dorsaal en met de kop naar voren (in de richting van de kijker) weer.

a) Plaats de vis op een petrischaaltje (bijvoorbeeld 100 mm doorsnee), met de kop naar voren en de buikzijde omlaag. Stel de zoeker scherp om identificatie van papillen mogelijk te maken. Rol de vis langzaam en voorzichtig van zijde naar zijde om gebieden met papillen te identificeren. Tel en beoordeel de papillen.

b) Herhaal de waarneming op het ventrale kopoppervlak door de vis met de rug naar voren op het petrischaaltje te leggen.

c) De waarnemingen moeten per vis binnen twee minuten voltooid zijn.

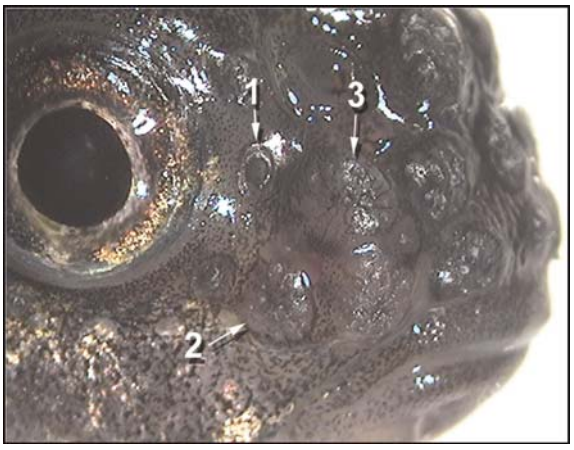
▼M6

Tellen en beoordelen van de papillen

Er zijn zes specifieke gebieden aangewezen die moeten worden beoordeeld op aanwezigheid en ontwikkeling van papillen bij volwassen Amerikaanse dikkopelritsen. Er is een sjabloon ontwikkeld om de locatie en de hoeveelheid papillen in kaart te brengen (zie einde van dit aanhangsel). Het aantal papillen wordt genoteerd, waarbij de grootte per organisme als volgt kan worden aangegeven: 0-afwezig, 1-aanwezig, 2-vergroot en 3-geprononceerd (fig. 1).

De score 0-afwezig betekent dat geen enkele papil aanwezig is. De score 1-aanwezig wordt toegekend aan elke papil die uit één punt bestaat waarvan de hoogte bijna gelijk is aan de doorsnee (diameter). De score 2-vergroot wordt toegekend aan weefsel dat eruitziet als een asterisk, gewoonlijk met een brede ronde basis met groeven of sporen die vanuit het midden lopen. De papilhoogte is meestal grilliger maar kan soms enigszins afgerond zijn. De score 3-geprononceerd geldt voor een tamelijk grote, afgeronde papil met een minder duidelijk gedefinieerde structuur. Soms komen deze papillen samen zodat ze één geheel vormen op één of meer gebieden (B, C en D, hierna beschreven). Kleur en vorm zijn soortgelijk aan score 2 maar af en toe tamelijk ongedifferentieerd. Toepassing van dit beoordelingssysteem leidt in het algemeen tot een totale papilscore van < 50 bij een normaal controlemannetje met 18 tot 20 papillen (Jensen et al. 2001).

Figuur 1



Het werkelijke aantal papillen kan bij sommige vissen groter zijn dan het aantal vakjes in de sjablonen (aanhangsel A) voor een bepaald gebied. Als dit het geval is, kunnen extra scorecijfers worden genoteerd in of naast het kader. De sjabloon hoeft derhalve geen symmetrie te vertonen. Een aanvullende methode om papillen in kaart te brengen die paarsgewijs of verticaal verbonden langs het horizontale vlak van de bek voorkomen, is het noteren van dubbele scores voor twee papillen in één vakje.

In kaart te brengen gebieden:

A — Papillen rond het oog. Van dorsaal naar ventraal getekend rond de voorste oogrand. Gewoonlijk meerdere bij volwassen controlemannetjes, niet aanwezig bij controlevrouwtjes, in het algemeen in paren (één bij elk oog) of één bij vrouwtjes die zijn blootgesteld aan androgenen.

B — Papillen tussen de neusgaten, (zintuigkanaalporiën). Normaal in paren bij controlemannetjes met hogere scores (2-vergroot of 3-geprononceerd). Niet aanwezig bij controlevrouwtjes, wel enige incidentie en ontwikkeling bij vrouwtjes die zijn blootgesteld aan androgenen.

C — Papillen onmiddellijk voor de neusgaten, evenwijdig aan de bek. Gewoonlijk vergroot of geprononceerd bij volwassen controlemannetjes. Aanwezig of vergroot bij minder ontwikkelde mannetjes of met androgenen behandelde vrouwtjes.

▼**M6**

D — Papillen evenwijdig aan de beklijn. In het algemeen ontwikkeld bij controlemannetjes. Afwezig bij controlevrouwtjes maar aanwezig bij vrouwtjes die zijn blootgesteld aan androgenen.

E — Papillen op de onderkaak, dicht bij de bek, meestal klein en gewoonlijk in paren. Verschillend bij controlemannetjes of behandelde mannetjes, en bij behandelde vrouwtjes.

F — Papillen aan de buikzijde van E. Gewoonlijk klein en in paren. Aanwezig bij controlemannetjes en aan androgenen blootgestelde vrouwtjes.

VERWIJZINGEN

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Papillensjabloon

ID _____

Datum _____

Totaalscore _____

Numerieke score

1-aanwezig

2-vergroot

3-geprononceerd

	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

Aanhangsel 5B

Beoordeling van secundaire geslachtskenmerken bij japanse rijstvisjes voor de opsporing van bepaalde endocrien actieve chemische stoffen

Hierna volgt een beschrijving van het meten van de papillaire uitsteeksels (*) die de secundaire geslachtskenmerken van het Japanse rijstvisje (Oryzias latipes) vormen.

(*) Papillaire uitsteeksels komen gewoonlijk alleen voor bij volwassen mannetjes en worden aangetroffen op de vinstralen van de tweede tot en met zevende of achtste vin, gerekend vanaf het achtereinde van de anaalvin (fig. 1 en 2). De uitsteeksels komen echter zelden voor op de eerste vinstraal vanaf het achtereinde van de anaalvin. Deze operationele standaardprocedure (Standard Operating Procedure — SOP) heeft betrekking op het meten van uitsteeksels op de eerste vinstraal (het nummer van de vinstraal verwijst in deze SOP naar de volgorde vanaf het achtereinde van de anaalvin).

1) Na de excisie van de lever (aanhangsel 6) wordt het karkas in een conische reageerbuis met ongeveer 10 ml 10 % neutraal gebufferde formaline geplaatst (hoofd boven, staart beneden). Als de geslachtsklier is ingespoten met een andere oplossing dan 10 % neutraal gebufferde formaline, wordt met een scheermes het karkas dwars doorgesneden tussen de regio vóór de anaalvin en de anus, waarbij zorgvuldig dient te worden vermeden dat de geslachtsopening en de geslachtsklier zelf beschadigd raken (fig. 3). Plaats de craniale zijde van de vis in de fixeeroplossing om de geslachtsklier te conserveren en de staartzijde van de vis in de 10 % neutraal gebufferde formaline zoals hierboven beschreven.

2) Houd, nadat de vis in 10 % neutraal gebufferde formaline is geplaatst, het voorste deel van de anaalvin met een pincet ongeveer 30 seconden omgevouwen om de anaalvin open te houden. Wanneer u de anaalvin met een pincet beetpakt, pakt u voorzichtig een paar vinstralen in het voorste gedeelte beet om geen krassen op de papillaire uitsteeksels te veroorzaken.

3) Nadat u de anaalvin ongeveer 30 seconden open hebt gehouden, bewaart u het karkas van de vis bij kamertemperatuur in 10 % neutraal gebufferde formaline totdat de papillaire uitsteeksels worden gemeten (ten minste 24 uur na de fixatie).

Meting

1) Nadat het karkas van de vis ten minste 24 uur is gefixeerd in de 10 % neutraal gebufferde formaline, haalt u het uit de conische reageerbuis en veegt u de formaline af op het filterpapier (of keukenpapier).

2) Leg de vis met de buik naar boven. Knip de anaalvin met een kleine ontleedschaar voorzichtig af (bij voorkeur met een kleine hoeveelheid ondersteunend been).

3) Neem het voorste deel van de afgesneden anaalvin met een pincet en leg het op een glasplaatje met een aantal druppels water. Bedek de anaalvin vervolgens met een dekglaasje. Pas op dat u de papillaire uitsteeksels niet bekrast wanneer u de anaalvin met het pincet oppakt.

4) Bepaal het nummer van de verbindingsplaat met papillaire uitsteeksels met behulp van de teller onder een biologische microscoop (staande microscoop of omgekeerde microscoop). De papillaire uitsteeksels zijn herkenbaar wanneer een kleine uitstulping zichtbaar is op de achterrand van de verbindingsplaat. Noteer het nummer van de verbindingsplaat en het aantal papillaire

▼M6

uitsteeksels voor elke vinstraal in het werkblad (bijvoorbeeld eerste vinstraal: 0, tweede vinstraal: 10, derde vinstraal: 12, enz.) en voer het totaal van deze aantallen voor elke afzonderlijke vis in in het Excel-spreadsheet. Indien nodig kunt u een foto van de anaalvin maken en het aantal verbindingsplaten met papillaire uitsteeksels op de foto tellen.

5) Na de meting bewaart u de anaalvin in de bij (1) genoemde conische reageerbuis.

Fig. 1.

Diagram met verschillen naar geslacht in vorm en grootte van de anaalvin. A = mannetje; B = vrouwtje. 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.

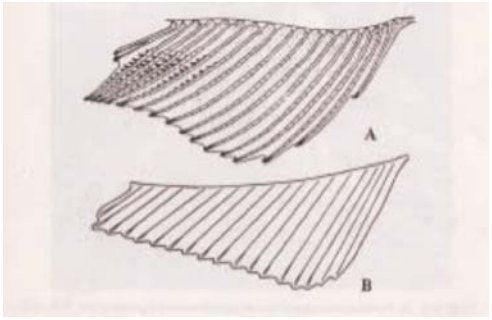
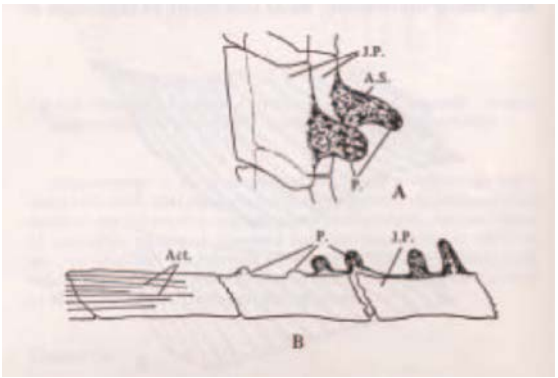


Fig. 2.

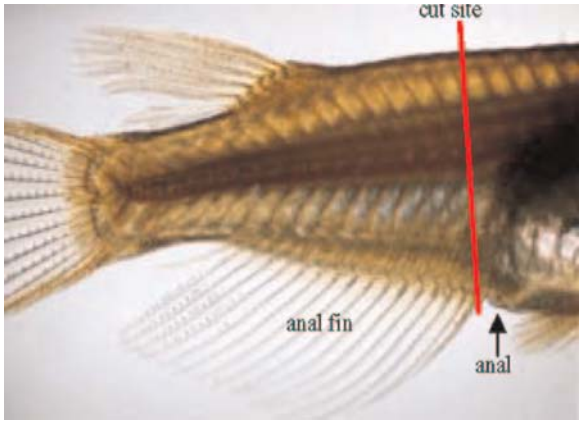
A. Uitsteeksels op verbindingsplaten van anaalvinstralen. J.P. = verbindingsplaat; A.S. = axiale ruimte; P. = uitsteeksel. B. Distaal uiteinde van vinstraal. Actinotrichia (Act.) bevinden zich aan de punt. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼M6

Fig. 3.

Foto van vis met de plaats van de snede voor het fixeren van de geslachtsklier in een andere fixeeroplossing dan 10 % neutraal gebufferde formaline. In dat geval wordt het karkas doorgesneden met een scheermes tussen de regio vóór de anaalvin en de anus (rode streep), en wordt de kopzijde van de vis in de fixeeroplossing voor de geslachtsklier en de staartzijde van de vis in de 10 % neutraal gebufferde formaline geplaatst.



▼M6

Aanhangsel 6

Aanbevolen procedures voor monsterneming ten behoeve van vitellogenine-analyse

Er moet zorgvuldig worden voorkomen dat kruisbesmetting tussen VTG-monsters van mannetjes en vrouwtjes optreedt.

Procedure 1A: Amerikaanse dikkop-elrits: bloedafname uit de staartader of -slagader

Na anesthesering wordt de staartwortel gedeeltelijk afgesneden met een ontleedmesje en wordt bloed afgenomen uit de staartader of -slagader met een geheparinieerd microhematocriet capillair buisje. Na de bloedafname wordt het plasma snel geïsoleerd door middel van centrifugeren gedurende 3 minuten bij 15 000 g (of gedurende 10 minuten bij 15 000 g en een temperatuur van 4 °C). Indien gewenst kan na het centrifugeren het hematocrietpercentage worden bepaald. Het plasmadeel wordt vervolgens uit het microhematocriet buisje genomen en in een centrifugebuis met 0,13 eenheden aprotinine (een proteaseremmer) bewaard bij – 80 °C totdat de vitellogeninebepaling kan plaatsvinden. Afhankelijk van de grootte van de Amerikaanse dikkop-elrits (die sekse-afhankelijk is) lopen de af te nemen hoeveelheden plasma meestal uiteen van 5 tot 60 microliter per vis (Jensen et al. 2001).

Procedure 1B: Amerikaanse dikkop-elrits: bloedafname uit het hart

Als alternatief kan ook bloed worden afgenomen door middel van een hartpunctie met een geheparinieerde injectiespuit (1 000 eenheden heparine per ml). Het bloed wordt overgebracht naar eppendorfbuizen (op ijs bewaard) en vervolgens gecentrifugeerd (5 minuten bij 7 000 g en kamertemperatuur). Het plasma moet daarna worden overgebracht naar schone eppendorfbuizen (in aliquots als de hoeveelheid plasma dit mogelijk maakt) en onmiddellijk worden bevroren en bewaard bij – 80 °C totdat het wordt geanalyseerd (Panter et al. 1998).

Procedure 2A: Japans rijstvisje: excisie van de lever

De testvissen uit de testkamer scheppen

(1) Testvissen moeten uit de testkamer worden gehaald met een klein schepnet. Pas op dat u de vissen niet in andere testkamers laat vallen.

(2) In principe moeten de testvissen in deze volgorde worden opgeschept: controle, oplosmiddelcontrole (indien van toepassing), laagste concentratie, middelste concentratie, hoogste concentratie en positieve controle. Bovendien moeten alle mannetjes uit één testkamer worden geschept voordat de vrouwtjes uit die testkamer worden opgeschept.

(3) Het geslacht van elke vis wordt vastgesteld op basis van uitwendige secundaire geslachtskenmerken (bijvoorbeeld de vorm van de anaalvin).

(4) Zet de testvissen in een transportbak en breng deze naar het werkstation voor excisie van de lever. Controleer voor de zekerheid de labels van de testkamer en de transportbak om te verifiëren dat zowel het aantal testvissen dat uit de testkamer is verwijderd als het aantal vissen dat in de testkamer overblijft, het verwachte aantal is.

(5) Als het geslacht niet kan worden bepaald aan de hand van het uiterlijk van de vissen, verwijdert u alle vissen uit de testkamer. In dat geval moet het geslacht worden vastgesteld door waarneming van de geslachtsklier of secundaire geslachtskenmerken onder een stereoscopische microscoop.

▼**M6**

Excisie van de lever

(1) Breng de testvis van de transportbak over naar de anesthetische oplossing met het kleine schepnet.

(2) Leg de testvis, nadat deze is verdoofd, op het filterpapier (of keukenpapier) met een gewoon pincet. Grijp met het pincet de testvis bij de kop om te voorkomen dat de staart breekt.

(3) Dep het water op het oppervlak van de testvis op met het filterpapier (of keukenpapier).

(4) Leg de vis met de buik naar boven. Breng met een ontleedschaar een kleine dwarsincisie aan ergens tussen de nekregio aan de buikzijde en het midden van de buikregio.

(5) Steek de ontleedschaar in de kleine incisie en snij de buik in vanaf een punt aan de staartzijde van de kieuwmantel tot de craniale zijde van de anus langs de middellijn van de buik. Pas op dat u de ontleedschaar niet te diep inbrengt om te voorkomen dat de lever en de geslachtsklier beschadigd raken.

(6) Voer de volgende handelingen uit onder de stereoscopische microscoop.

(7) Leg de testvis met de buikzijde omhoog op het keukenpapier (een glazen petrischaaltje en glasplaatje zijn ook beschikbaar).

(8) Trek de wanden van de buikholte met een precisiepincet opzij en breng de inwendige organen naar buiten. Indien nodig mogen de inwendige organen ook naar buiten worden gebracht door één zijde van de buikholtewand te verwijderen.

(9) Leg het onderling verbonden deel van de lever en de galblaas bloot met behulp van nog een precisiepincet. Neem vervolgens het galkanaal en snij de galblaas af. Wees voorzichtig, zodat de galblaas niet breekt.

(10) Neem de slokdarm en snij op dezelfde wijze het spijsverteringskanaal los van de lever. Wees voorzichtig, zodat de inhoud niet uit het spijsverteringskanaal lekt. Snij het staarteinde van het spijsverteringskanaal los van de anus en verwijder het kanaal uit de buikholte.

(11) Snij de vetmassa en andere weefsels rond de lever weg. Wees voorzichtig, zodat er geen krassen op de lever komen.

(12) Pak de leverpoort met het precisiepincet en verwijder de lever uit de buikholte.

(13) Leg de lever op het glasplaatje. Gebruik het precisiepincet om zo nodig al het extra vet en uitwendig weefsel (bijvoorbeeld buikranden) van het leveroppervlak te verwijderen.

(14) Bepaal het gewicht van de lever, met een microbuisje van 1,5 ml als tarra, met behulp van een elektronische precisiebalans. Noteer de waarde op het werkblad (nauwkeurigheid: 0,1 mg). Verifieer de identificatiegegevens op het label van het microbuisje.

(15) Sluit het kapje van het microbuisje met de lever. Bewaar de buis in een koel- of ijsrek.

(16) Reinig de incisie-instrumenten na het uitnemen van één lever of vervang ze door schone exemplaren.

▼M6

(17) Verwijder op bovenvermelde wijze de lever uit alle vissen in de transportbak.

(18) Nadat de lever is verwijderd uit elk van de vissen in de transportbak (d.w.z. alle mannetjes of vrouwtjes uit een testkamer), worden alle levermonsters in een buizenrek met een identificatielabel geplaatst en in een vriezer bewaard. Wanneer de levers kort na de excisie beschikbaar worden gesteld voor voorbehandeling, worden de monsters in een koel- of ijsrek naar het volgende werkstation gebracht.

Na de leverexcisie is het karkas beschikbaar voor het meten van secundaire geslachtskenmerken.

Monsters

Bewaar de uit de testvissen genomen levermonsters bij ≤ – 70 °C als ze niet kort na de excisie worden gebruikt voor de voorbehandeling.

Fig. 1.

Net voor de borstvinnen wordt een snede aangebracht met een schaar.

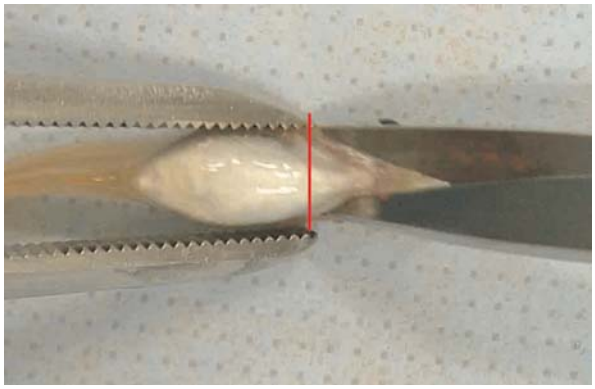
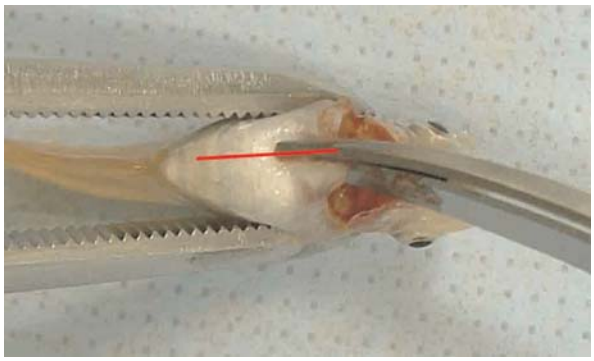


Fig. 2.

De middellijn van de buik wordt met een schaar opengesneden tot ongeveer 2 mm van de craniale zijde van de anus.



▼M6

Fig. 3.

De buikwanden worden gespreid met een tang om de lever en andere inwendige organen bloot te leggen. (Als alternatief kunnen de buikwanden lateraal worden vastgezet).



Fig. 4.

De lever wordt grofweg ontleed en uitgenomen met een tang.



Fig. 5.

De ingewanden worden voorzichtig opzij getrokken met een tang.



▼M6

Fig. 6.

Beide uiteinden van de ingewanden en alle mesenterische aanhechtingen worden doorgesneden met een schaar.



Fig. 7. (vrouwtje)

De procedure is identiek voor de vrouwtjesvis.



Fig. 8.

De procedure is afgerond.



Procedure 2 B: Japans rijstvisje (Oryzias latipes): voorbehandeling van de lever ten behoeve van vitellogenineanalyse

Neem de fles homogenaatbuffer uit de ELISA-uitrusting en koel deze met gemalen ijs (temperatuur van de oplossing: ≤ 4 °C). Als gebruik wordt gemaakt van homogenaatbuffer van het EnBio ELISA-systeem, ontdooit u de oplossing bij kamertemperatuur en koelt u de fles vervolgens met gemalen ijs.

▼**M6**

Bereken het volume homogenaatbuffer voor de lever op basis van het gewicht van de lever (voeg 50 µl homogenaatbuffer per mg levergewicht toe voor het homogenaat). Als het gewicht van de lever bijvoorbeeld 4,5 mg is, bedraagt het volume homogenaatbuffer voor die lever 225 µl. Stel een lijst op van de volumes homogenaatbuffer voor alle levers.

De lever prepareren voor de voorbehandeling

(1) Neem het microbuisje van 1,5 ml met de lever vlak voor de voorbehandeling uit de vriezer.

(2) De voorbehandeling van de levers van mannetjes moet worden uitgevoerd voor die van de vrouwtjes om vitellogeninebesmetting te voorkomen. Bovendien moet de voorbehandeling voor de testgroepen in deze volgorde worden uitgevoerd: controle, oplosmiddelcontrole (indien van toepassing), laagste concentratie, middelste concentratie, hoogste concentratie en positieve controle.

(3) Het aantal microbuisjes van 1,5 ml met levermonsters dat op een gegeven moment uit de vriezer wordt genomen, mag niet groter zijn dan het aantal dat op dat moment kan worden gecentrifugeerd.

(4) Plaats de microbuisjes van 1,5 ml met levermonsters op het ijsrek in de volgorde van de monsternummers (het is niet nodig de lever te ontdooien).

De voorbehandeling uitvoeren

1. Toevoeging van de homogenisatiebuffer

(1) Controleer in de lijst het volume homogenaatbuffer dat moet worden gebruikt voor een bepaald levermonster en stel de micropipet (volumebereik: 100-1 000 µl) in op het juiste volume. Bevestig een schone tip aan de micropipet.

(2) Neem de homogenaatbuffer uit de fles met reagens en voeg de buffer toe aan het microbuisje van 1,5 ml dat de lever bevat.

(3) Voeg volgens de hierboven beschreven procedure de homogenaatbuffer toe aan alle microbuisjes van 1,5 ml die een lever bevatten. Het is niet nodig de tip van de micropipet te vervangen door een nieuwe. Als de tip echter besmet of mogelijk besmet is, moet de tip wel worden vervangen.

2. Homogenisatie van de lever

(1) Bevestig een nieuwe homogenisatiestamper aan de homogenisator van het microbuisje.

(2) Steek de stamper in het microbuisje van 1,5 ml. Neem de homogenisator van het microbuisje in de hand en druk de lever fijn tussen het oppervlak van de stamper en de binnenwand van het microbuisje van 1,5 ml.

(3) Gebruik de homogenisator van het microbuisje gedurende 10 tot 20 seconden. Koel tijdens deze handeling het microbuisje van 1,5 ml met gemalen ijs.

(4) Til de stamper uit het microbuisje van 1,5 ml en laat hem ongeveer 10 seconden rusten. Voer vervolgens een visuele inspectie van de staat van de suspensie uit.

(5) Als er stukjes lever in de suspensie worden waargenomen, herhaalt u de bewerkingen (3) en (4) om een bevredigend leverhomogenaat te bereiden.

▼**M6**

(6) Koel het gesuspendeerde leverhomogenaat op het ijsrek tot het centrifugeren.

(7) Vervang de stamper voor elk homogenaat door een nieuwe.

(8) Homogeniseer alle levers met homogenaatbuffer volgens de hierboven beschreven procedure.

3. Centrifugeren van het gesuspendeerde leverhomogenaat

(1) Verifieer dat de temperatuur in de gekoelde centrifugekamer ≤ 5 °C is.

(2) Plaats de microbuisjes van 1,5 ml met het gesuspendeerde leverhomogenaat in de gekoelde centrifuge (pas indien nodig de balans aan).

(3) Centrifugeer het gesuspendeerde leverhomogenaat bij 13 000 g en ≤ 5 °C gedurende 10 minuten. Als de supernatantia goed gescheiden zijn, kunnen de centrifugale kracht en tijdsduur indien nodig worden aangepast.

(4) Controleer na het centrifugeren of de supernatantia voldoende gescheiden zijn (oppervlakte: vet, tussenlaag: supernatans, onderlaag: leverweefsel). Als de scheiding ontoereikend is, centrifugeert u de suspensie opnieuw onder dezelfde omstandigheden.

(5) Neem alle monsters uit de gekoelde centrifuge en plaats ze op monsternummer op het ijsrek. Pas op dat elk van de gescheiden lagen niet opnieuw wordt gesuspendeerd na het centrifugeren.

4. Afname van het supernatans

(1) Zet vier microbuisjes van 0,5 ml in het rek om er het supernatans in op te slaan.

(2) Neem 30 µl van elk supernatans (gescheiden als tussenlaag) met behulp van de micropipet en druppel dit in één microbuisje van 0,5 ml. Pas op dat er geen vet van het oppervlak of leverweefsel uit de onderlaag wordt meegenomen.

(3) Neem het supernatans en druppel het in twee andere microbuisjes van 0,5 ml op de hierboven beschreven wijze.

(4) Verzamel de rest van het supernatans met de micropipet (indien mogelijk: ≥ 100 µl). Druppel dit supernatans in het resterende microbuisje van 0,5 ml. Pas op dat er geen vet van het oppervlak of leverweefsel uit de onderlaag wordt meegenomen.

(5) Sluit het kapje van dit microbuisje van 0,5 ml en noteer het volume van het supernatans op het label. Koel de microbuisjes vervolgens onmiddellijk op het ijsrek.

(6) Vervang de tip van de micropipet voor elk supernatans door een nieuwe. Als zich een grote hoeveelheid vet aan de tip hecht, moet u deze meteen door een nieuwe vervangen om te voorkomen dat het leverextract door het vet verontreinigd raakt.

(7) Druppel al het gecentrifugeerde supernatans in vier microbuisjes van 0,5 ml volgens de hierboven beschreven procedure.

▼M6

(8) Zodra het supernatans is verdeeld over de microbuisjes van 0,5 ml, plaatst u deze allemaal in het buizenrek met het identificatielabel en bevriest ze vervolgens onmiddellijk in de vriezer. Als de VTG-concentraties onmiddellijk na de voorbehandeling worden gemeten, houdt u één microbuisje van 0,5 ml (met 30 µl supernatans) gekoeld in het buizenrek en brengt u dit over naar het werkstation waar de ELISA-test wordt uitgevoerd. In dat geval plaatst u de overige microbuisjes in de buizenrekken en bevriest u deze in de vriezer.

(9) Gooi na het verzamelen van het supernatans het residu op passende wijze weg.

Opslag van de monsters

Bewaar de microbuisjes van 0,5 ml met het supernatans van het leverhomogenaat bij een temperatuur van ≤ – 70 °C totdat ze voor de ELISA-test worden gebruikt.

Procedure 3A: Zebravis: bloedafname uit de staartader of -slagader

Na anesthesering wordt de staartwortel overdwars afgesneden en wordt bloed afgenomen uit de staartader of -slagader met een gehepariniseerd microhematocriet capillair buisje. De hoeveelheden bloed lopen uiteen van 5 tot 15 µl, afhankelijk van de visgrootte. Er wordt een gelijke hoeveelheid aprotininebuffer (6 µgml in PBS) aan het microcapillaire buisje toegevoegd en het plasma wordt van het bloed gescheiden door middel van centrifugeren (5 minuten bij 600 g). Het plasma wordt verzameld in de reageerbuisjes en bewaard bij – 20 °C totdat het wordt geanalyseerd op vitellogenine of andere belangwekkende proteïnen.

Procedure 3B: Zebravis: bloedafname door middel van hartpunctie

Om coagulatie van het bloed en proteïneafbraak te voorkomen, worden de monsters verzameld in een fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) die heparine (1 000 eenheden/ml) en de proteaseremmer aprotinine (2 TIU/ml) bevat. Als ingrediënten voor de buffer worden ammoniumzout van heparine en gevriesdroogde aprotinine aanbevolen. Voor de bloedafname wordt een injectiespuit (1 ml) met een vaste dunne naald (bijvoorbeeld Braun Omnikan-F) aanbevolen. De spuit moet vooraf gevuld zijn met de buffer (ongeveer 100 µl) om de kleine hoeveelheden bloed volledig uit de vissen te wassen. De bloedmonsters worden afgenomen door middel van een hartpunctie. Eerst moet de vis worden geanestheseerd met MS-222 (100 mg/l). Met het juiste anesthesieniveau kan de gebruiker de hartslag van de zebravis onderscheiden. Houd tijdens de hartpunctie de zuiger van de injectiespuit onder lichte druk. De af te nemen hoeveelheden bloed lopen uiteen van 20 tot 40 microliter. Na de hartpunctie moet het mengsel van bloed en buffer in de reageerbuis worden gespoten. Het plasma wordt van het bloed gescheiden door middel van centrifuge (20 minuten bij 5 000 g) en moet bij een temperatuur van – 80 °C worden bewaard totdat het nodig is voor analyse.

Procedure 3C: SOP: zebravis: homogenisatie van kop en staart

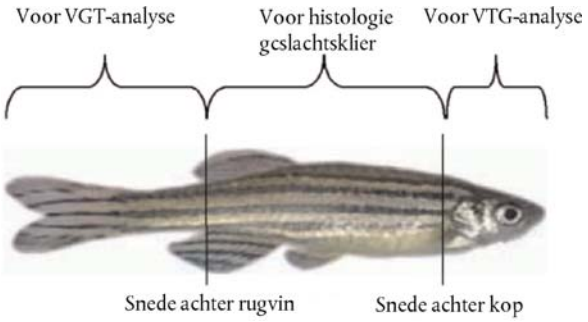
(1) De vissen worden verdoofd en geëuthanaseerd volgens de testbeschrijving.

(2) De kop en de staart worden van de vis afgesneden volgens figuur 1.

Belangrijk: alle ontleedinstrumenten en de snijplank moeten goed worden gespoeld en gereinigd (bijvoorbeeld met 96 % ethanol) na de bewerking van elke vis om „vitellogenine-vervuiling” van vrouwtjes of paaiende mannetjes op niet-paaiende mannetjes te voorkomen.

▼**M6**

Figuur 1



(3) Het totaalgewicht van de kop en staart wordt per vis tot op 1 mg nauwkeurig gemeten.

(4) Nadat ze zijn gewogen worden de lichaamsdelen in geschikte buisjes gedaan (bijvoorbeeld eppendorfbuizen van 1,5 ml) en bevroren bij – 80 °C tot ze worden gehomogeniseerd, of onmiddellijk gehomogeniseerd op ijs met twee plastic stampers. (Er kunnen andere methoden worden toegepast, mits uitgevoerd op ijs en mits het resultaat een homogene massa is.) Belangrijk: de buisjes moeten correct worden genummerd zodat de koppen en staarten van de vissen kunnen worden gerelateerd aan hun respectieve lichamen die worden gebruikt voor de histologie van de geslachtsklier.

(5) Wanneer een homogene massa is bereikt, wordt 4 × het weefselgewicht van de ijskoude homogenisatiebuffer (*) toegevoegd. Blijf de stampers bewegen totdat het mengsel homogeen is. Belangrijke opmerking: voor elke vis moeten nieuwe stampers worden gebruikt.

(6) De monsters worden op ijs bewaard totdat ze gedurende 30 minuten bij 4 °C en 50 000 g worden gecentrifugeerd.

(7) Gebruik een pipet om porties van 20 µl supernatans in ten minste twee buisjes te druppelen door de tip van de pipet onder de vetlaag aan de oppervlakte te houden en het supernatans zorgvuldig zonder vet- of pelletdeeltjes op te zuigen.

(8) De buisjes worden tot gebruik bewaard bij een temperatuur van – 80 °C.

(*) **Homogenisatiebuffer:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % protease remmende cocktail (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl protease remmende cocktail.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) bijvoorbeeld van Bie & Berntsen, Denemarken.

— Protease remmende cocktail: van Sigma (voor zoogdierweefsel), productnummer P 8340.

— *Waarschuwing:* de homogenisatiebuffer moet worden gebruikt op de dag van samenstelling. Tijdens gebruik op ijs plaatsen.

▼M6

Aanhangsel 7

Verrijkte vitellogeninemonsters en testonafhankelijke referentienorm

Op elke dag dat er vitellogeninetests worden uitgevoerd, wordt een verrijkt monster geanalyseerd dat is gemaakt volgens een testonafhankelijke referentienorm. De vitellogenine die wordt gebruikt voor de testonafhankelijke referentienorm is afkomstig uit een andere partij dan die welke is gebruikt om kalibratienormen samen te stellen voor de test die wordt uitgevoerd.

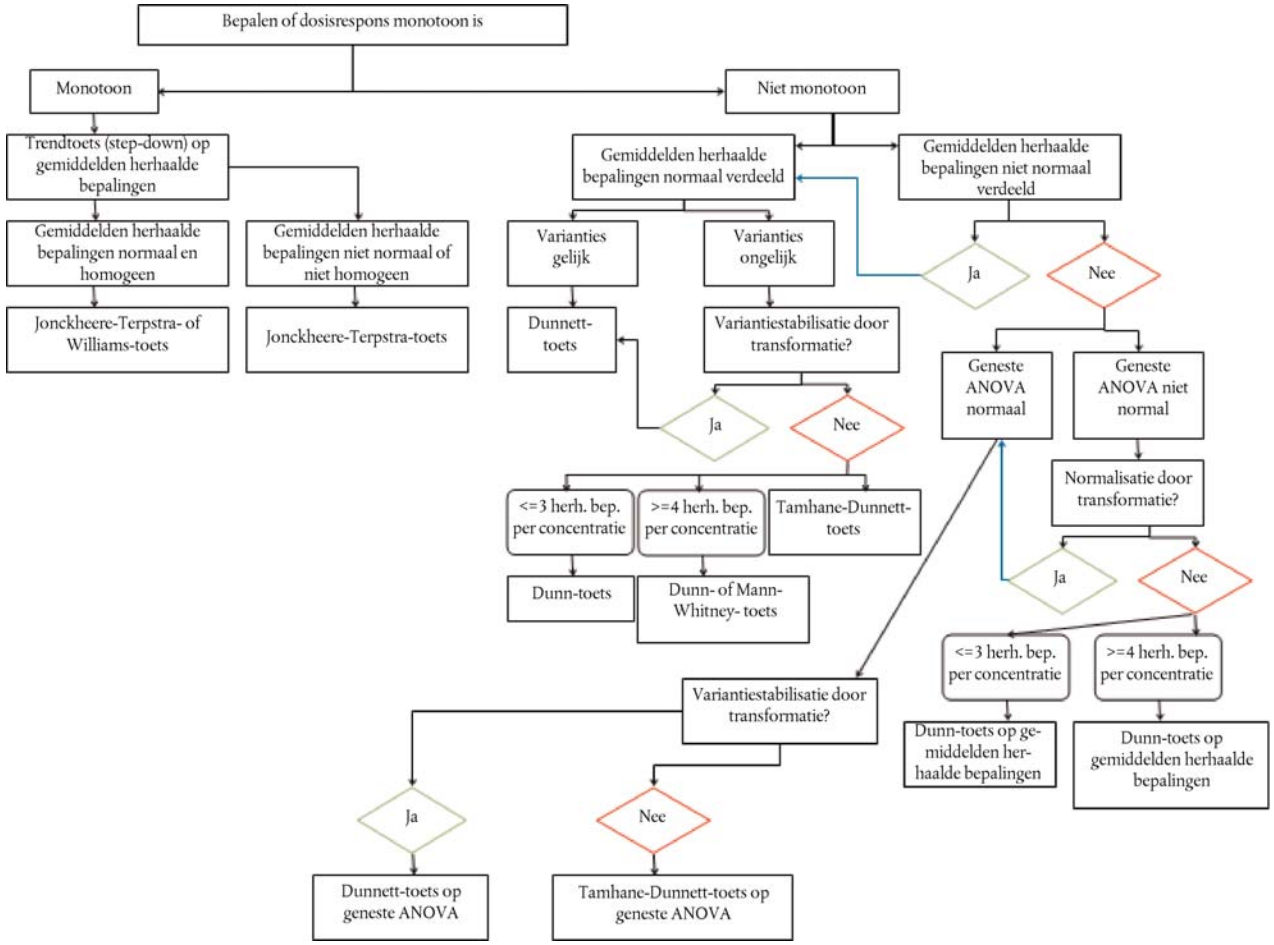
Het verrijkte monster wordt gemaakt door toevoeging van een bekende hoeveelheid van de testonafhankelijke referentienorm aan een plasmamonster van controlemannetjes. Het monster wordt verrijkt om een vitellogenineconcentratie te bereiken die 10 tot 100 keer zo groot is als de verwachte vitellogenineconcentratie in de controlemannetjes. Het plasmamonster van controlemannetjes dat wordt verrijkt, mag afkomstig zijn van één vis of van meerdere vissen.

Een submonster van het nog niet verrijkte plasmamonster van controlemannetjes wordt ten minste in duplo geanalyseerd. Het verrijkte monster wordt eveneens ten minste in duplo geanalyseerd. De gemiddelde hoeveelheid vitellogenine in de twee niet verrijkte plasmamonsters van controlemannetjes wordt opgeteld bij de berekende hoeveelheid vitellogenine die is toegevoegd aan de verrijkte monsters om een verwachte concentratie te bepalen. De verhouding tussen deze verwachte concentratie en de gemeten concentratie wordt gerapporteerd samen met de resultaten van elke set tests die op die dag is uitgevoerd.

▼M6

Aanhangsel 8

Beslisdiagram voor de statistische analyse



▼M6

C.38. AMFIBISCHE METAMORFOSETEST (AMA)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtsnoer (TG) 231 (2009) van de OESO. De behoefte om een test te ontwikkelen en te valideren voor het opsporen van chemische stoffen die actief zijn in het schildkliersysteem van gewervelde diersoorten, komt voort uit bezorgdheid dat de gehaltes aan chemische stoffen in het milieu schadelijke effecten kunnen veroorzaken bij zowel mensen als dieren. In 1998 is de OESO een actie gestart om bestaande testrichtsnoeren te herzien en nieuwe testrichtsnoeren te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars. Eén onderdeel van de actie was de ontwikkeling van een testrichtsnoer voor het screenen van chemische stoffen die een uitwerking hebben op het schildklierstelsel van gewervelde diersoorten. Er werd een verbetering voorgesteld van zowel de 28-daagse test op orale toxiciteit bij herhaalde toediening aan knaagdieren (hoofdstuk B.7 van deze bijlage) als de amfibische metamorfosetest (Amphibian Metamorphosis Assay of AMA). De verbeterde testmethode B.7 heeft een validatieprocedure ondergaan en er is een herziene testmethode uitgegeven. De AMA werd onderworpen aan een uitvoerig validatieprogramma met intra- en interlaboratoriumstudies om de relevantie en betrouwbaarheid van de methode aan te tonen (1, 2). Vervolgens is de validatie van de testmethode het onderwerp geweest van collegiale toetsing door een panel van onafhankelijke deskundigen (3). Deze testmethode is het resultaat van de ervaring die is opgedaan tijdens de validatiestudies voor het opsporen van op de schildklier inwerkende stoffen, en van werk dat elders in OESO-landen is verricht.

PRINCIPE VAN DE TEST

2. De amfibische metamorfosetest (AMA) is een screening die bedoeld is om op empirische wijze chemicaliën te identificeren die de normale werking van het hypothalamus-hypofyse-schildkliersysteem (de HPT-as) kunnen verstoren. De AMA hanteert een gegeneraliseerd model voor gewervelden in die zin dat de test is gebaseerd op de geconserveerde structuren en functies van de HPT-as. Het is een belangrijke test omdat de amfibische metamorfose een goed onderzocht schildkliergebonden proces is dat reageert op chemische stoffen die actief zijn binnen de HPT-as. Het is bovendien de enige bestaande test die schildklieractiviteit opspoort bij een dier dat morfologische ontwikkeling ondergaat.

3. De algemene experimentele opzet houdt in dat kikkervisjes stadium 51 van *Xenopus laevis* gedurende 21 dagen worden blootgesteld aan minstens drie verschillende concentraties van een teststof en een controle met verdunningswater. Van elke testgroep worden vier duplo's uitgevoerd. De larvale dichtheid bij aanvang van de test is 20 kikkervisjes per testbak voor alle testgroepen. De gemeten eindpunten zijn lengte van de achterpoten, lengte van snuit tot anus (snout to vent, SVL), ontwikkelingsstadium, nat gewicht, schildklierhistologie en dagelijkse sterfte.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Testsoort

4. *Xenopus laevis* wordt stelselmatig gekweekt in laboratoria over de hele wereld en is gemakkelijk te verkrijgen via commerciële leveranciers. Reproductie kan bij deze soort gedurende het gehele jaar gemakkelijk worden opgewekt met behulp van injecties met humaan choriongonadotrofine (hCG) en de resulterende larven kunnen stelselmatig in grote aantallen worden opgekweekt tot geselecteerde ontwikkelingsstadia om het gebruik

▼M6

van stadiumspecifieke testprotocollen mogelijk te maken. Bij voorkeur zijn de gebruikte larven afkomstig van volwassen dieren uit eigen huis. Hoewel dit niet de voorkeur heeft, kunnen eieren of embryo's worden getransporteerd naar het laboratorium dat de test uitvoert en mogen ze daar acclimatiseren; vervoer in een larvaal stadium voor gebruik in de test is onaanvaardbaar.

Uitrusting en benodigdheden

5. Voor de uitvoering van deze test zijn de volgende uitrusting en benodigdheden vereist:

a) blootstellingssysteem (zie onderstaande beschrijving);

b) glazen of roestvrijstalen aquaria (zie onderstaande beschrijving);

c) kweekbakken;

d) apparatuur voor temperatuurbeheersing (bijv. verwarming of koeling (instelbaar op 22 ± 1 °C));

e) thermometer;

f) binoculaire ontleedmicroscoop;

g) digitale camera met een resolutie van minimaal 4 megapixel en een microfunctie;

h) beelddigitalisatiesoftware;

i) petrischaaltje (bijv. 100 × 15 mm) of transparante kunststof houder van vergelijkbare grootte;

j) precisiebalans met een nauwkeurigheid van drie decimalen (mg);

k) zuurstofmeter;

l) pH-meter;

m) lichtsterktemeter die in luxeenheden kan meten;

n) divers laboratoriumglaswerk en -gereedschap;

o) instelbare pipetten (10 tot 5 000 µl) of diverse pipetten van gelijkwaardige formaten;

p) teststof in voldoende hoeveelheden om het onderzoek uit te voeren, bij voorkeur uit één zending;

q) analytische instrumenten die geschikt zijn voor de geteste stof of gecontracteerde analysediensten.

Testbaarheid van de stof

6. De AMA is gebaseerd op een waterig blootstellingsprotocol waarbij teststof in de testkamers wordt ingebracht via een doorstroomsysteem. Doorstroommethoden brengen echter beperkingen met zich mee wat betreft de soorten stoffen die kunnen worden getest, afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van de stof. Daarom is het nodig, alvorens dit protocol te gebruiken, basisinformatie over de stof die relevant is voor het vaststellen van de testbaarheid, in te winnen en de richtsnoeren van de OESO voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (4) te raadplegen. Kenmerken die erop duiden dat de stof wellicht moeilijk te testen is in waterige systemen, zijn een hoge octanol-waterverdelingscoëfficiënt (log K_{ow}), een grote vluchtigheid, gevoeligheid

▼M6

voor hydrolyse en gevoeligheid voor fotolyse in de lichtomstandigheden van het laboratorium. Ook andere factoren kunnen relevant zijn voor de vaststelling van de testbaarheid; deze moeten van geval tot geval worden bepaald. Als een goede test voor de stof niet mogelijk is met een doorstroomsysteem, kan een statisch verversingssysteem worden toegepast. Als geen van beide systemen geschikt is voor de teststof, is de norm dat de stof niet wordt getest volgens dit protocol.

Blootstellingssysteem

7. Indien mogelijk moet de voorkeur gegeven worden aan een verdunningssysteem met doorstroming in plaats van statisch verversing. Als fysische en/of chemische eigenschappen van een van de teststoffen niet samengaan met een doorstroomverdunningssysteem, kan er een alternatief blootstellingssysteem (bijv. met statische verversing) worden toegepast. De systeemonderdelen die in contact met water komen, moeten gemaakt zijn van glas, roestvrij staal en/of polytetrafluorethyleen. Er kunnen echter ook geschikte kunststoffen worden gebruikt als deze de test niet verstoren. De bakken waarin de blootstelling plaatsvindt, dienen met standbuizen uitgeruste glazen of roestvrijstalen aquaria te zijn met een inhoud tussen 4,0 en 10,0 l en een minimale waterdiepte van 10 tot 15 cm. Het systeem moet geschikt zijn voor alle testconcentraties en een controle, met vier duplo's per testgroep. De doorstroomsnelheid naar elke bak dient constant te zijn ten behoeve van de instandhouding van de biologische omstandigheden en de blootstelling aan de teststof (bijv. 25 ml/min). De testbakken moeten willekeurig worden toegewezen aan een positie in het blootstellingssysteem teneinde mogelijke locatie-effecten, zoals lichte verschillen in temperatuur, lichtsterkte e.d., te beperken. Er dienen fluorescentielampen te worden gebruikt om een fotoperiode van 12 uur licht en 12 uur donker te realiseren met een lichtsterkte die uiteenloopt van 600 tot 2 000 lux (lumen/m^2) op het wateroppervlak. De watertemperatuur moet in elke testbak op 22 ± 1 °C worden gehouden, de pH-waarde tussen 6,5 en 8,5 en het gehalte aan opgeloste zuurstof (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % van de verzadigingswaarde van de lucht). De watertemperatuur, de pH-waarde en het gehalte aan opgeloste zuurstof moeten minimaal eens per week worden gemeten. Bij voorkeur wordt de temperatuur in ten minste één testbak permanent gemeten. In aanhangsel 1 worden de proefomstandigheden beschreven waaronder het protocol moet worden uitgevoerd. Voor meer informatie over de opzet van blootstellingssystemen met doorstroming en/of statische verversing wordt verwezen naar de ASTM-normen voor het uitvoeren van acute toxiciteitsproeven op testmaterialen met vissen, macro-invertebraten en amfibieën (5) en algemene richtsnoeren voor aquatische toxicologische tests.

Waterkwaliteit

8. Elk water dat lokaal beschikbaar is (bijv. bronwater of met koolstof gefilterd kraanwater) en waarin normaal een normale groei en ontwikkeling van de *X. laevis*-kikkervisjes mogelijk is, kan worden gebruikt. Omdat de lokale waterkwaliteit van regio tot regio aanmerkelijk kan verschillen, moet een analyse van de waterkwaliteit worden uitgevoerd, met name als er geen historische gegevens over de bruikbaarheid van het water voor het kweken van *Xenopus* beschikbaar zijn. Er moet vooral op worden toegezien dat het water vrij is van koper, chloor en chloramine, die alle giftig zijn voor kikkers en kikkervisjes. Verder wordt aanbevolen het water te analyseren op achtergrondwaarden voor fluoride, perchloraat en chloraat

▼M6

(bijproducten van het desinfecteren van drinkwater), aangezien al deze anionen substraten van de jodiumtransporteur van de schildklier zijn en verhoogde waarden van deze ionen de uitkomsten van het onderzoek kunnen verstoren. De analyse moet worden uitgevoerd voordat het testen begint en het testwater moet normaliter vrij van deze anionen zijn.

Jodiumgehalte in testwater

9. De schildklier kan alleen TH produceren als er voor de larven voldoende jodium beschikbaar is uit een combinatie van water- en voedingsbronnen. Op het ogenblik bestaan er geen empirisch gefundeerde richtsnoeren voor de minimale jodiumgehaltes. De beschikbaarheid van jodium kan echter de reactiviteit van het schildklierstelsel voor op de schildklier inwerkende stoffen beïnvloeden en het is bekend dat deze beschikbaarheid de basisactiviteit van de schildklier moduleert, een aspect dat in aanmerking moet worden genomen bij de interpretatie van de resultaten van de histopathologie van de schildklier. Daarom moeten de in het testwater gemeten jodiumconcentraties worden gerapporteerd. Op basis van de gegevens uit de validatiestudies blijkt het protocol goed te werken met een gehalte aan jodium (I) in het testwater tussen 0,5 en 10 µg/l. Idealiter is het minimumgehalte aan jodium in het testwater 0,5 µg/l. Als het synthetisch water op basis van gedeïoniseerd water wordt gebruikt, moet minimaal 0,5 µg/l jodium worden toegevoegd. Elke andere toevoeging van jodium of andere zouten aan het testwater moet worden opgenomen in het verslag.

Leefomstandigheden van de dieren

Verzorging van volwassen dieren en kweek

10. De verzorging van volwassen dieren en de kweek van jonge dieren geschieden overeenkomstig de standaardrichtsnoeren. De lezer wordt voor uitvoerige informatie verwezen naar de richtsnoeren voor het uitvoeren van de Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX) (6). Dergelijke standaardrichtsnoeren bevatten voorbeelden van de juiste verzorgings- en kweekmethoden, al is strikte naleving niet vereist. Om voortplanting op te wekken, worden paren (3-5) volwassen vrouwtjes en mannetjes geïnjecteerd met humaan choriongonadotrofine (hCG). Vrouwelijke en mannelijke specimina worden geïnjecteerd met respectievelijk ongeveer 800-1 000 IU en 600-800 IU hCG in 0,6-0,9 % zoutoplossing. De paren worden ongestoord en onder statische omstandigheden in grote bakken gehouden om de paargreep (amplexus) te bevorderen. De vloer van elke kweekbak moet zijn voorzien van een dubbele bodem van roestvrijstalen of kunststof gaas waardoor de eiermassa op de bodem van de bak kan vallen. Kikkers die in de late namiddag zijn geïnjecteerd, zullen gewoonlijk het merendeel van hun eieren halverwege de ochtend van de volgende dag gelegd hebben. Nadat voldoende eieren zijn gelegd en bevrucht, moeten de volwassen dieren uit de kweekbakken worden verwijderd.

Verzorging en selectie van larven

11. Nadat de volwassen dieren uit de kweekbakken zijn verwijderd, worden de eieren verzameld en beoordeeld op levensvatbaarheid met behulp van een representatieve steekproef van embryo's uit alle kweekbakken. De beste individuele broedsels (aangeraden wordt: 2-3 om de kwaliteit te beoordelen) wat betreft levensvatbaarheid van de embryo's en aanwezigheid van een toereikend aantal (minimaal 1 500) embryo's, moeten worden geselecteerd. Alle in een onderzoek gebruikte organismen moeten afkomstig zijn van één broedsel (d.w.z. dat de broedsels niet mogen worden gemengd). De embryo's worden overgebracht naar een grote platte kom of schaal en

▼M6

alle eieren die duidelijk dood of abnormaal zijn (zie de definitie in (5)), worden met behulp van een pipet of oogdruppelaar verwijderd. De gezonde embryo's uit elk van de drie broedsels worden overgebracht naar drie aparte broedbakken. Vier dagen na plaatsing in de broedbakken wordt het beste broedsel gekozen op basis van levensvatbaarheid en uitkomstresultaat. De geselecteerde larven worden overgeplaatst in een geschikt aantal opfokbakken bij een temperatuur van 22 ± 1 °C. Bovendien worden enkele larven verplaatst naar extra bakken om als vervangers te dienen in geval van sterfte in de opfokbakken tijdens de eerste week. Met deze procedure wordt een consistente dichtheid van organismen gehandhaafd, waardoor de kans op uiteenlopende ontwikkeling binnen de cohort van één broedsel wordt verkleind. Alle opfokbakken moeten dagelijks schoon worden geheveld. Als voorzorg verdienen handschoenen van vinyl of nitril de voorkeur boven latex handschoenen. Sterfgevallen moeten dagelijks worden verwijderd en tijdens de eerste week worden aangevuld met vervangende larven om de dichtheid van organismen in stand te houden. Het voeren dient ten minste tweemaal daags plaats te vinden.

12. Tijdens de periode voorafgaand aan de blootstelling wennen de kikkervisjes aan de omstandigheden van de feitelijke blootstellingsfase, waaronder het type voeding, de temperatuur, de cyclus van licht en donker en het kweekmedium. Daarom wordt aanbevolen hetzelfde kweek-/verdunningswater te gebruiken vóór en tijdens de blootstellingsfase. Als een statisch kweeksysteem wordt gebruikt voor het houden van de kikkervisjes tijdens de fase voorafgaand aan de blootstelling, moet het kweekmedium ten minste tweemaal per week volledig worden vervangen. Overbevolking als gevolg van grote larvale dichtheid in de preblootstellingsperiode dient te worden vermeden, omdat dit belangrijke gevolgen kan hebben voor de ontwikkeling van de kikkervisjes in de testfase. Daarom mag de dichtheid niet groter zijn dan ongeveer vier kikkervisjes/l kweekmedium (statisch blootstellingssysteem) of 10 kikkervisjes/l kweekmedium (met bijv. 50 ml/min debiet in het preblootstellings- of kweeksysteem). Onder deze omstandigheden moeten de kikkervisjes zich binnen 12 dagen van stadium 45/46 tot stadium 51 ontwikkelen. Representatieve kikkervisjes van deze stampopulatie dienen dagelijks gecontroleerd te worden op hun ontwikkelingsstadium om zo het juiste tijdstip voor het begin van de blootstelling te schatten. Er moet zorgvuldig worden gestreefd naar minimalisering van stress en trauma bij de kikkervisjes, met name tijdens het verplaatsen, het schoonmaken van aquaria en het manipuleren van de larven. Stressvolle omstandigheden/activiteiten, zoals hard en/of onophoudelijk geluid, tikken op aquaria, trillingen in de aquaria, buitensporige activiteit in het laboratorium en snelle veranderingen in het mediummilieu (lichtbeschikbaarheid, temperatuur, pH-waarde, gehalte aan opgeloste zuurstof, waterstroomsnelheid enz.), dienen te worden vermeden. Als de kikkervisjes zich niet binnen 17 dagen na de bevruchting tot stadium 51 ontwikkelen, kan buitensporige stress worden beschouwd als mogelijke boosdoener.

Kweken en voeren van de larven

13. Kikkervisjes worden gedurende de gehele periode voorafgaand aan de blootstelling (na stadium 45/46 van Nieuwkoop en Faber (NF) (8)) en tijdens de gehele testperiode van 21 dagen gevoerd met bijvoorbeeld het in de handel verkrijgbare voer dat is gebruikt in de validatiestudies (zie ook aanhangsel 1), of een ander dieet dat aantoonbaar dezelfde resultaten mogelijk maakt als de amfibische metamorfosetest. Het voederregime tijdens de preblootstellingsperiode moet zorgvuldig worden afgestemd op de vereisten van de zich ontwikkelende kikkervisjes. Dat wil zeggen dat er meermaals per dag (minimaal tweemaal) kleine porties voeding aan de pas uitgekomen kikkervisjes moeten worden gegeven. Een overmatige hoeveelheid voer dient te worden vermeden om *i)* de waterkwaliteit op peil te houden en *ii)* te voorkomen dat de kieuwfilters verstopt raken

▼M6

met voedsel- en afvaldeeltjes. Voor het kikkervissenvoer dat in de validatiestudies is gebruikt, moeten de dagelijkse hoeveelheden naarmate de kikkervisjes groeien worden verhoogd tot ongeveer 30 mg/dier/dag vlak voor aanvang van de test. Validatiestudies hebben aangetoond dat dit commerciële voer een goede groei en ontwikkeling van *X. laevis*-kikkervisjes ondersteunt. Het bestaat uit fijne deeltjes die lange tijd in suspensie in de waterkolom blijven en wegspoelen met de waterstroom. Daarom moet de totale dagelijkse hoeveelheid worden verdeeld in kleinere porties en ten minste tweemaal daags worden toegediend. Het voederregime voor deze voeding is uitgewerkt in tabel 1. Voedertijden en toegediende hoeveelheden moeten worden geregistreerd. Het voer kan in droge vorm of als een in verdunningswater bereide stamoplossing worden toegediend. Een dergelijke stamoplossing moet om de andere dag vers worden bereid en voor en na toediening worden bewaard bij 4 °C.

Tabel 1.

Voederregime met het commercieel kikkervissenvoer dat is gebruikt in de validatiestudies voor kikkervisjes van *X. laevis* gedurende het in-vivo-gedeelte van de AMA met doorstroming

Onderzoeksdag	Portie (mg voer/dier/dag)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Analytische scheikunde

14. Voordat een onderzoek wordt uitgevoerd, moet de stabiliteit van de teststof worden beoordeeld met behulp van bestaande informatie over de oplosbaarheid, afbreekbaarheid en vluchtigheid ervan. Ten behoeve van scheikundige analyses moeten monsters worden genomen van de testoplossingen in elk van de replicaatbakken bij elke concentratie op de dag waarop de test begint (dag 0) en vervolgens wekelijks gedurende de test voor minimaal vier monsters. Ook wordt aanbevolen dat elke testconcentratie wordt geanalyseerd tijdens het gereedmaken van het systeem, voor aanvang van de test, om de systeemprestaties te verifiëren. Bovendien is het raadzaam de stamoplossingen te analyseren wanneer ze worden verwisseld, met name als de hoeveelheid stamoplossing ontoereikende hoeveelheden teststof oplevert voor de gehele duur van de periode van dagelijkse monsterneming. In het geval van chemische stoffen die niet kunnen worden gedetecteerd bij sommige of alle in een test gebruikte concentraties, moeten de stamoplossingen worden gemeten en de doorstroomsnelheden in het systeem worden geregistreerd om de nominale concentraties te berekenen.

Afgifte van de teststof

15. De methode die wordt toegepast om de teststof in het systeem te brengen, kan verschillen en is afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van de stof. In water oplosbare stoffen kunnen worden opgelost in aliquots met testwater in een concentratie die afgifte met het beoogde testgehalte in een doorstroomsysteem mogelijk maakt. Stoffen die bij kamertemperatuur vloeibaar zijn en slechts in geringe mate oplossen in water, kunnen worden afgegeven met behulp van vloeistof:vloeistof-saturatie. Stoffen die bij kamertemperatuur vast zijn en slechts in geringe mate oplossen in water, kunnen worden afgegeven met behulp van glaswolsaturatie (7). Het verdient de voorkeur om een systeem zonder draagvloeistof te gebruiken, maar verschillende teststoffen hebben verschillende fysisch-chemische eigenschappen die waarschijnlijk een verschillende aanpak bij de bereiding van het water voor de chemische blootstelling vereisen. Oplosmiddelen en draagvloeistoffen dienen bij voorkeur te worden te vermeden omdat: *i)* bepaalde oplosmiddelen zelf toxiciteit en/of ongewenste of onverwachte

▼M6

endocrinologische reacties kunnen veroorzaken, *ii)* het testen van chemicaliën boven hun oplosbaarheid in water (zoals vaak gebeurt door het gebruik van oplosmiddelen) kan leiden tot een onnauwkeurige bepaling van de effectieve concentraties, en *iii)* het gebruik van oplosmiddelen in tests op langere termijn kan leiden tot de vorming van een aanzienlijke „biofilm" gekoppeld aan microbiële activiteit. Voor moeilijk te testen stoffen kan in laatste instantie een oplosmiddel de beste keuze zijn; raadpleeg de richtsnoeren van de OESO voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (4) om de beste methode te bepalen. De keuze van het juiste oplosmiddel hangt af van de chemische eigenschappen van de teststof. Oplosmiddelen waarvan de effectiviteit voor het testen op aquatische toxiciteit is gebleken, zijn aceton, ethanol, methanol, dimethylformamide en triëthyleenglycol. Indien een oplosmiddel als draagvloeistof wordt gebruikt, moeten de concentraties oplosmiddel zich beneden de concentratie zonder waargenomen effect (No Observed Effect Concentration, NOEC) bevinden. In de richtsnoeren van de OESO wordt een maximum van 100 µl/l aanbevolen, terwijl in een recente studie het gebruik van oplossingsconcentraties van slechts 20 µl/l verdunningswater wordt aangeraden (12). Indien oplosmiddelen als draagvloeistof worden gebruikt, moeten goede controles op het oplosmiddel worden beoordeeld in aanvulling op de controles zonder oplosmiddel (schoon water). Als het niet mogelijk is een teststof via het water af te geven vanwege fysisch-chemische eigenschappen (lage oplosbaarheid) of beperkte chemische beschikbaarheid, kan worden overwogen de stof via de voeding toe te dienen. Er worden inleidende werkzaamheden op het gebied van blootstelling via het eten verricht, maar deze methode is niet gangbaar. De keuze voor een methode dient te worden gedocumenteerd en analytisch te worden geverifieerd.

Selectie van testconcentraties

Vaststelling van de hoogste testconcentratie

16. Ten behoeve van deze test moet de hoogste testconcentratie worden ingesteld op de laagste van de volgende drie waarden: de maximale oplosbaarheid van de teststof, de maximale toegelaten concentratie (MTC) voor acuut toxische stoffen of 100 mg/l.

17. De MTC is gedefinieerd als de hoogste testconcentratie van de teststof die tot minder dan 10 % acute sterfte leidt. In deze benadering wordt ervan uitgegaan dat er empirische gegevens over acute sterfte bestaan op basis waarvan de MTC kan worden geschat. De schatting van de MTC kan onnauwkeurig zijn en vereist gewoonlijk enig professioneel inzicht. Hoewel het gebruik van regressiemodellen technisch gezien de meest solide methode voor het schatten van de MTC is, kan een bruikbare benaderende MTC ook worden afgeleid van bestaande gegevens over acute sterfte, door 1/3 van de acute LC_{50}-waarde te nemen. Het is echter mogelijk dat het voor de geteste soort ontbreekt aan gegevens over acute toxiciteit. Als soortspecifieke gegevens over acute toxiciteit niet beschikbaar zijn, kan een 96-urige LC_{50}-test worden uitgevoerd met kikkervisjes die representatief zijn voor de dieren die in de AMA worden getest (d.w.z. zich in hetzelfde ontwikkelingsstadium bevinden). Eventueel kan, wanneer gegevens van andere aquatische soorten beschikbaar zijn (bijv. LC_{50}-onderzoek bij andere amfibieën of vissen), met professioneel inzicht een waarschijnlijke MTC worden geschat door extrapolatie naar een andere soort.

18. Als daarentegen de stof niet acuut toxisch én voor meer dan 100 mg/l oplosbaar is, moet 100 mg/l worden beschouwd als de hoogste testconcentratie (HTC), aangezien deze concentratie gewoonlijk als „praktisch niet-giftig" wordt opgevat.

▼M6

19. Hoewel ze niet de aanbevolen procedure vormen, kunnen statische verversingsmethoden worden toegepast wanneer doorstroommethoden ontoereikend zijn om de MTC te halen. Als gebruik wordt gemaakt van statische verversingsmethoden, moet de stabiliteit van de teststofconcentratie worden gedocumenteerd en binnen de grenzen van de prestatiecriteria blijven. Aanbevolen worden verversingsperioden van 24 uur. Verversingsperioden van meer dan 72 uur zijn onaanvaardbaar. Bovendien moeten parameters voor de waterkwaliteit (gehalte aan opgeloste zuurstof, temperatuur, pH-waarde enz.) worden gemeten aan het einde van elke verversingsperiode, onmiddellijk voorafgaand aan de verversing.

Bereik van testconcentraties

20. Er is een voorgeschreven *minimum* van drie testconcentraties en een controle met schoon water (en indien nodig een dragercontrole). Het minimale verschil in testconcentratie tussen de hoogste en de laagste concentratie moet ongeveer één orde van grootte bedragen. De maximale dosisseparatie is 0,1, de minimale 0,33.

PROCEDURE

Aanvang en uitvoering van de test

Dag 0

21. De blootstelling moet worden gestart wanneer een voldoende aantal kikkervisjes van de stampopulatie in de preblootstellingsperiode volgens Nieuwkoop en Faber (8) ontwikkelingsstadium 51 heeft bereikt terwijl ze maximaal 17 dagen oud zijn vanaf de bevruchting. Ten behoeve van de selectie van proefdieren moeten gezonde en normaal uitziende kikkervisjes van de stampopulatie worden samengebracht in één bak die een passende hoeveelheid verdunningswater bevat. Voor de vaststelling van hun ontwikkelingsstadium dienen kikkervisjes afzonderlijk uit de verzamelbak te worden gevist met een klein netje of zeefje en overgebracht naar een transparante meetruimte (bijv. een petrischaaltje van 100 mm) met verdunningswater. Bij voorkeur wordt voor de vaststelling van het stadium geen anesthesie toegepast, maar de kikkervisjes mogen voor de hantering wel afzonderlijk worden verdoofd met 100 mg/l tricainemethaansulfonaat (bijv. MS-222), voldoende gebufferd met natriumbicarbonaat (pH 7,0). Indien hiervan gebruik wordt gemaakt, moet de juiste methodologie voor correct gebruik van bijv. MS-222 voor anesthesiedoeleinden worden verkregen van ervaren laboratoria en bij de testresultaten worden vermeld. De dieren moeten tijdens dit overbrengen omzichtig worden behandeld om de stress van de verplaatsing tot een minimum te beperken en verwondingen te vermijden.

22. Het ontwikkelingsstadium van de dieren wordt vastgesteld met behulp van een binoculaire ontleedmicroscoop. Om de uiteindelijke variatie in de ontwikkelingsstadia te verkleinen, is het van belang dat deze vaststelling zo nauwkeurig mogelijk gebeurt. Volgens Nieuwkoop en Faber (8) is het primaire ontwikkelingskenmerk voor de selectie van organismen in stadium 51 de morfologie van de achterpoten. De morfologische kenmerken van de achterpoten moeten onder de microscoop worden onderzocht. Hoewel de complete richtsnoeren van Nieuwkoop en Faber (8) dienen te worden geraadpleegd voor uitgebreide informatie over de stadiumbepaling van kikkervisjes, kan worden gesteld dat men het stadium betrouwbaar kan vaststellen aan de hand van opvallende morfologische kenmerken. Met behulp van de volgende tabel kan de stadiumbepaling gedurende het gehele onderzoek worden vereenvoudigd en gestandaardiseerd door middel van identificatie van die opvallende morfologische kenmerken die bij een normale ontwikkeling worden geassocieerd met de verschillende stadia.

▼M6

Tabel 2.

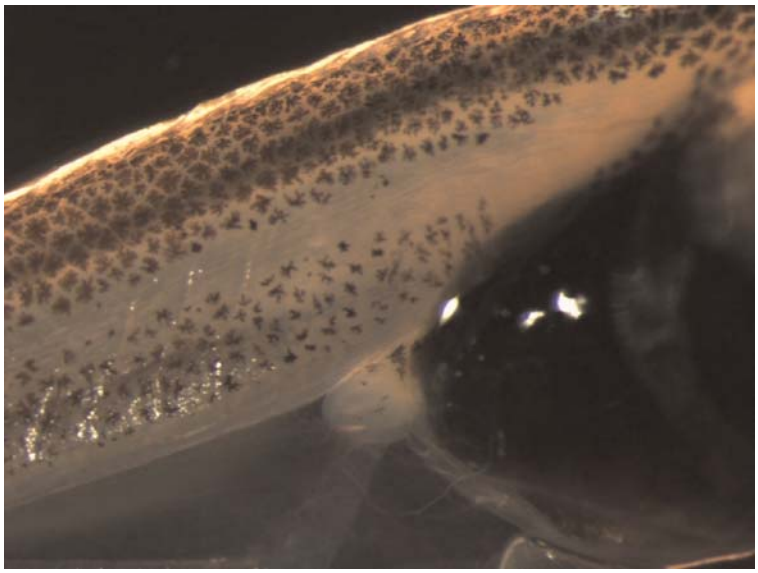
Opvallende morfologische kenmerken van de verschillende stadia op basis van de richtsnoeren van Nieuwkoop en Faber.

Opvallende morfologische kenmerken	Ontwikkelingsstadium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Achterpoot	X	X	X	X	X	X	X									
Voorpoot						X	X	X	X	X						
Craniofaciale structuur										X	X	X	X			
Reukzenuwmorfologie											X	X	X			
Staartlengte													X	X	X	X

23. Bij aanvang van de test moeten alle kikkervisjes zich in stadium 51 bevinden. Het meest opvallende morfologische kenmerk van dit stadium is de morfologie van de achterpoten, zoals wordt getoond in figuur 1.

Figuur 1.

Morfologie van de achterpoten van een *X. laevis*-kikkervisje in stadium 51.



24. Naast selectie op basis van ontwikkelingsstadium kan optioneel ook selectie op basis van de grootte van de proefdieren worden toegepast. Voor dit doel moet op dag 0 de totale lichaamslengte (niet de SVL) worden gemeten bij een steekproef van ongeveer 20 kikkervisjes in NF-stadium 51. Nadat de gemiddelde totale lichaamslengte van deze groep dieren is berekend, kunnen minima en maxima voor de totale lichaamslengte van de proefdieren worden vastgesteld door een afwijking van de gemiddelde waarde met ± 3 mm toe te staan (de gemiddelde waarden voor de totale lichaamslengte van kikkervisjes in stadium 51 lopen uiteen van 24,0 tot 28,1 mm). Het ontwikkelingsstadium blijft echter de primaire parameter voor de vaststelling van de geschiktheid van een proefdier. Kikkervisjes met grove zichtbare misvormingen of verwondingen moeten worden uitgesloten van de test.

▼M6

25. Kikkervisjes die aan bovenstaande stadiumcriteria voldoen, worden in een bak met schoon kweekwater gehouden totdat de stadiumbepaling is voltooid. Vervolgens worden de larven willekeurig verdeeld over de testbakken totdat elke bak 20 larven bevat. Elke testbak wordt vervolgens gecontroleerd op dieren met abnormale uiterlijke kenmerken (bijv. wonden, afwijkend zwemgedrag enz.). Openlijk ongezond uitziende kikkervisjes moeten uit de testbakken worden verwijderd en worden vervangen door nieuwe geselecteerde larven uit de verzamelbak.

Opmerkingen

26. Voor uitgebreidere informatie over testbeëindigingsprocedures en de behandeling van kikkervisjes kunt u de richtsnoeren van de OESO over de schildklierhistologie bij amfibieën (9) raadplegen.

Metingen op dag 7

27. Op dag 7 worden vijf willekeurig gekozen kikkervisjes per duplo uit elk van de testbakken genomen. De gebruikte willekeurige selectieprocedure moet waarborgen dat elk organisme in de test een gelijke kans heeft om te worden geselecteerd. Dit kan worden bereikt met elke gerandomiseerde methode maar vereist dat alle kikkervisjes in een net worden gevangen. Vervolgens worden de niet geselecteerde kikkervisjes teruggezet in de oorspronkelijke bak en de geselecteerde kikkervisjes op humane wijze geëuthanaseerd in 150 tot 200 mg/l van bijv. MS-222, voldoende gebufferd met natriumbicarbonaat tot pH 7,0. De geëuthanaseerde kikkervisjes worden gespoeld in water en afgedroogd met vloeipapier, waarna het lichaamsgewicht wordt vastgesteld, afgerond op een hele milligram. Voor elk kikkervisje worden verder de lengte van de achterpoten, de lengte van snuit tot anus (SVL) en het ontwikkelingsstadium (met behulp van een binoculaire ontleedmicroscoop) bepaald.

Metingen op dag 21 (einde van de test)

28. Bij het einde van de test (dag 21) worden de resterende kikkervisjes uit de testbakken genomen en op humane wijze geëuthanaseerd in 150 tot 200 mg/l van bijv. MS-222, voldoende gebufferd met natriumbicarbonaat als hiervoor beschreven. De kikkervisjes worden gespoeld in water en afgedroogd met vloeipapier, waarna het lichaamsgewicht wordt vastgesteld, afgerond op een hele milligram. Van elk kikkervisje wordt het ontwikkelingsstadium, de SVL en de lengte van de achterpoten bepaald.

29. Voor de histologische onderzoeken worden alle larven gedurende 48 tot 72 uur in fixeermiddel van Davidson geplaatst, hetzij in de vorm van complete lichaamsmonsters, hetzij als afgesneden kopweefselmonsters inclusief onderkaak. Ten behoeve van de histopathologie moeten in totaal vijf kikkervisjes per replicaatbak als monster worden genomen. Omdat de folliculaire celhoogte stadiumafhankelijk is (10), worden bij de bemonstering voor histologische analyses wanneer mogelijk het best individuen in hetzelfde stadium genomen. Om de selectie van individuen in hetzelfde stadium mogelijk te maken, moet van alle larven eerst het stadium worden vastgesteld, voorafgaand aan de selectie en daaropvolgende verwerking ten behoeve van gegevensverzameling en conservatie. Dit is noodzakelijk omdat de normale divergentie in ontwikkeling zal leiden tot een andere stadiumverdeling per replicaatbak.

30. De voor histopathologie geselecteerde dieren (n = 5 van elke duplo) moeten voor zover mogelijk overeenkomen met het mediaanstadium van de controles (verzamelde duplo's). Als er replicaatbakken zijn met meer dan vijf larven in het geschikte stadium, moeten willekeurig vijf larven worden geselecteerd.

▼M6

31. Als er replicaatbakken zijn met minder dan vijf larven in het geschikte stadium, moeten willekeurig geselecteerde individuen uit het naastgelegen eerdere of latere stadium worden geselecteerd om tot een steekproef van in totaal vijf larven per duplo te komen. Bij voorkeur wordt de beslissing om extra larven te selecteren uit het vorige of het volgende ontwikkelingsstadium gebaseerd op een algehele beoordeling van de stadiumverdeling in de controle- en testgroepen. Als de chemische behandeling in verband wordt gebracht met een vertraagde ontwikkeling, moeten aanvullende larven worden geselecteerd uit het eerstvolgende vroegere stadium. Als de chemische behandeling daarentegen in verband wordt gebracht met een versnelde ontwikkeling, moeten aanvullende larven worden geselecteerd uit het eerstvolgende latere stadium.

32. In gevallen van ernstige veranderingen in de ontwikkeling van de kikkervisjes als gevolg van de blootstelling aan een teststof is er mogelijk geen overlap van de stadiumverdeling in de testbakken met het berekende mediane ontwikkelingsstadium in de controlegroep. Alleen in die gevallen moet het selectieproces worden aangepast door een ander stadium dan het mediane controlestadium te gebruiken voor de steekproef van larven voor de schildklierhistologie. Als de stadia onbepaald zijn (in geval van asynchrone ontwikkeling), moeten er willekeurig 5 kikkervisjes uit elke duplo worden gekozen voor de histologische analyse. De reden waarom larven worden geselecteerd die zich niet in een stadium bevinden dat equivalent is aan het mediane controlestadium, moet worden gerapporteerd.

Bepaling van biologische eindpunten

33. Tijdens de blootstellingsfase van 21 dagen wordt een meting van de primaire eindpunten uitgevoerd op de dagen 7 en 21. Daarnaast is ook dagelijkse observatie van de proefdieren nodig. In tabel 3 wordt een overzicht gegeven van de te meten eindpunten en de bijbehorende observatiemomenten. Meer gedetailleerde informatie over technische procedures voor het meten van apicale eindpunten en het uitvoeren van histologische beoordelingen is beschikbaar in de richtsnoeren van de OESO (9).

Tabel 3.

Observatiemomenten voor primaire eindpunten in de AMA

Apicale eindpunten	Dagelijks	Dag 7	Dag 21
— Sterfte	•		
— Ontwikkelingsstadium		•	•
— Lengte achterpoten		•	•
— Lengte snuit-anus (SVL)		•	•
— Nat gewicht		•	•
— Schildklierhistologie			•

▼M6

Apicale eindpunten

34. Ontwikkelingsstadium, achterpootlengte, SVL en nat gewicht zijn de apicale eindpunten van de AMA. Elk ervan wordt hierna kort besproken. Meer technische informatie over het verzamelen van deze gegevens is beschikbaar in de richtsnoeren waarnaar wordt verwezen, met inbegrip van aanbevolen procedures voor computeranalyse.

Ontwikkelingsstadium

35. Het ontwikkelingsstadium van kikkervisjes van *X. laevis* wordt bepaald aan de hand van de stadiëringscriteria van Nieuwkoop en Faber (8). Gegevens over het ontwikkelingsstadium worden gebruikt om te bepalen of de ontwikkeling versneld, asynchroon, vertraagd of normaal verloopt. Versnelling of vertraging in de ontwikkeling wordt vastgesteld door een vergelijking te maken tussen het mediane stadium dat is bereikt door de controlegroep en dat van de behandelde groepen. Asynchrone ontwikkeling dient te worden gerapporteerd wanneer de onderzochte weefsels niet misvormd of abnormaal zijn maar de relatieve timing van de morfogenese of ontwikkeling van verschillende weefsels binnen één kikkervisje is verstoord.

Lengte achterpoten

36. Differentiatie en groei van de achterpoten worden gestuurd door schildklierhormonen en zijn belangrijke ontwikkelingskenmerken die al worden gebruikt voor de bepaling van het ontwikkelingsstadium. De ontwikkeling van de achterpoten wordt in kwalitatieve zin gebruikt voor de bepaling van het ontwikkelingsstadium, maar wordt hier als kwantitatief eindpunt beschouwd. Daarom wordt de lengte van de achterpoten gemeten als eindpunt om effecten op de schildklieras op te sporen (figuur 2). Met het oog op de consistentie wordt de lengte gemeten van de linkerachterpoot. De lengte van de achterpoten wordt zowel op dag 7 als op dag 21 van de test gemeten. Op dag 7 is de achterpoot eenvoudig te meten, zoals wordt geïllustreerd in figuur 2. Het meten van de achterpoot op dag 21 is echter lastiger als gevolg van buigingen in het ledemaat. Daarom moet de meting van de achterpootlengte op dag 21 beginnen bij de lichaamswand en de middellijn van het ledemaat volgen langs eventuele angulaire afwijkingen. Veranderingen in de lengte van de achterpoten op dag 7 worden, ook als ze niet zichtbaar zijn op dag 21, toch als significant beschouwd voor mogelijke schildklieractiviteit. De lengtemetingen worden verricht op digitale foto's met behulp van software voor beeldanalyse zoals beschreven in de richtsnoer van de OESO over schildklierhistologie bij amfibieën (9).

Lengte en nat gewicht

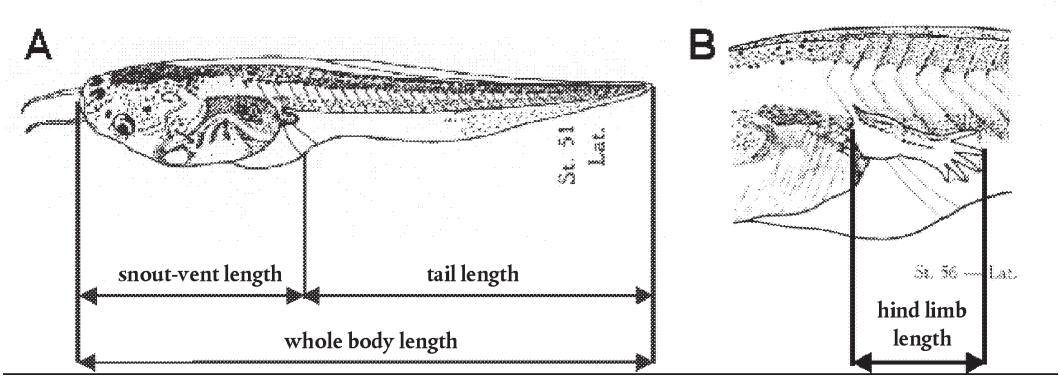
37. De bepalingen van de lengte van snuit tot anus (SVL) (figuur 2) en het natte gewicht zijn in het testprotocol opgenomen om mogelijke effecten van teststoffen op het groeitempo van kikkervisjes in vergelijking met de controlegroep vast te stellen en zijn bruikbaar voor het opsporen van gegeneraliseerde toxiciteit van de teststof. Omdat het verwijderen van aanhangend water kan leiden tot stress bij de kikkervisjes en huidbeschadiging wordt het gewicht van de in de steekproef opgenomen kikkervisjes bepaald op dag 7 en bij alle overige kikkervisjes aan het einde van de test (dag 21). Gebruik ten behoeve van de consistentie de craniale zijde van de anus als het eindpunt van de lengtemeting.

38. Met de lengte van snuit tot anus (SVL) wordt de groei van het kikkervisje beoordeeld, zoals geïllustreerd in figuur 2.

▼M6

Figuur 2.

(A) Typen lichaamslengtemeting en (B) meting van de achterpoten bij kikkervisjes van *X. laevis* (1)



Schildklierhistologie

39. Hoewel het ontwikkelingsstadium en de lengte van de achterpoten belangrijke eindpunten zijn voor de beoordeling van veranderingen in de gedaanteveranderende ontwikkeling onder invloed van blootstelling, kan de uitgestelde ontwikkeling op zich niet worden beschouwd als diagnostische indicator van schildklierremmende activiteit. Sommige veranderingen kunnen alleen waarneembaar zijn bij alledaagse histopathologische analyse. Diagnostische criteria zijn hypertrofie/atrofie van de schildklier, folliculaire hypertrofie en folliculaire hyperplasie, met als aanvullende kwalitatieve criteria het folliculair lumen, de colloïdekwaliteit en de hoogte/vorm van de folliculaire cel. De ernst van de afwijkingen moet (in 4 gradaties) worden gerapporteerd. Informatie over het nemen en verwerken van steekproeven ten behoeve van histologische analyse en het uitvoeren van histologische analyses op weefselmonsters is beschikbaar in de volgende documentatie: „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation" en „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas" (9). Laboratoria die de test voor de eerste keer uitvoeren, dienen zich te laten adviseren en trainen door ervaren pathologen alvorens de schildklier histologisch te analyseren en te evalueren. Openlijke en significante veranderingen in apicale eindpunten die wijzen op een versnelde of asynchrone ontwikkeling, kunnen een histopathologische analyse van de schildklieren overbodig maken. Bij afwezigheid van openlijke morfologische veranderingen of bewijs van ontwikkelingsvertraging zijn histologische analyses echter geboden.

Sterfte

40. Dagelijks moeten alle testbakken worden gecontroleerd op dode kikkervisjes en moet het aantal sterfgevallen per bak worden genoteerd. Daarbij moeten de datum, de concentratie en het baknummer van de waargenomen sterfte worden geregistreerd. Dode dieren dienen na waarneming uit de testbak te worden verwijderd. Sterftecijfers van meer dan 10 % kunnen duiden op ongewenste testomstandigheden of toxische effecten van de teststof.

Aanvullende opmerkingen

41. Gevallen van abnormaal gedrag en grove zichtbare misvormingen en verwondingen moeten worden geregistreerd. Voor elk dergelijk geval moeten de datum, de concentratie en het baknummer worden bijgehouden. Normaal gedrag vertonende kikkervisjes zweven met de staart opgericht boven hun kop in de waterkolom, slaan regelmatig met de staartvin, komen

▼M6

geregeld aan de oppervlakte, hebben een werkend kieuwdeksel en reageren op stimuli. Abnormaal gedrag omvat bijvoorbeeld drijven aan de oppervlakte, liggen op de bakbodem, achteruit of onregelmatig zwemmen, niet boven water komen en niet reageren op stimuli. Daarnaast moeten grove verschillen in voedselconsumptie tussen de behandelingen worden geregistreerd. Grove misvormingen en verwondingen zijn bijvoorbeeld morfologische afwijkingen (bijv. aan de ledematen), bloeduitstortingen, bacteriële of schimmelinfecties enz. Deze vaststellingen zijn kwalitatief, vergelijkbaar met klinische tekenen van ziekte of stress en moeten worden vergeleken met die bij controledieren. Als de verschijnselen in testbakken ernstiger zijn of vaker voorkomen dan in de controlebakken, moeten ze worden beschouwd als bewijs van openlijke toxiciteit.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verzameling van gegevens

42. Alle gegevens moeten worden verzameld met behulp van elektronische of handmatige systemen die voldoen aan goede laboratoriumpraktijken. Het onderzoeksverslag moet de volgende gegevens bevatten:

Teststof:

— karakterisering van de teststof: fysisch-chemische eigenschappen; informatie over stabiliteit en biologische afbreekbaarheid;

— chemische informatie: methode en frequentie van bereiding van verdunningen. De chemische informatie over de teststof omvat de werkelijke en nominale concentraties van de teststof en in sommige gevallen van de niet-oorspronkelijke stof, indien van toepassing. Chemische testwaarden kunnen niet alleen voor testoplossingen maar ook voor stamoplossingen vereist zijn;

— verdunningsmiddel (indien geen water): motivatie van de keuze voor het verdunningsmiddel en karakterisering van het verdunningsmiddel (kenmerken, gebruikte concentratie).

Testomstandigheden:

— geregistreerde operationele gegevens: deze bestaan uit opmerkingen over de werking van het testsysteem en de ondersteunende omgeving en infrastructuur. Typische geregistreerde gegevens zijn: omgevingstemperatuur, testtemperatuur, fotoperiode, status van kritieke componenten van het blootstellingssysteem (bijv. pompen, toerentellers, drukmeters), stroomsnelheden, waterniveaus, stamflesvervangingen en voedergegevens. Algemene parameters van de waterkwaliteit zijn pH-waarde, gehalte aan opgeloste zuurstof, geleidbaarheid, totaal aan jodium, alkaliniteit en hardheid;

— afwijkingen van de testmethode: deze informatie moet gegevens of narratieve beschrijvingen bevatten van afwijkingen van de testmethode.

Resultaten:

— biologische waarnemingen en gegevens, zoals dagelijkse gegevens over sterfte, voedselconsumptie, abnormaal zwemgedrag, lethargie, evenwichtsverlies, misvormingen, verwondingen enz. Met vooraf bepaalde intervallen worden gegevens en waarnemingen geregistreerd over het ontwikkelingsstadium, de lengte van de achterpoten, de lengte van snuit tot anus en het natte gewicht;

▼M6

— statistische analysetechnieken en een motivatie van de gebruikte technieken; de uitkomsten van de statistische analyse, bij voorkeur in tabelvorm;

— histologische gegevens: deze omvatten narratieve beschrijvingen en ook gradatiecijfers over de ernst en de incidentie van bepaalde waarnemingen, zoals uitvoerig beschreven in de histopathologische richtsnoeren;

— ad-hocwaarnemingen: deze omvatten narratieve beschrijvingen van het onderzoek die buiten de hierboven beschreven categorieën vallen.

Rapportage van gegevens

43. Aanhangsel 2 bevat spreadsheets voor dagelijks verzamelde gegevens die als richtsnoeren kunnen dienen voor het invoeren van de ruwe gegevens en voor de berekening van statistische overzichten. Bovendien worden rapportagetabellen verschaft waarmee op eenvoudige wijze samengevatte eindpuntgegevens kunnen worden bekendgemaakt. Rapportagetabellen voor histologische beoordelingen zijn te vinden in aanhangsel 2.

Prestatiecriteria en aanvaardbaarheid/geldigheid van de test

44. Over het algemeen leiden grove afwijkingen van de testmethode tot gegevens die onaanvaardbaar zijn voor interpretatie- of rapportagedoeleinden. Daarom zijn in tabel 4 de volgende criteria geformuleerd als richtsnoer voor het bepalen van de kwaliteit van de uitgevoerde test en de algemene prestaties van de controleorganismen.

Tabel 4.

Prestatiecriteria voor de AMA

Criterium	Aanvaardbare grenswaarden
Testconcentraties	Gehandhaafd op ≤ 20 % VC (variatie in gemeten testconcentratie) gedurende de 21-daagse test
Sterfte in de controlegroep	≤ 10 % — de sterfte per duplo mag in de controlegroep nooit hoger dan 2 kikkervisjes zijn
Minimale mediane ontwikkelingsstadium van de controlegroep aan het eind van de test	57
Spreiding van ontwikkelingsstadium in de controlegroep	Het verschil tussen het 10e en het 90e percentiel van de ontwikkelingsstadiumverdeling mag niet groter zijn dan 4 stadia
Gehalte aan opgeloste zuurstof	≥ 40 % van de luchtverzadigingswaarde (*)
pH	De pH-waarde moet worden gehandhaafd tussen 6,5 en 8,5. De verschillen tussen duplo's/testgroepen mogen niet groter zijn dan 0,5
Watertemperatuur	22° ± 1 °C — het verschil tussen de verschillende replicaat-/testbakken mag niet groter zijn dan 0,5 °C
Testconcentraties zonder openlijke toxiciteit	≥ 2
Prestaties van duplo's	≤ 2 duplo's in de gehele test mogen gecompromitteerd zijn

▼M6

Criterium	Aanvaardbare grenswaarden
Speciale voorwaarden voor gebruik van een oplosmiddel	Als gebruik wordt gemaakt van een oplosmiddel als draagvloeistof, moet zowel een controlegroep met oplosmiddel als een controlegroep met schoon water worden gebruikt en moet over beide controles worden gerapporteerd
	Statistisch significante verschillen tussen oplosmiddelcontroles en watercontroles worden op een speciale manier behandeld. Zie hierna voor meer informatie
Speciale voorwaarden voor een statisch verversingssysteem	Er moeten representatieve chemische analyses voor en na de verversing worden gerapporteerd
	Onmiddellijk voorafgaand aan verversing moeten de ammoniagehaltes worden gemeten
	Onmiddellijk voorafgaand aan verversing moeten alle parameters voor de waterkwaliteit uit tabel 1 van aanhangsel 1 worden gemeten
	De periode tot de volgende verversing mag niet langer zijn dan 72 uur
	Een geschikt voederschema (50 % van de dagelijkse portie commercieel kikkervissenvoer)

(*) Beluchting van het water kan worden uitgevoerd met luchtbellen uit bubblers. Aanbevolen wordt de bubblers af te stellen op een niveau dat de kikkervisjes geen onnodige stress oplevert.

Geldigheid van de test

45. Een test kan alleen als aanvaardbaar/geldig worden beschouwd wanneer aan de volgende voorwaarden is voldaan:

Geldig experiment in een test met een negatieve uitslag voor schildklieractiviteit:

(1) Voor elke gegeven testgroep (inclusief controles) mag de sterfte niet hoger zijn dan 10 %. Voor elke gegeven duplo mag de sterfte niet hoger zijn dan drie kikkervisjes; anders wordt de duplo als gecompromitteerd beschouwd.

(2) Er moeten ten minste twee testniveaus, met alle vier ongecompromitteerde duplo's, beschikbaar zijn voor analyse.

(3) Er moeten ten minste twee testniveaus zonder openlijke toxiciteit beschikbaar zijn voor analyse.

Geldig experiment in een test met een positieve uitslag voor schildklieractiviteit:

(1) Sterfte van niet meer dan twee kikkervisjes per duplo in de controlegroep is toegestaan.

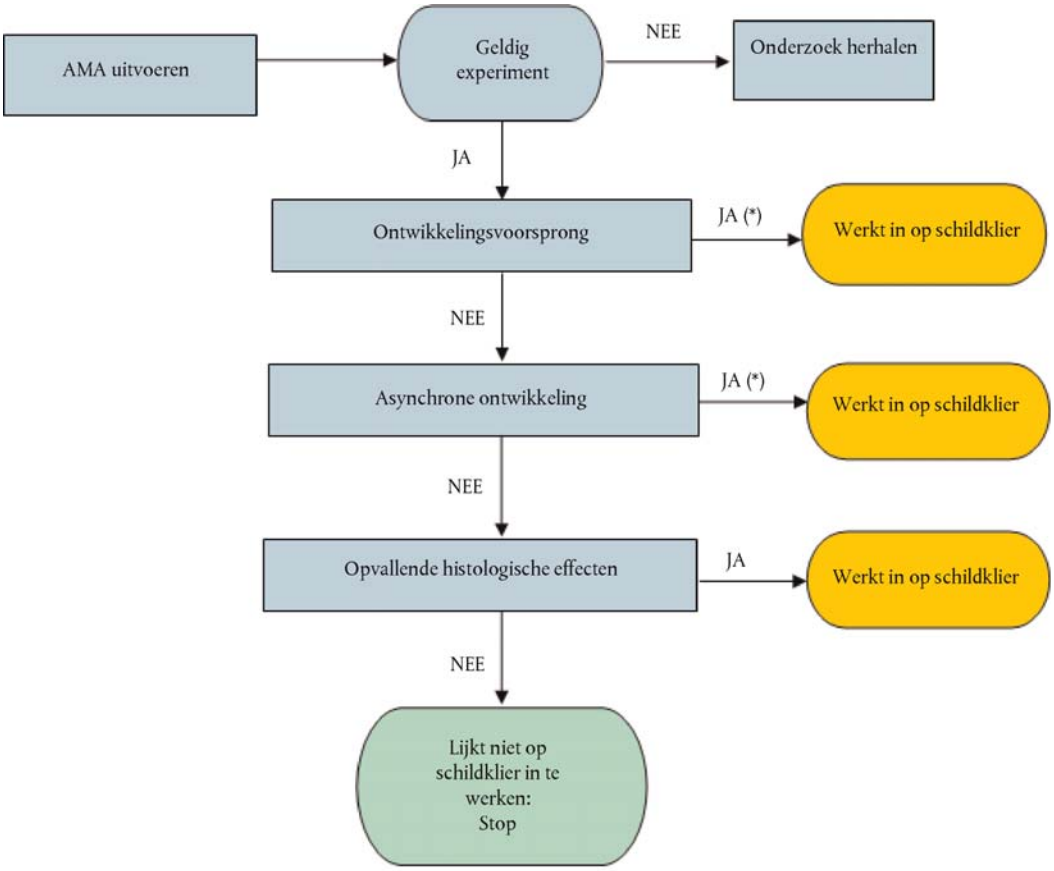
Beslisdiagram voor uitvoering van de AMA

46. Er is een beslisdiagram ontwikkeld voor de AMA, dat logische hulp biedt bij de uitvoering en interpretatie van de biotest (zie stroomdiagram in figuur 3). In het beslisdiagram wordt in die zin een afweging tussen de eindpunten gemaakt dat een ontwikkelingsvoorsprong, asynchrone ontwikkeling en schildklierhistologie zwaar wegen terwijl vertraagde ontwikkeling, SVL en nat lichaamsgewicht, parameters die kunnen worden beïnvloed door algemene toxiciteit, minder zwaar wegen.

▼M6

Figuur 3.

Beslisdiagram voor uitvoering van de AMA.



(*) Histologie kan door sommige toezichthoudende instanties worden voorgeschreven ondank significante verschillen in gevorderde en asynchrone ontwikkeling. De entiteit die de test uitvoert, wordt aangemoedigd de nodige autoriteiten te raadplegen alvorens de test uit te voeren om vast te stellen welke eindpunten verplicht zijn.

Ontwikkelingsvoorsprong (vastgesteld aan de hand van ontwikkelingsstadium, SVL en achterpootlengte)

47. Een voorsprong in ontwikkeling komt voor zover bekend alleen voor als gevolg van effecten in verband met schildklierhormonen. Dit kunnen effecten in perifeer weefsel zijn, zoals directe interactie met de schildklierhormoonreceptor (zoals T4), of effecten die de niveaus van het circulerende schildklierhormoon beïnvloeden. In beide gevallen wordt dit beschouwd als voldoende bewijs dat de stof schildklieractiviteit vertoont. Een ontwikkelingsvoorsprong wordt op een van twee manieren beoordeeld. Ten eerste kan het algemene ontwikkelingsstadium worden beoordeeld op de standaardwijze zoals beschreven in Nieuwkoop en Faber (8). Ten tweede kunnen specifieke morfologische kenmerken worden gekwantificeerd op dag 7 en dag 21, zoals de lengte van de achterpoten, die positief is gerelateerd aan agonistische effecten op de schildklierhormoonreceptor. Als zich statistisch significante voorsprongen in ontwikkeling of achterpootlengte voordoen, duidt de test erop dat de teststof inwerkt op de schildklier.

▼**M6**

48. De beoordeling van proefdieren op de aanwezigheid van versnelde ontwikkeling ten opzichte van de controlepopulatie moet zijn gebaseerd op de uitkomsten van statistische analyses die worden uitgevoerd op de volgende vier eindpunten:

— achterpootlengte (genormaliseerd met SVL) op testdag 7;

— achterpootlengte (genormaliseerd met SVL) op testdag 21;

— ontwikkelingsstadium op testdag 7;

— ontwikkelingsstadium op testdag 21.

49. Statistische analyses van de achterpootlengte moeten worden uitgevoerd op basis van metingen van de lengte van de linkerachterpoot. De achterpootlengte wordt genormaliseerd door de verhouding tussen de achterpootlengte en de SVL van het individuele kikkervisje te nemen. De gemiddelde genormaliseerde waarden per testniveau worden vervolgens vergeleken. Een versnelde ontwikkeling wordt dan aangegeven door een significante toename van de gemiddelde (genormaliseerde) achterpootlengte in een testgroep ten opzichte van de controlegroep op dag 7 en/of dag 21 van het onderzoek (zie aanhangsel 3).

50. Statistische analyses van het ontwikkelingsstadium moeten worden uitgevoerd op basis van de bepaling van de ontwikkelingsstadia volgens de morfologische criteria van Nieuwkoop en Faber (8). Een versnelde ontwikkeling is geïndiceerd wanneer uit de multi-dichotome analyse een significante stijging van de ontwikkelingsstadiumwaarden in een testgroep ten opzichte van de controlegroep blijkt op dag 7 en/of dag 21 van het onderzoek.

51. In de opzet van de AMA wordt een significant effect op een van de bovengenoemde eindpunten beschouwd als voldoende voor een positief resultaat ten aanzien van versnelde ontwikkeling. Dit wil zeggen dat significante effecten op de achterpootlengte op één tijdstip niet hoeven te worden ondersteund door significante effecten op de achterpootlengte op het andere tijdstip en evenmin door significante effecten op het ontwikkelingsstadium op dat ene tijdstip. Omgekeerd hoeven significante effecten op het ontwikkelingsstadium op één tijdstip niet te worden ondersteund door significante effecten op het ontwikkelingsstadium op het andere tijdstip en evenmin door significante effecten op de achterpootlengte op dat ene tijdstip. Het gewicht van het bewijs voor versnelde ontwikkeling neemt echter wel toe indien significante effecten worden geconstateerd op meer dan één eindpunt.

Asynchrone ontwikkeling (vastgesteld aan de hand van criteria voor het ontwikkelingsstadium)

52. Asynchrone ontwikkeling wordt gekenmerkt door een verstoring van de relatieve timing van de morfogenese of ontwikkeling van verschillende weefsels binnen één kikkervisje. Als het onmogelijk is het ontwikkelingsstadium van een organisme duidelijk vast te stellen met behulp van de reeks morfologische eindpunten die als typerend voor een bepaald stadium worden beschouwd, betekent dit dat de weefsels zich tijdens de metamorfose asynchroon ontwikkelen. Asynchrone ontwikkeling is een indicator van schildklieractiviteit. De enige bekende werkingsmechanismen die asynchrone ontwikkeling veroorzaken, zijn de effecten van stoffen op de hormoonactiviteit in de perifere schildklier en/of de schildklierhormoonstofwisseling in weefsels in ontwikkeling, zoals waargenomen bij deiodinaseremmers.

▼**M6**

53. De beoordeling van proefdieren op de aanwezigheid van asynchrone ontwikkeling ten opzichte van de controlepopulatie wordt gebaseerd op de grove morfologische evaluatie van de proefdieren op dag 7 en dag 21 van het onderzoek.

54. De beschrijving van de normale ontwikkeling van *Xenopus laevis* in Nieuwkoop en Faber (8) verschaft het referentiekader voor de herkenning van de normale sequentie van weefselveranderingen. Het begrip „asynchrone ontwikkeling" verwijst specifiek naar die afwijkingen in de grove morfologische ontwikkeling van kikkervisjes die de definitieve vaststelling van een ontwikkelingsstadium volgens de criteria van Nieuwkoop en Faber (8) onmogelijk maken omdat belangrijke morfologische herkenningspunten de kenmerken van verschillende stadia vertonen.

55. Zoals de term 'asynchrone ontwikkeling' impliceert, dienen alleen gevallen in aanmerking te worden genomen waarin afwijkingen in de voortgang van de vormverandering van specifieke weefsels ten opzichte van de voortgang van de vormverandering van andere weefsels worden geconstateerd. Enkele klassieke fenotypen zijn vertraging of afwezigheid van de komst van de voorpoten ondanks normale of versnelde ontwikkeling van de achterpoten en staartweefsels, of het vroegtijdig resorberen van de kieuwen ten opzichte van het stadium van de morfogenese van de achterpoten en het resorberen van de staart. Asynchrone ontwikkeling wordt geregistreerd als een dier niet kan worden toegeschreven aan een stadium omdat het niet voldoet aan de meeste ontwikkelingscriteria voor één stadium volgens Nieuwkoop en Faber (8), of als er sprake is van extreme vertraging of versnelling van een of meer sleutelkenmerken (bijv. staart volledig geresorbeerd maar voorpoten nog niet aanwezig). Dit is een kwalitatieve beoordeling waarbij alle door Nieuwkoop en Faber (8) genoemde belangrijke kenmerken moeten worden onderzocht. Het is echter niet nodig om de ontwikkelingsstatus van de verschillende kenmerken van de beoordeelde dieren te registreren. Aan dieren waarvoor een asynchrone ontwikkeling is geregistreerd, wordt geen ontwikkelingsstadium van Nieuwkoop en Faber (8) toegekend.

56. Een centraal criterium voor het typeren van abnormale morfologische ontwikkeling als 'asynchrone ontwikkeling' is een verstoorde relatieve timing van de vormverandering en de morfogenese van weefsels terwijl de morfologie van de betrokken weefsels niet openlijk abnormaal is. Een voorbeeld dat deze interpretatie van grove morfologische afwijkingen illustreert, is dat een vertraagde morfogenese van de achterpoten ten opzichte van de ontwikkeling van andere weefsels voldoet aan het criterium voor 'asynchrone ontwikkeling', terwijl gevallen van ontbrekende achterpoten, abnormale tenen (bijv. ectrodactylie of polydactylie) of andere openlijke misvormingen van de ledematen niet mogen worden beschouwd als 'asynchrone ontwikkeling'.

57. In dit verband moeten als belangrijkste morfologische kenmerken voor de gecoördineerde voortgang van hun metamorfose in elk geval de morfogenese van de achterpoten, de morfogenese van de voorpoten, de komst van de voorpoten, het resorptiestadium van de staart (met name van de staartvin) en de morfologie van de kop (bijv. grootte en resorptiestadium van de kieuwen, morfologie van de onderkaak, protrusie van het kraakbeen van Meckel) worden beoordeeld.

58. Afhankelijk van het chemische werkingsmechanisme kunnen verschillende grove morfologische fenotypen optreden. Enkele klassieke fenotypen zijn vertraging of afwezigheid van de komst van de voorpoten ondanks normale of versnelde ontwikkeling van de achterpoten en staartweefsels, en vroegtijdige resorptie van de kieuwen ten opzichte van de vormverandering van de achterpoten en de staart.

▼M6

Histopathologie

59. Als de teststof geen openlijke toxiciteit veroorzaakt, de ontwikkeling niet versnelt noch tot asynchrone ontwikkeling leidt, wordt de histopathologie van de schildklieren beoordeeld met behulp van de toepasselijke richtsnoeren (9). Vertraagde ontwikkeling bij afwezigheid van toxiciteit is een sterke indicator van schildklierremmende activiteit, maar de analyse van het ontwikkelingsstadium is minder gevoelig en minder diagnostisch dan de histopathologische analyse van de schildklier. Daarom is in dit geval het uitvoeren van histopathologische analyses van de schildklieren vereist. Effecten op de histologie van de schildklier bij afwezigheid van ontwikkelingseffecten zijn aangetoond. Indien veranderingen in de histopathologie van de schildklier optreden, wordt de teststof als schildklieractief beschouwd. Indien geen vertragingen in de ontwikkeling of histologische verwondingen in de schildklieren worden geconstateerd, wordt de teststof als schildklierinactief beschouwd. De reden voor deze beslissing is dat de schildklier onder invloed van thyreotropine (TSH) staat en dat elke teststof die het circulerende schildklierhormoon voldoende wijzigt om de afscheiding van TSH te wijzigen, histopathologische veranderingen in de schildklieren zal veroorzaken. Er zijn verschillende werkingsmechanismen die het circulerende schildklierhormoon kunnen wijzigen. Dus hoewel het schildklierhormoongehalte duidt op een schildkliergerelateerd effect, is het ontoereikend om vast te stellen welk werkingsmechanisme verantwoordelijk is voor de reactie.

60. Omdat dit eindpunt zich niet leent tot een elementaire statistische benadering, kan alleen een deskundig patholoog zeggen of een effect al dan niet verband houdt met de blootstelling aan een chemische stof.

Ontwikkelingsachterstand (vastgesteld aan de hand van ontwikkelingsstadium, achterpootlengte, lichaamsgewicht en SVL)

61. Vertraging in de ontwikkeling kan optreden als gevolg van schildklierremmende mechanismen en door indirecte toxiciteit. Matige ontwikkelingsachterstanden in combinatie met openlijke tekenen van toxiciteit duiden waarschijnlijk op een niet-specifiek toxisch effect. Evaluatie van niet-schildkliergebonden toxiciteit is een essentieel onderdeel van de test ter vermindering van de kans op valse positieven. Buitensporige sterfte is een onmiskenbare aanwijzing dat er andere toxische mechanismen in het spel zijn. Evenzo suggereren matige afnames van de groei, zoals vastgesteld aan de hand van het natte gewicht en/of de SVL, niet-schildkliergebonden toxiciteit. Een klaarblijkelijke toename van de groei wordt meestal waargenomen bij teststoffen die de normale ontwikkeling negatief beïnvloeden. Derhalve duidt de aanwezigheid van grotere dieren niet noodzakelijkerwijs op niet-schildkliergebonden toxiciteit. Er mag echter nooit uitsluitend op de groei worden afgegaan bij het vaststellen van schildkliertoxiciteit. De groei moet in combinatie met het ontwikkelingsstadium en de histopathologie van de schildklier worden gebruikt om schildklieractiviteit vast te stellen. Ook andere eindpunten moeten worden beoordeeld bij het vaststellen van openlijke toxiciteit, waaronder oedeem, bloeduitstortingen, lethargie, verminderd voedselconsumptie, grillig/veranderd zwemgedrag enz. Als bij alle testconcentraties tekenen van openlijke toxiciteit worden geconstateerd, moet de teststof opnieuw worden beoordeeld bij lagere testconcentraties voordat wordt vastgesteld of de teststof schildklieractief dan wel schildklierinactief is.

62. Bij afwezigheid van andere tekenen van openlijke toxiciteit duiden statistisch significante ontwikkelingsachterstanden erop dat de teststof schildklieractief (antagonistisch) is. Als overtuigende statistische reacties ontbreken, kan deze uitkomst worden aangevuld met de uitkomsten van de histopathologie van de schildklier.

▼M6

Statistische analyses

63. Statistische analyses van de gegevens moeten bij voorkeur worden uitgevoerd volgens de procedures die zijn beschreven in Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (11). Op alle continue kwantitatieve eindpunten (achterpootlengte, SVL, nat gewicht) waarvoor een monotone dosisreactie wordt verwacht, moet de step-down trendtoets van Jonckheere-Terpstra worden toegepast om een significant testeffect vast te stellen.

64. Voor continue eindpunten waarvoor geen monotone dosisreactie wordt verwacht, moeten de gegevens worden beoordeeld op normale verdeling (bij voorkeur met behulp van de toets van Shapiro-Wilk of Anderson-Darling) en homogene variantie (bij voorkeur met behulp van de toets van Levene). Beide tests worden uitgevoerd op de residuen van een variantieanalyse. In plaats van deze formele tests kan ook het oordeel van deskundigen over de normale verdeling en de homogene variantie worden gebruikt, al gaat de voorkeur uit naar de formele tests. Wanneer een niet-normale verdeling of heterogene variantie wordt geconstateerd, moet naar een normaliserende, variantiedempende transformatie worden gestreefd. Als de gegevens (eventueel na transformatie) normaal verdeeld zijn met een homogene variantie, wordt een significant testeffect bepaald met de toets van Dunnett. Als de gegevens (eventueel na transformatie) normaal verdeeld zijn met een heterogene variantie, wordt een significant testeffect bepaald met de toets van Tamhane-Dunnett of de T3-toets of met de U-toets van Mann-Whitney-Wilcoxon. Wanneer geen normaliserende transformatie kan worden bereikt, wordt een significant testeffect bepaald met de U-toets van Mann-Whitney-Wilcoxon met behulp van een correctie op de p-waarden volgens Bonferroni-Holm. De toets van Dunnett wordt toegepast onafhankelijk van enige F-toets van de variantieanalyse, en de Mann-Whitney-toets wordt toegepast onafhankelijk van enige algemene Kruskall-Wallis-toets.

65. Significante sterfte wordt niet verwacht maar dient te worden vastgesteld met de toets van Cochran-Armitage, toegepast met stapjes omlaag, wanneer de gegevens consistent zijn met een monotone dosisrespons en anders met de Exact-toets van Fisher met correctie volgens Bonferroni-Holm.

66. Een significant testeffect op het ontwikkelingsstadium wordt vastgesteld met de step-down trendtoets van Jonckheere-Terpstra toegepast op de medianen van de duplo's. Een alternatief dat de voorkeur verdient voor de effectbeoordeling is de multi-dichotome toets van Jonckheere voor het 20^{ste} tot 80^{ste} percentiel, omdat daarmee wijzigingen in het verdelingsprofiel in aanmerking worden genomen.

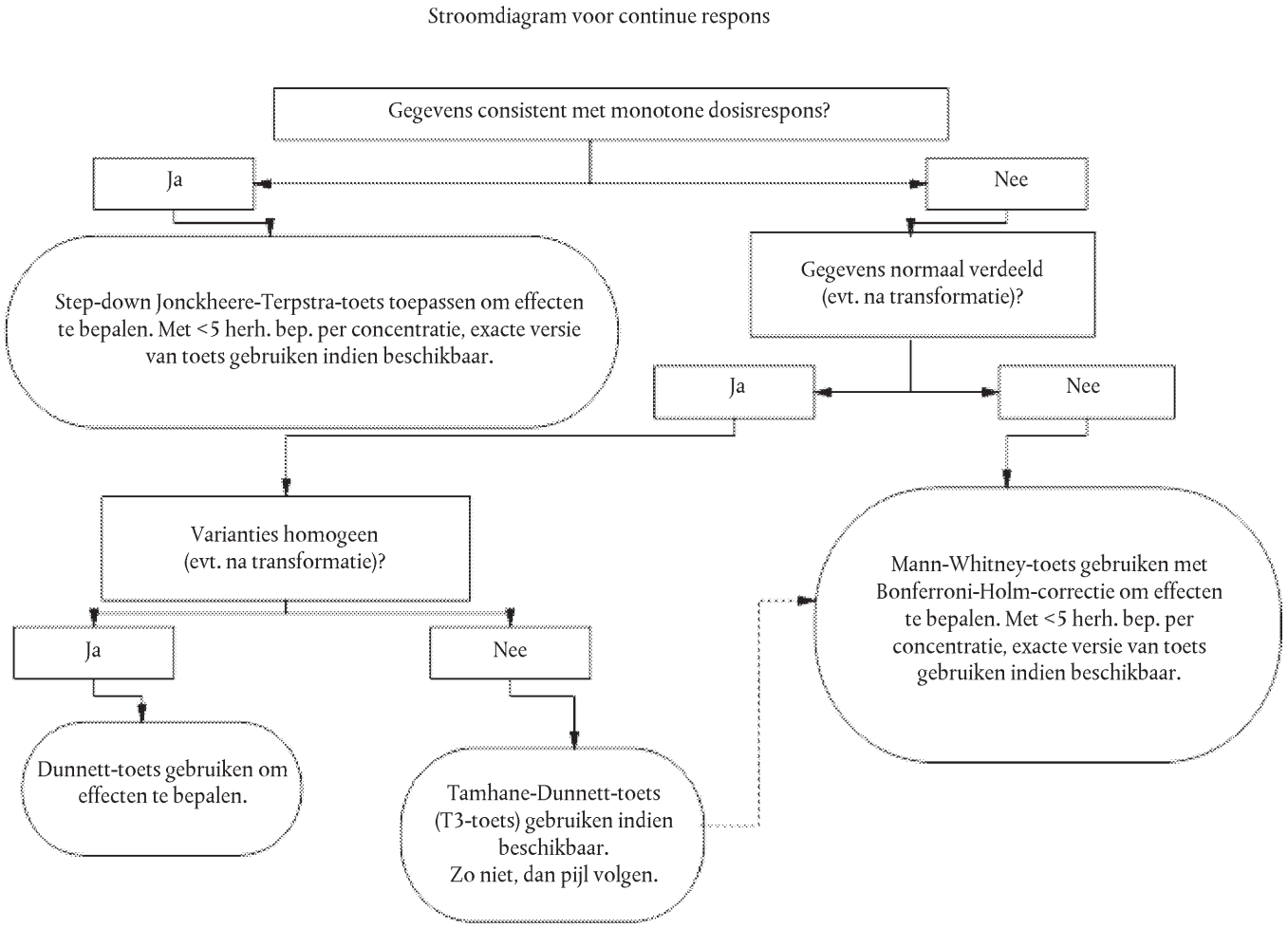
67. De juiste analyse-eenheid is de duplo; daarom bestaan de gegevens uit medianen van duplo's als de toets van Jonckheere-Terpstra of de U-toets van Mann-Whitney wordt gebruikt, of uit de gemiddelden van de duplo's als de toets van Dunnett wordt gebruikt. De monotone dosisrespons kan visueel worden beoordeeld op basis van de gemiddelden of medianen van de duplo's en de testgroepen of formele tests zoals hiervoor beschreven (11). Bij minder dan vijf duplo's per test- of controlegroep moeten, indien beschikbaar, de exacte permutatieversies van de toetsen van Jonckheere-Terpstra en Mann-Whitney worden gebruikt. De statistische significantie van alle aangegeven toetsen wordt beoordeeld op het significantieniveau 0,05.

68. Figuur 4 is een stroomdiagram voor de uitvoering van statistische toetsen op continue gegevens.

▼M6

Figuur 4.

Stroomdiagram voor de statistische benadering van continue responsgegevens



▼M6

Speciale overwegingen met betrekking tot gegevensanalyse

Gebruik van aangetaste testniveaus

69. Er worden verschillende factoren meegewogen bij de vaststelling of een duplo of een gehele testgroep openlijke toxiciteit vertoont en uit de analyse moet worden weggenomen. Openlijke toxiciteit is gedefinieerd als > 2 sterftegevallen in een duplo die alleen kunnen worden verklaard door toxiciteit en niet door technisch falen. Andere tekenen van openlijke toxiciteit zijn bloedingen, abnormaal gedrag, abnormale zwempatronen, anorexia en alle overige klinische ziektesymptomen. Voor niet-dodelijke tekenen van toxiciteit kunnen kwalitatieve beoordelingen nodig zijn, die altijd moeten worden uitgevoerd onder verwijzing naar de controlegroep in schoon water.

Controlegroepen met oplosmiddel

70. Het gebruik van een oplosmiddel mag alleen in laatste instantie worden overwogen, wanneer alle overige mogelijkheden om de teststof aan te bieden zijn uitgesloten. Als gebruik wordt gemaakt van een oplosmiddel, moet een bijbehorende controle met water worden uitgevoerd. Aan het einde van de test moeten de mogelijke effecten van het oplosmiddel worden beoordeeld door middel van een statistische vergelijking van de controlegroep met oplosmiddel en de controlegroep met water. De meest relevante eindpunten voor deze beoordeling zijn het ontwikkelingsstadium, de SVL en het natte gewicht, omdat deze kunnen worden beïnvloed door niet-schildkliergerelateerde vormen van toxiciteit. Als statistisch significante verschillen in deze eindpunten worden ontdekt tussen de controlegroep met schoon water en de controlegroep met oplosmiddel, moeten de eindpunten voor de mate van respons worden bepaald aan de hand van de controle met schoon water. Als er geen statistisch significant verschil wordt ontdekt tussen de controlegroep met schoon water en de controlegroep met oplosmiddel voor alle gemeten responsvariabelen, moeten de eindpunten voor de mate van respons worden bepaald aan de hand van de controles met verzameld verdunningswater en oplosmiddel.

Testgroepen die ontwikkelingsstadium 60 en hoger bereiken

71. Na stadium 60 vertonen kikkervisjes een afname van grootte en gewicht als gevolg van weefselresorptie en vermindering van hun absolute watervolume. Daarom zijn metingen van het natte gewicht en de SVL niet goed bruikbaar in statistische analyses van verschillen in groeitempo. Derhalve moeten deze gewicht- en lengtegegevens van organismen > NF60 worden geschrapt en kunnen ze niet worden gebruikt in analyses van duplogemiddelden of -medianen. Er zijn twee andere methoden beschikbaar om deze groeiparameters te analyseren.

72. De ene houdt in dat alleen kikkervisjes tot en met ontwikkelingsstadium 60 worden gebruikt voor statistische analyses van het natte gewicht en/of de SVL. Deze methode levert naar verwachting voldoende betrouwbare gegevens op over de ernst van mogelijke groei-effecten, mits slechts een klein deel van de proefdieren (≤ 20 %) uit de analyses wordt weggelaten. Als een groter aantal kikkervisjes (≥ 20 %) in een of meer van de nominale concentraties een ontwikkeling voorbij stadium 60 vertoont, moet een bifactoriële variantieanalyse met een geneste variantiestructuur worden uitgevoerd op alle kikkervisjes om de groei-effecten in verband met chemische behandeling te bepalen, rekening houdend met het effect van het latere ontwikkelingsstadium op de groei. Aanhangsel 3 bevat richtsnoeren voor het uitvoeren van de bifactoriële variantieanalyse van gewicht en lengte.

LITERATUUR

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelpia, 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. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop,P.D. & 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. No. 82. Paris

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

▼M6

Aanhangsel 1

Tabel 1

Proefomstandigheden voor de 21-daagse amfibische metamorfosetest

Proefdier		*Xenopus laevis*-larven	
Initieel larvaal stadium		Stadium 51 volgens Nieuwkoop en Faber	
Blootstellingstermijn		21 dagen	
Selectiecriteria larven		Ontwikkelingsstadium en totale lengte (facultatief)	
Testconcentraties		Minimaal 3 concentraties waarvan de laagste en de hoogste circa één orde van grootte uiteenlopen	
Blootstellingsregime		Doorstroming (bij voorkeur) en/of statische verversing	
Stroomsnelheid testsysteem		25 ml/min (volledig volume ongeveer elke 2,7 uur vervangen)	
Primaire eindpunten / Meetdagen		Sterfte	Dagelijks
		Ontwikkelingsstadium	D 7 en 21
		Lengte achterpoten	D 7 en 21
		Lengte snuit-anus (SVL)	D 7 en 21
		Nat gewicht	D 7 en 21
		Schildklierhistologie	D 21
Verdunningswater/Laboratoriumcontrole		Ontchloord kraanwater (met koolstof gefilterd) of gelijkwaardige laboratoriumbron	
Larvale dichtheid		20 larven per testbak (5/l)	
Testoplossing/Testbak		4-10 l (minimaal 10-15 cm water) / Glazen of roestvrijstalen testbak (bijv. 22,5 × 14 × 16,5 cm)	
Duplicatie		4 replicaatbakken / testconcentratie en controle	
Aanvaardbare sterfte in controlegroepen		≤ 10 % per replicaatbak	
Schildklierfixatie	Gefixeerd aantal	Alle kikkervisjes (5/duplo initieel beoordeeld)	
	Regio	Kop of geheel lichaam	
	Fixeervloeistof	Fixeermiddel van Davidson	
Voeding	Voedsel	Sera MicronÒ of gelijkwaardig	
	Hoeveelheid/Frequentie	Zie tabel 1 voor voederregime met Sera Micron®	
Verlichting	Fotoperiode	12 u licht: 12 u donker	

▼**M6**

	Intensiteit	600 tot 2 000 lux (gemeten aan wateroppervlak)
Watertemperatuur		22 ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Gehalte aan opgeloste zuurstof		> 3,5 mg/l (> 40 % luchtverzadiging)
Chemische monsteranalyse		Eenmaal per week (4 monsternemingen per test)

▼M6

Aanhangsel 2

Rapporttabellen voor ruwe gegevens en overzichtsgegevens

Tabel 1

Algemene informatie over de teststof

Chemische informatie			
	Vul teststof, concentratie-eenheden en behandelingen in		
	Teststof:		
	Concentratie-eenheden:		
	Behandeling 1		
	Behandeling 2		
	Behandeling 3		
	Behandeling 4		
	Datum (dag 0):		Vul datum in (mm/dd/jj)
	Datum (dag 7):		Vul datum in (mm/dd/jj)
	Datum (dag 21):		Vul datum in (mm/dd/jj)

Tabel 2

Invulbladen ruwe gegevens op dag 7 en dag 21

DAG X
DATUM 00/00/00

	Concentratie	Behandeling nr.	Duplo nr.	Individu nr.	Individu id.	Ontwikkelingsstadium	SVL (mm)	Achterpootlengte (mm)	Nat gewicht organisme (mg)
RIJ	TRT	TRT#	DUP	IND	ID#	STADIUM	BL	HLL	GEWICHT
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**

	Concentratie	Behandeling nr.	Duplo nr.	Individu nr.	Individu id.	Ontwikkelingsstadium	SVL (mm)	Achterpootlengte (mm)	Nat gewicht organisme (mg)
RIJ	TRT	TRT#	DUP	IND	ID#	STADIUM	BL	HLL	GEWICHT
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**

	Concentratie	Behandeling nr.	Duplo nr.	Individu nr.	Individu id.	Ontwikkelingsstadium	SVL (mm)	Achterpootlengte (mm)	Nat gewicht organisme (mg)
RIJ	TRT	TRT#	DUP	IND	ID#	STADIUM	BL	HLL	GEWICHT
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**

	Concentratie	Behandeling nr.	Duplo nr.	Individu nr.	Individu id.	Ontwikkelingsstadium	SVL (mm)	Achterpootlengte (mm)	Nat gewicht organisme (mg)
RIJ	TRT	TRT#	DUP	IND	ID#	STADIUM	BL	HLL	GEWICHT
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Tabel 3

Berekende samenvattingen van eindpuntgegevens op dag 7 en dag 21

		Ontwikkelingsstadium			SVL (mm)		Achterpootlengte (mm)		Gewicht (mg)	
TRT	DUP	MIN	MEDIAAN	MAX	GEM	STD AFW	GEM	STD AFW	GEM	STD AFW
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!

N.B. De berekeningen in de cellen worden uitgevoerd met de in tabel 2 ingevoerde waarden.

Tabel 4

Dagelijkse sterftecijfers

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!																
Totaal duplo		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Totaal behandeling		0				0				0				0			

N.B. De berekeningen in de cellen worden uitgevoerd met de in tabel 1 ingevoerde waarden.

Tabel 5

Criteria voor waterkwaliteit

Blootstellingssysteem (doorstroming/statische verversing):
Temperatuur:
Lichtsterkte:
Cyclus licht-donker:
Voeding:
Voederfrequentie:
pH-waarde water:
Jodiumgehalte in testwater:

▼**M6**

Tabel 6

Samenvatting scheikundige gegevens

Chemische benaming																				
CAS:																				
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!																				

N.B. De berekeningen in de cellen worden uitgevoerd met de in tabel 1 ingevoerde waarden.

▼**M6**

Tabel 7

Histopathologie: rapporttabellen voor kerncriteria

Datum: Stof: Patholoog:

Controledier-id — duplo 1	Controledier-id — duplo 2	Schildklier hypertrofie	Schildklier atrofie	Folliculaire hypertrofie	Folliculaire hyperplasie
Totaal:					

Dosisdier-id duplo 1	Dosisdier-id — duplo 2	Schildklier hypertrofie	Schildklier atrofie	Folliculaire hypertrofie	Follicularie hyperplasie
Totaal:					

Dosisdier-id — duplo 1	Dosisdier-id — duplo 2	Schildklier hypertrofie	Schildklier atrofie	Folliculaire hypertrofie	Folliculaire hyperplasie
Totaal:					

Dosisdier-id — duplo 1	Dosisdier-id — duplo 2	Schildklier hypertrofie	Schildklier atrofie	Folliculaire hypertrofie	Follicularie hyperplasie
Totaal:					

▼**M6**

Tabel 8

Histopathologie: aanvullende criteria

Datum: Stof: Patholoog:

Controledier- id — duplo 1		Toename folliculair lumen	Afname folliculair lumen
Controledier- id — duplo 2			
Totaal:			

Dosisdier- id — duplo 1		Toename folliculair lumen	Afname folliculair lumen
Dosisdier - id — duplo 2			
Totaal:			

Dosisdier- id — duplo 1		Toename folliculair lumen	Afname folliculair lumen
Dosisdier- id — duplo 2			
Totaal:			

Dosisdier- id — duplo 1		Toename folliculair lumen	Afname folliculair lumen
Dosisdier- id — duplo 2			
Totaal:			

▼**M6**

Tabel 9

Narratieve beschrijvingen voor histopathologische bevindingen

Datum:

Stof:

Patholoog:

		Narratieve beschrijving
Controledier-id — duplo 1		
Controledier-id — duplo 2		
Dosisdier-id — duplo 1		
Dosisdier-id — duplo 2		

▼**M6**

Dosisdier-id — duplo 1		
Dosisdier-id — duplo 2		
Dosisdier-id — duplo 1		
Dosisdier-id — duplo 2		

▼M6

Tabel 10

Samenvattend rapportmodel voor dag x (7 of 21) van de AMA

		Controle				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
Eindpunt	Duplo	Gem.	SA	VC	N	Gem.	SA	VC	N	p-waarde	Gem.	SA	VC	N	p-waarde	Gem.	SA	VC	N	p-waarde
Achterpoot-lengte (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Gem.:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Gem.:																			
Nat gewicht (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Gem.:																			

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 1855

▼M6

Tabel 11

Samenvattend rapportmodel voor het ontwikkelingsstadium op dag x (7 of 21) van de AMA

		Controle				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
	Duplo	Mediaan	Min.	Max.	N	Mediaan	Min.	Max.	N	p-waarde	Mediaan	Min.	Max.	N	p-waarde	Mediaan	Min.	Max.	Mediaan	p-waarde
Ontwikkelingsstadium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Gem.:																			

▼M6

Aanhangsel 3

Alternatieve analyse van gewicht en lengte in geval van ontwikkeling naar latere stadia bij meer dan 20 % van de kikkervisjes in een of meer concentraties

Als een groter aantal kikkervisjes (≥ 20 %) in een of meer van de nominale concentraties een ontwikkeling voorbij stadium 60 vertoont, moet een bifactoriële variantieanalyse met een geneste variantiestructuur worden uitgevoerd op alle kikkervisjes om de groei-effecten in verband met chemische behandeling te bepalen, rekening houdend met het effect van het latere ontwikkelingsstadium op de groei.

Het voorstel is om alle gegevens te gebruiken maar rekening te houden met het effect van de ontwikkeling tot latere stadia. Dit is mogelijk met een bifactoriële variantieanalyse met een geneste variantiestructuur. Definieer LateStage=„Yes” [later stadium = ja] voor een dier dat zich in ontwikkelingsstadium 61 of hoger bevindt. Anders definieert u LateStage=„No” [later stadium = nee]. Vervolgens kan er een bifactoriële variantieanalyse worden uitgevoerd op de concentratie, het latere ontwikkelingsstadium en hun interactie, met Rep(Conc) [duplo(concentratie)] als random factor en Tadpole(Rep) [kikkervisje(duplo)] als ander random effect. Zo blijft de duplo de analyse-eenheid en worden in wezen dezelfde uitkomsten bereikt als met een gewogen analyse van rep*latestage means [duplo*gemiddelden bij later ontwikkelingsstadium], gewogen naar het aantal dieren per gemiddelde. Als de gegevens inbreuk maken op de vereiste normale verdeling of homogene variantie van de variantieanalyse, kan een genormaliseerde rangordetransformatie worden uitgevoerd om dat bezwaar weg te nemen.

Naast de standaard F-toets voor variantieanalyse van de effecten van Conc, LateStage en hun interactie kan de F-toets van de interactie worden „opgesplitst” in twee aanvullende F-tests, de ene van de gemiddelde respons voor alle concentraties bij LateStage=„No” en de andere van de gemiddelde respons voor alle concentraties bij LateStage=„Yes”. Verdere vergelijking van testgemiddelden versus controlegemiddelden vindt plaats binnen elk niveau van LateStage. Er kan een soort trendanalyse worden gemaakt met behulp van geschikte contrasten of er kunnen eenvoudigweg paarsgewijze vergelijkingen worden uitgevoerd als er aanwijzingen zijn voor niet-monotone dosisrespons binnen een niveau van de LateStage-variabele. Een correctie op de p-waarden volgens Bonferroni-Holm wordt alleen aangebracht als het bijbehorende F-deel niet significant is. Deze correctie kan worden uitgevoerd in SAS en waarschijnlijk ook in andere softwareprogramma's. Er kunnen complicaties optreden wanneer in sommige concentraties geen dieren in latere ontwikkelingsstadia voorkomen, maar zulke situaties kunnen direct en eenvoudig worden opgelost.

▼**M6**

Aanhangsel 4

Definities

Chemische stof: een stof of mengsel.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M6

C.39. REPRODUCTIETEST MET SPRINGSTAARTEN IN DE BODEM

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtsnoer (TG) 232 (2009) van de OESO. Deze testmethode is ontworpen om de effecten van chemische stoffen op het reproductieresultaat van springstaarten in de bodem vast te stellen en is gebaseerd op bestaande procedures (1) (2). De parthenogenetische *Folsomia candida* en de zich seksueel reproducerende *Folsomia fimetaria* zijn twee van de meest toegankelijke soorten van de springstaart. Ze zijn ook kweekbaar en commercieel beschikbaar. Wanneer specifieke, niet door de twee soorten bestreken habitats moeten worden beoordeeld, kan de procedure ook worden uitgebreid naar andere soorten van de springstaart op voorwaarde dat ze voldoen aan de geldigheidscriteria van de test.

2. In de bodem levende springstaarten zijn ecologische relevante soorten voor ecotoxicologische tests. Springstaarten zijn zespotigen met een dun exoskelet dat zeer lucht- en waterdoorlaatbaar is. Ze vormen een soort geleedpotigen met een andere blootstellingsroute en een ander exposietempo dan regenwormen en enchytreeën.

3. De populatiedichtheid van de springstaart bereikt gewoonlijk 10^5 m^{-2} in lagen aarde en bladafval in veel terrestriale ecosystemen (3) (4). Volwassen dieren meten meestal 0,5 — 5 mm en hun bijdrage aan de totale dierlijke biomassa en bodemdoorluchting is laag, naar schatting tussen 1 en 5 % (5). Hun belangrijkste rol is daarom waarschijnlijk die van mogelijke procesregelaars door predatie van microbivoren en microfauna. Springstaarten zijn prooidieren voor een grote variëteit aan ondergronds en bovengronds levende ongewervelde dieren, zoals mijten, duizendpoten, spinnen, loopkevers en kortschildkevers. Springstaarten dragen bij aan de afbraakprocessen in zure bodems, waar ze naast enchytreeën de belangrijkste in de bodem levende ongewervelde dieren zijn, aangezien er doorgaans geen regenwormen en miljoenpoten voorkomen.

4. De soort *F. fimetaria* komt over heel de wereld voor en is gangbaar in verschillende typen bodems, gaande van zandig tot lemig en van mull tot mor. Het is een oogloze, ongepigmenteerde springstaart. Hij is gedocumenteerd in agrarische gronden overal in Europa (6). Hij heeft een omnivore eetgewoonte, met schimmeldraden, bacteriën, protozoa en afval in zijn voedsel. Hij heeft door zijn eetgewoonte interactie met infecties van plantenziekteverwekkende schimmels (7) en is mogelijk van invloed op mycorrhiza, zoals zeker het geval is bij *F. candida*. Zoals de meeste springstaartsoorten plant deze soort zich geslachtelijk voort, waarbij de permanente aanwezigheid van mannetjes noodzakelijk is voor bevruchting van de eieren.

5. *F. candida* komt eveneens op de hele wereld voor. Hij wordt in de meeste natuurlijke bodems niet vaak aangetroffen, maar komt wel veel in grote aantallen voor op humusrijke plaatsen. Ook deze springstaart heeft geen ogen en is niet gepigmenteerd. Hij heeft een goed ontwikkelde furca (springorgaan), vertoont actieve renbewegingen en springt snel als hij wordt verstoord. De ecologische rol van *F. candida* is soortgelijk als die van *F. fimetaria*, maar zijn habitats bestaan uit organischer, rijkere bodems. Deze soort plant zich parthenogenetisch voort. Soms is minder dan 1 op de 1 000 van een populatie mannelijk.

PRINCIPE VAN DE TEST

6. Synchrone volwassen (*F. fimetaria*) of juveniele (*F. candida*) springstaarten worden blootgesteld aan uiteenlopende concentraties van de teststof die is gemengd door gemodificeerde kunstmatige grond (8) met behulp van 5 % organische bodemstoffen (of andere grond). Het testscenario bestaat uit twee stappen:

— een bereikbepalingstest, in het geval dat niet voldoende informatie over toxiciteit beschikbaar is, waarin sterfte en reproductie de belangrijkste

▼M6

eindpunten zijn die na 2 weken worden beoordeeld voor *F. fimetaria* en na 3 weken voor *F. candida*.

— een definitieve reproductietest waarin het totale aantal juvenielen dat door de oorspronkelijke dieren is voortgebracht en het aantal overlevende volwassen dieren worden vastgesteld. De duur van deze definitieve test is 3 weken voor *F. fimetaria* of 4 weken voor *F. candida*.

Het toxische effect van de teststof op de sterfte onder volwassenen en op het reproductieresultaat wordt uitgedrukt in LC_x en EC_x door de gegevens in een geschikt model onder te brengen door middel van non-lineaire regressie teneinde de concentratie te berekenen die respectievelijk x % sterfte of vermindering van het reproductieresultaat zou veroorzaken, of uitgedrukt in de NOEC/LOEC-waarde (9).

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

7. De fysische eigenschappen, de wateroplosbaarheid, de log K_{ow}, de bodem-water-verdelingscoëfficiënt en de dampdruk van de teststof dienen bij voorkeur bekend te zijn. Aanvullende informatie over het lot van de teststof in de bodem, zoals de snelheid van fotolyse, hydrolyse en biologische afbraak, is gewenst. Indien beschikbaar moeten de chemische identificatiegegevens van de teststof volgens de IUPAC-nomenclatuur, het CAS-nummer, de partij, de zending, de structuurformule en de zuiverheid worden gedocumenteerd.

8. Deze testmethode kan worden gebruikt voor in water oplosbare en niet in water oplosbare stoffen. De wijze waarop de teststof wordt toegepast, verschilt dan echter dienovereenkomstig. De testmethode is niet bruikbaar voor vluchtige stoffen, d.w.z. stoffen waarvoor de constante van Henry of de lucht-waterverdelingscoëfficiënt groter is dan één of stoffen waarvan de dampdruk bij 25 °C hoger is dan 0,0133 Pa.

GELDIGHEID VAN DE TEST

9. Voor een geldig testresultaat moet in de onbehandelde controlegroepen aan de volgende criteria zijn voldaan:

— De gemiddelde sterfte onder volwassen dieren mag aan het eind van de test niet hoger zijn dan 20 %.

— Het gemiddelde aantal juvenielen per potje moet aan het eind van de test minimaal 100 zijn.

— De voor het aantal juvenielen berekende variatiecoëfficiënt moet aan het eind van de test minder dan 30 % zijn.

REFERENTIESTOF

10. Er dient voor de gekozen testbodemsoort een referentiestof te worden getest bij een concentratie van EC_{50} (met regelmatige intervallen of indien mogelijk als onderdeel van elke testuitvoering) om te controleren of de respons van de testorganismen in het testsysteem op het normale niveau ligt. Een geschikte referentiestof is boorzuur, dat de reproductie bij beide soorten met 50 % zou moeten verminderen (10) (11) bij ongeveer 100 mg/kg droog bodemgewicht.

BESCHRIJVING VAN DE TEST

Monsterpotjes en uitrusting

11. Geschikte monsterpotjes zijn houders die 30 g vochtige aarde kunnen bevatten. Ze moeten gemaakt zijn van glas of inert kunststof (niet-toxisch). Het gebruik van kunststof houders dient echter te worden vermeden indien de blootstelling aan de teststof afneemt als gevolg van sorptie. De doorsnede

▼M6

van de monsterpotjes moet een feitelijke gronddikte in het potje van 2-4 cm mogelijk maken. De potjes moeten zijn voorzien van deksels (bijv. van glas of polyetheen) die zijn ontworpen om waterverdamping tegen te gaan en gaswisseling tussen bodem en lucht toe te laten. De houder moet ten minste gedeeltelijk transparant zijn om lichtdoorlating mogelijk te maken.

12. Er is een normale laboratoriumuitrusting vereist, meer specifiek de volgende onderdelen:

— droogkast;

— stereomicroscoop;

— pH-meter en luxmeter;

— weegschalen met toereikende nauwkeurigheid;

— geschikte apparatuur voor temperatuurregeling;

— geschikte apparatuur voor luchtvochtigheidsbeheersing (niet essentieel indien de monsterpotjes met deksels zijn afgesloten);

— incubator of kleine ruimte met temperatuurregeling;

— tang of luchtaanzuigapparaat.

Wijze van bereiding van de testbodem

13. Er wordt gebruikgemaakt van gemodificeerde kunstmatige grond (8) met een gehalte aan organische stoffen van 5 %. Als alternatief kan natuurlijke grond worden gebruikt wanneer de kunstmatige grond niet overeenkomt met natuurlijke grondsoorten. De aanbevolen samenstelling van de kunstmatige grond is als volgt (op basis van droog gewicht, gedroogd tot constant gewicht bij 105 °C):

— 5 % veenmosturf, aan de lucht gedroogd en fijngemalen (een korrelgrootte van 2 ± 1 mm is aanvaardbaar);

— 20 % kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

— ongeveer 74 % aan de lucht gedroogd industrieel zand (afhankelijk van de benodigde hoeveelheid $CaCO_3$), overwegend fijn zand waarvan meer dan 50 % van de korrels tussen 50 en 200 micron groot is. De exacte hoeveelheid zand hangt af van de hoeveelheid $CaCO_3$ (zie onder). Samen moeten deze hoeveelheden 75 % bedragen.

— 1,0 % calciumcarbonaat ($CaCO_3$, in poedervorm, van analytische kwaliteit) om een pH van 6,0 ± 0,5 te bereiken; de toe te voegen hoeveelheid calciumcarbonaat kan hoofdzakelijk afhangen van de kwaliteit/aard van de turf (zie noot 1).

Noot 1: De vereiste hoeveelheid $CaCO_3$ hangt af van de componenten van het bodemsubstraat en moet worden bepaald door het meten van de pH-waarde van nog niet geïncubeerde vochtige grondmonsters onmiddellijk voorafgaand aan de test.

Noot 2: Het verdient aanbeveling de pH-waarde en facultatief de C/N-verhouding, de capaciteit voor kationuitwisseling (CEC) en het gehalte aan organische stoffen van de grond te meten teneinde in een later stadium normalisatie en een betere interpretatie van de resultaten mogelijk te maken.

Noot 3: Indien vereist, bijvoorbeeld voor specifieke testdoeleinden, kan ook natuurlijke grond afkomstig van niet-verontreinigde plaatsen als test- en/of kweeksubstraat dienen. Wanneer natuurlijke grond wordt gebruikt, moet deze worden gekarakteriseerd met ten minste de oorsprong (plaats van waar hij afkomstig is), de pH, de textuur (korrelgrootteverdeling), de CEC en het gehalte aan organische stoffen. Bovendien moet de grond vrij zijn van elke vorm van verontreiniging. Er wordt aanbevolen alvorens natuurlijke grond in een definitieve test te gebruiken, aan te tonen dat de grond geschikt is voor testdoeleinden en voldoet aan de geldigheidscriteria van de test.

▼M6

14. De droge bestanddelen van de grond worden grondig gemengd (bijv. in een grote laboratoriummenger). Het maximale waterhoudende vermogen (WHC) van de kunstmatige grond wordt bepaald overeenkomstig de in aanhangsel 5 beschreven procedures. Het vochtgehalte van de testgrond moet worden geoptimaliseerd om een losse, poreuze bodemstructuur te verkrijgen waarin de poriën toegankelijk zijn voor springstaarten. Dit gehalte is gewoonlijk 40-60 % van het maximale WHC.

15. De droge kunstmatige grond wordt vooraf bevochtigd door toevoeging van genoeg gedeïoniseerd water om 2 tot 7 dagen voor aanvang van de test ongeveer de helft van het uiteindelijke vochtgehalte te verkrijgen teneinde de zuurgraad in evenwicht te brengen en te stabiliseren. Voor de bepaling van de pH wordt een mengsel van grond en een oplossing van 1 M kaliumchloride (KCl) of 0,01 M calciumchloride ($CaCl_2$) in een verhouding 1:5 gebruikt (overeenkomstig aanhangsel 6). Als de zuurgraad hoger is dan het voorgeschreven bereik, kan deze worden gecorrigeerd door toevoeging van een passende hoeveelheid $CaCO_3$. Als de grond te basisch is, kan dit worden gecorrigeerd door toevoeging van een anorganisch zuur dat onschadelijk is voor springstaarten.

16. De vooraf bevochtigde grond wordt in porties verdeeld die overeenkomen met het aantal testconcentraties (en referentiestoffen, voor zover van toepassing) en controlegroepen dat voor de test wordt gebruikt. De teststoffen worden toegevoegd en het watergehalte wordt geregeld zoals beschreven in punt 24.

Selectie en preparatie van de proefdieren

17. De parthenogenetische *F. candida* is de aanbevolen soort, aangezien deze soort bij de ringtests van de testmethode (11) vaker dan *V. fimetaria* voldeed aan de geldigheidscriteria voor overleving. Als er een andere soort wordt gebruikt, moet deze voldoen aan de in punt 9 uiteengezette geldigheidscriteria. Aan het begin van de test moeten de dieren goed doorvoed zijn en 23-26 dagen oud voor *F. fimetaria* of 9-12 dagen voor *F. candida*. Het vereiste aantal *F. fimetaria* bedraagt voor iedere duplo 10 mannetjes en 10 vrouwtjes. Voor *F. candida* moeten 10 vrouwtjes worden gebruikt (zie bijlage 2 en bijlage 3). De synchrone dieren worden willekeurig uit de houders geselecteerd en hun gezondheid en fysieke conditie wordt gecontroleerd voor elke partij die in een duplo wordt geplaatst. Iedere groep van 10/20 individuen wordt in een willekeurig gekozen testbak geplaatst en de grote vrouwtjes van *F. fimetaria* worden geselecteerd omdat ze duidelijk te onderscheiden zijn van de mannetjes van dezelfde soort.

Bereiding van de testconcentraties

18. Er kunnen vier methoden worden gebruikt om de teststof toe te passen: 1) menging van de teststof in de grond met water als draagstof, 2) menging van de teststof in de grond met een organisch oplosmiddel als draagstof, 3) menging van de teststof in de grond met zand als draagstof of 4) aanbrengen van de teststof op het grondoppervlak. De keuze van de meest geschikte methode hangt af van de kenmerken van de teststof en het doel van de test. In het algemeen wordt aanbevolen de teststof in de grond te mengen. Aanbrengen kan echter geboden zijn als de aanbrengprocedure overeenstemt met het gebruik van de teststof in de praktijk (bijv. verneveling van vloeistofformuleringen of gebruik van speciale bestrijdingsmiddelformuleringen zoals korrels of zaadbehandelingen). De grond wordt behandeld voordat de springstaarten worden toegevoegd. Alleen wanneer de teststof wordt aangebracht op het grondoppervlak moeten de springstaarten eerst de gelegenheid krijgen de grond binnen de dringen.

Teststof oplosbaar in water

19. Er wordt een oplossing van de teststof in gedeïoniseerd water bereid in een hoeveelheid die voldoende is voor alle duplo's van één testconcentratie. Elke teststofoplossing wordt grondig gemengd met één partij vooraf bevochtigde grond alvorens in het monsterpotje te worden gebracht.

Teststof onoplosbaar in water

20. Voor stoffen die niet in water maar wel in organische oplosmiddelen kunnen worden opgelost, kan de teststof worden opgelost in de kleinst mogelijke

▼M6

hoeveelheid van een geschikt oplosmiddel (bijv. aceton) terwijl toch wordt toegezien op de juiste menging van de stof in de grond en met een deel van het vereiste kwartszand. Er dienen uitsluitend vluchtige oplosmiddelen te worden gebruikt. Wanneer een organisch oplosmiddel wordt gebruikt, moeten alle testconcentraties en een extra negatieve oplosmiddelcontrole dezelfde minimumhoeveelheid oplosmiddel bevatten. Houders waarin de teststof is aangebracht, moeten gedurende een bepaalde periode onbedekt blijven om het bij het aanbrengen van de teststof gebruikte oplosmiddel te laten verdampen, waarbij erop moet worden toegezien dat onderwijl geen dissipatie van de toxische stof optreedt.

Teststof slecht oplosbaar in water en organische oplosmiddelen

21. Voor stoffen die slecht oplosbaar zijn in water en organische oplosmiddelen, wordt kwartszand, dat deel moet uitmaken van de totale hoeveelheid zand die aan de grond wordt toegevoegd, gemengd met de hoeveelheid teststof die nodig is om de gewenste testconcentratie te verkrijgen. Het mengsel van kwartszand en teststof wordt toegevoegd aan de vooraf bevochtigde grond en grondig gemengd nadat een passende hoeveelheid gedeïoniseerd water is toegevoegd om het vereiste vochtgehalte te verkrijgen. Het uiteindelijke mengsel wordt over de monsterpotjes verdeeld. Deze procedure wordt voor elke testconcentratie herhaald en tevens wordt een geschikte controle bereid.

Aanbrengen van de teststof op het grondoppervlak

22. Wanneer de teststof een bestrijdingsmiddel is, kan deze soms het beste op het grondoppervlak worden aangebracht door middel van verneveling. De grond wordt behandeld nadat de springstaarten zijn toegevoegd. De monsterpotjes worden eerst gevuld met het bevochtigde grondsubstraat, daarna worden de dieren toegevoegd en vervolgens worden de monsterpotjes gewogen. Om directe blootstelling van de dieren aan de teststof door rechtstreeks contact te vermijden, wordt de teststof pas minimaal een halfuur na de introductie van de springstaarten aangebracht. De teststof moet zo gelijkmatig mogelijk op het grondoppervlak worden aangebracht met behulp van een geschikt benevelingsapparaat van laboratoriumformaat waarmee de toepassing in het veld wordt gesimuleerd. Het aanbrengen moet gebeuren bij een maximale temperatuurafwijking van ± 2 °C. Voor waterige oplossingen, emulsies of dispersies moet een toepassingsdosis gebruikt worden die in overeenstemming is met de aanbevelingen van de risicoanalyse. De snelheid moet worden gecontroleerd met behulp van een geschikte kalibratiemethode. Speciale formuleringen, zoals korrels of zaadbehandelingen, kunnen worden aangebracht op een wijze die overeenstemt met agrarisch gebruik. Voedsel wordt toegevoegd na de beneveling.

PROCEDURE

Testomstandigheden

23. De gemiddelde testtemperatuur dient 20 ± 1 °C te zijn bij een temperatuurbereik van 20 ± 2 °C. De test wordt uitgevoerd in geregelde cycli van licht en donker (bij voorkeur 12 uur licht en 12 uur donker) met een belichting van 400 tot 800 lux in de ruimte met de monsterpotjes.

24. Om de grondvochtigheid na te gaan, worden de potjes gewogen bij aanvang, halverwege en aan het eind van de test. Gewichtsverlies van > 2 % wordt ongedaan gemaakt door toevoeging van gedeïoniseerd water. Hierbij zij opgemerkt dat het waterverlies kan worden beperkt door handhaving van een hoge luchtvochtigheid (> 80 %) in de testincubator.

25. De pH-waarde moet worden gemeten aan het begin en het einde van zowel de bereikbepalingstest als de definitieve test. Er moeten metingen worden uitgevoerd op één extra controlemonster en één extra monster van (alle concentraties) behandelde bodemmonsters die op dezelfde wijze zijn bereid en onderhouden als de testkweken, maar zonder toevoeging van springstaarten.

Testprocedure en -metingen

26. Voor elke testconcentratie wordt een hoeveelheid testgrond die overeenkomt met 30 g vers gewicht in het monsterpotje gebracht. Ook worden watercontroles, zonder teststof, bereid. Als er een drager wordt gebruikt voor het

▼M6

aanbrengen van de teststof, moet er naast de testreeks één controlereeks worden gemaakt die alleen de drager bevat. De oplosmiddel- of dispergeermiddelconcentratie moet dezelfde zijn als in de potjes met de teststof.

27. De individuele springstaarten worden voorzichtig overgebracht naar een monsterpotje (waaraan ze willekeurig zijn toegewezen) en op het grondoppervlak geplaatst. Om de dieren doeltreffend over te brengen, kan een luchtaanzuigapparaat worden gebruikt. Het aantal duplo's voor testconcentraties en voor controles hangt af van de testopzet. De monsterpotjes worden willekeurig in de incubator geplaatst en hun posities worden wekelijks opnieuw gerandomiseerd.

28. Voor de test met *F. fimetaria* moeten er per monsterpotje 20 volwassen dieren, 10 mannetjes en 10 vrouwtjes, van 23-26 dagen oud worden gebruikt. Op dag 21 worden de springstaarten uit de grond geëxtraheerd en geteld. Bij *F. fimetaria* worden de geslachten onderscheiden naar grootte in de gesynchroniseerde partij dieren die voor de test wordt gebruikt. De vrouwtjes zijn kenmerkend groter dan de mannetjes (zie aanhangsel 3).

29. Voor de test met *F. candida* moeten er per monsterpotje 10 juvenielen van 9-12 dagen oud worden gebruikt. Op dag 28 worden de springstaarten uit de grond geëxtraheerd en geteld.

30. Als geschikte voedingsbron wordt een toereikende hoeveelheid, bijv. 2-10 mg, voor huishoudelijk gebruik verkrijgbare bakkersgistkorrels in elk van de potjes gebracht bij aanvang van de test en na ongeveer 2 weken.

31. Aan het eind van de test worden de sterfte en de reproductie geanalyseerd. Na 3 weken (*F. fimetaria*) of 4 weken (*F. candida*) worden de springstaarten uit de testgrond geëxtraheerd (zie aanhangsel 4) en geteld (12). Een springstaart die bij de extractie ontbreekt, wordt geregistreerd als gestorven. De extractie- en telmethode moet worden gevalideerd. Tot de validatiecriteria behoort een extractiedoeltreffendheid voor juvenielen van meer dan 95 %, bijv. door bij het aantal een bekend aantal in de grond op te tellen.

32. Een praktische samenvatting en een tijdschema voor de testprocedure vindt u in aanhangsel 2.

Testopzet

Bereikbepalingstest

33. Indien noodzakelijk wordt er een bereikbepalingstest uitgevoerd met bijvoorbeeld vijf teststofconcentraties van 0,1, 1,0, 10, 100 en 1 000 mg/kg drooggewicht van de grond en twee duplo's voor elke test- en controlegroep. Ook aanvullende informatie over sterfte of reproductie van springstaarten, afkomstig uit tests met soortgelijke stoffen of uit de literatuur, kan bruikbaar zijn bij de keuze van de te gebruiken testconcentraties in de bereikbepalingstest.

34. De duur van de bereikbepalingstest is twee weken voor *F. fimetaria* en drie weken voor *F. candida*, om te garanderen dat één legsel van juvenielen is geproduceerd. Aan het eind van de test worden de sterfte en de reproductie van de springstaarten vastgesteld. De aantallen volwassen dieren en juvenielen moeten worden geregistreerd.

Definitieve test

35. Voor de bepaling van EC_x (bijv. EC_{10}, EC_{50}) moeten er twaalf concentraties worden getest. Aanbevolen worden ten minste twee duplo's per testconcentratie en zes controleduplo's. De tussenliggende factor kan variëren afhankelijk van het dosisresponspatroon.

▼M6

36. Voor de bepaling van de NOEC/LOEC moeten er ten minste vijf concentraties in een geometrische reeks worden getest. Aanbevolen worden vier duplo's per testconcentratie plus acht controles. De concentraties moeten worden gescheiden door een tussenliggende factor van ten hoogste 1,8.

37. Met een gecombineerde aanpak kunnen zowel de NOEC/LOEC als ECx worden bepaald. Voor deze gecombineerde aanpak moeten er acht testconcentraties in een geometrische reeks worden gebruikt. Aanbevolen worden vier duplo's per behandeling plus acht controles. De concentraties moeten worden gescheiden door een tussenliggende factor van ten hoogste 1,8.

38. Als er geen effecten worden waargenomen bij de hoogste concentratie in de bereikbepalingstest (d.w.z. 1 000 mg/kg), kan de reproductietest worden uitgevoerd als limiettest met een testconcentratie van 1 000 mg/kg en de controle. Een limiettest biedt de gelegenheid om aan te tonen dat er geen statistisch significant effect optreedt bij de limietconcentratie. Er moeten acht duplo's worden gebruikt voor zowel de behandelde grond als de controle.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

39. Het reproductieresultaat is het voornaamste eindpunt (bijv. het aantal geproduceerde juvenielen per monsterpotje). In de statistische analyse, bijv. de variantieanalyse, worden de behandelconcentraties vergeleken met de T-toets van Student, de toets van Dunnett of de toets van Williams. Voor afzonderlijke testgemiddelden worden betrouwbaarheidsintervallen van 95 % berekend.

40. Het aantal overlevende volwassen dieren in de onbehandelde controlegroepen is een belangrijk geldigheidscriterium en moet worden gedocumenteerd. Evenals bij de bereikbepalingstest moeten ook alle overige tekenen van schade worden vermeld in het eindverslag.

LC_x en EC_x

41. EC_x-waarden, inclusief de bijbehorende minimale en maximale 95 % betrouwbaarheid voor de parameter, worden berekend met behulp van geschikte statistische methoden (bijv. de logistische of Weibull-functie, de vereenvoudigde methode van Spearman-Karber of eenvoudige interpolatie). Een EC_x wordt verkregen door een waarde die overeenstemt met x % van het controlegemiddelde in te voegen in de gevonden vergelijking. Om EC_{50} of een andere EC_x te berekenen, moet de volledige dataset worden onderworpen aan regressieanalyse. LC_{50} wordt gewoonlijk geschat door middel van probitanalyse of een soortgelijke analyse waarin rekening wordt gehouden met de binomiaal verdeelde sterftecijfers.

NOEC/LOEC

42. Als een statistische analyse is gericht op de bepaling van de NOEC/LOEC, zijn er statistische gegevens per potje (afzonderlijke potjes worden als duplo's beschouwd) vereist. De geschikte statistische methoden moeten worden gebruikt volgens de toepassingsrichtsnoeren in OESO-document 54 over actuele benaderingen van de statistische analyse van milieugiftigheidsgegevens (9). In het algemeen worden negatieve effecten van de teststof in vergelijking met de controle onderzocht met behulp van een eenzijdige hypothesetoets bij $p \leq 0{,}05$.

43. De normale verdeling en de homogene variantie kunnen worden getest met een geschikte statistische toets, bijv. respectievelijk de toets van Shapiro-Wilk en de toets van Levene ($p \leq 0{,}05$). Er kunnen een unidirectionele variantieanalyse en daaropvolgende multi-vergelijkingstoetsen worden uitgevoerd. Meervoudige vergelijkingen (bijv. de toets van Dunnett) of step-down

▼M6

trendtoetsen (bv. de toets van Williams) kunnen worden gebruikt om uit te rekenen of er significante verschillen ($p \leq 0,05$) bestaan tussen de controles en de verschillende teststofconcentraties (selectie van de aanbevolen toets volgens OESO-document 54 (9)). Anders zouden verdelingsvrije methoden (bijv. de U-toets van Bonferroni volgens Holm of de trendtoets van Jonckheere-Terpstra) kunnen worden toegepast om de NOEC en de LOEC te bepalen.

Limiettest

44. Als er een limiettest (vergelijking tussen controle en slechts één testgroep) is uitgevoerd en de voorwaarden voor parametrische toetsprocedures (normale verdeling, homogeniteit) zijn vervuld, kunnen meetresponsen worden beoordeeld met de T-toets van Student. Als die voorwaarden niet zijn vervuld, kan de T-toets voor ongelijke variantie (T-toets van Welch) of een verdelingsvrije toets, zoals de U-toets van Wilcoxon-Mann-Whitney, worden gebruikt.

45. Om significante verschillen tussen de controles (controle en controle met oplosmiddel) te bepalen, kunnen de duplo's van elke controle worden getoetst zoals beschreven voor de limiettest. Als bij deze toetsen geen significante verschillen worden geconstateerd, mogen alle controleduplo's en controleduplo's met oplosmiddel bij elkaar worden genomen. Anders moeten alle behandelingen worden vergeleken met de controle met oplosmiddel.

Testverslag

46. Het testverslag moet ten minste de volgende informatie bevatten:

Teststof

— de identificatiegegevens van de teststof, het CAS-nummer, de partij, de zending, de zuiverheid;

— indien beschikbaar, de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof (bijv. log Kow, wateroplosbaarheid, dampdruk, constante van Henry (H) en bij voorkeur informatie over het lot van de teststof in de bodem);

— specificatie van de formulering van de teststof en de toegevoegde middelen indien niet de zuivere stof wordt getest;

Testorganismen

— identificatie van de soort en de leverancier van de testorganismen, een beschrijving van de kweekomstandigheden en het leeftijdsbereik van de testorganismen;

Testomstandigheden

— beschrijving van de testopzet en -procedure;

— details van de bereiding van de testgrond; gedetailleerde specificatie indien natuurlijke grond wordt gebruikt (oorsprong, geschiedenis, korrelgrootteverdeling, pH, gehalte aan organische stoffen);

— waterhoudend vermogen van de grond;

— beschrijving van de toegepaste methode om de teststof in/op de grond aan te brengen;

— testomstandigheden: lichtsterkte, duur van licht-donkercycli, temperatuur;

— beschrijving van het voederregime, de soort en hoeveelheid voedsel die is gebruikt, voederdata;

— pH en watergehalte van de grond bij aanvang en aan het eind van de test (controle en elk van de testgroepen);

— gedetailleerde beschrijving van de extractiemethode en de doeltreffendheid van de extractie;

▼M6

Testresultaten

— het aantal juvenielen dat per monsterpotje aan het eind van de test is vastgesteld;

— het aantal volwassen dieren en hun sterfte (%) per monsterpotje aan het eind van de test;

— een beschrijving van onmiskenbare fysiologische of pathologische symptomen of karakteristieke gedragsveranderingen;

— de resultaten die zijn verkregen met de referentiestof;

— de NOEC/LOEC-waarden, LC_x voor sterfte en EG_x voor reproductie (vooral LC_{50}, LC_{10}, EG_{50} en EG_{10}) samen met 95 % betrouwbaarheidsintervallen. Een diagram van het toegepaste model voor de berekening, de functievergelijking en de parameters (zie (9));

— alle informatie en opmerkingen die nuttig kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten;

— onderscheidend vermogen van de feitelijke test indien toetsing van een hypothese plaatsvindt (9);

— afwijkingen van in deze testmethode beschreven procedures en eventuele ongebruikelijke gebeurtenissen tijdens de test;

— geldigheid van de test;

— wanneer de NOEC is geschat, het minimaal detecteerbare verschil.

LITERATUUR

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H and 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 SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 pp. (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. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-Neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268

(8) Hoofdstuk C.36 van deze bijlage, *Reproductieproef voor roofmijten (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) in de grond.*

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

Aanhangsel 1

Definities

Voor deze testmethode gelden de volgende definities (in deze test worden alle uitkomstconcentraties uitgedrukt als een massa teststof per droge massa testgrond):

ECx (effect concentration for x % effect) is de concentratie die binnen een gegeven blootstellingperiode x % van een effect op testorganismen veroorzaakt in vergelijking met een controlegroep. EC_{50} is bijvoorbeeld een concentratie op een eindpunt in de test die een uitwerking heeft bij naar schatting 50 % van een blootgestelde populatie in een gedefinieerde blootstellingstermijn.

LOEC (lowest observed effect concentration) is de laagste concentratie van de teststof waarbij binnen een gegeven blootstellingperiode wel een statistisch significant effect wordt waargenomen ($p < 0,05$) in vergelijking met de controlegroep.

NOEC (no observed effect concentration) is de concentratie van de teststof waarbij geen effect wordt waargenomen. In deze test heeft de met de NOEC overeenkomende concentratie binnen een gegeven blootstellingstermijn geen statistisch significant effect ($p < 0,05$) in vergelijking met de controlegroep.

Stof betekent een stof of een mengsel.

Teststof betekent een volgens deze testmethode geteste stof.

▼M6

Aanhangsel 2

Belangrijkste handelingen en tijdschema voor een test met springstaarten

De stappen in de test kunnen als volgt worden samengevat:

Tijd (dag)	Handeling
– 23 tot – 26	Bereiden van synchrone kweek *F. fimetaria*
– 14	Bereiden van kunstmatige grond (mengen van droge bestanddelen) Controle en eventuele correctie van de pH van de kunstmatige grond Meten van max. WHC van de grond
– 9 tot –12	Bereiden van synchrone kweek *F. candida*
– 2 tot – 7	Vooraf bevochtigen van grond
– 1	Verdelen van juvenielen in partijen Bereiden stamoplossingen en aanbrengen teststof indien oplosmiddel vereist is
0	Bereiden stamoplossingen en aanbrengen teststof indien vaste stof, in water oplosbare stof of aanbrengen op oppervlak vereist is Meten van grond-pH en wegen van de houders Voeding aanbrengen. Springstaarten inbrengen
14	Bereikbepalingstest met *F. fimetaria*: beëindigen test, extractie dieren, meten van grond-pH en waterverlies (gewicht) Definitieve tests: meten van vochtgehalte, aanvullen van water en toevoeging 2-10 mg gist
21	Definitieve test met *F. fimetaria*: beëindigen test, extractie dieren, meten van grond-pH en waterverlies (gewicht) Bereikbepalingstest met *F. candida*: beëindigen test, extractie dieren, meten van grond-pH en waterverlies (gewicht)
28	Definitieve test met *F. candida*: beëindigen test, extractie dieren, meten van grond-pH en waterverlies (gewicht)

▼M6

Aanhangsel 3

Richtsnoeren voor het opfokken en synchroniseren van *F. fimetaria* en *F. candida*

De tijden en tijdsduren in deze richtsnoeren moeten worden gecontroleerd voor elke specifieke springstaartstam om ervoor te zorgen dat de timing voldoende gesynchroniseerde juvenielen mogelijk maakt. In principe is de meest geschikte dag om de eieren en de synchrone juvenielen te verzamelen, afhankelijk van wanneer de volwassen dieren, nadat ze zijn overgebracht naar een vers substraat, eitjes gaan leggen en wanneer deze eitjes uitkomen.

Het verdient aanbeveling een permanente stamcultuur aan te houden, bestaande uit bijv. 50 houders/petrischaaltjes. De stamcultuur moet in goed gevoede staat worden gehouden door wekelijks voederen, drenken en verwijdering van oud voedsel en karkassen. Een tekort aan springstaarten op het substraat kan leiden tot inhibitie door meer schimmelgroei. Als de stamcultuur te vaak voor eierproductie wordt gebruikt, kan de cultuur vermoeidheid gaan vertonen. Tekenen van vermoeidheid zijn dode volwassen dieren en schimmel op het substraat. De eitjes die overblijven van de productie van synchrone dieren, kunnen worden gebruikt om de cultuur te verjongen.

In een synchrone cultuur van *F. fimetaria* onderscheiden de mannetjes zich voornamelijk in grootte van de vrouwtjes. De mannetjes zijn duidelijk kleiner dan vrouwtjes en ze lopen ook sneller. De juiste selectie van de geslachten vereist weinig oefening en kan worden bevestigd door microscopische inspectie van het genitale gebied (13).

1. **Opfokken**

1.a. *Bereiding van het kweeksubstraat*

Het kweeksubstraat is pleisterkalk (calciumsulfaat) met actieve koolstof. Dit zorgt voor een vochtig substraat, waarbij het koolstof dient om afvalgassen en uitwerpselen te absorberen (14) (15). Er kunnen verschillende vormen van koolstof worden gebruikt om de waarnemingen van springstaarten mogelijk te maken. Zo wordt bijvoorbeeld koolstofpoeder gebruikt voor *F. candida* en *F. fimetaria* (dat zwartgrijs pleisterkalk oplevert):

Substraatbestanddelen:

— 20 ml actieve koolstof

— 200 ml gedistilleerd water

— 200 ml pleisterkalk

of

— 50 g actief koolstofpoeder

— 260-300 ml gedistilleerd water

— 400 g pleisterkalk

Het substraatmengsel mag stollen voor gebruik.

1.b. *Kweken*

Springstaarten worden gehouden in houders zoals petrischaaltjes (90 × 13 mm), waarvan de bodem is bedekt met een laag van 0,5 cm pleisterkalk-koolstofsubstraat. Ze worden gekweekt bij 20 ± 1 °C met een licht-donkercyclus van 12-12 uur (400-800 lux). De houders worden voortdurend vochtig gehouden, waarbij erop wordt toegezien dat de relatieve luchtvochtigheid in de houders 100 % is. Dat kan worden gewaarborgd door de

▼M6

aanwezigheid van water in de poreuze kalk, waarbij echter moet worden vermeden dat een waterlaagje op het kalkoppervlak ontstaat. Waterverlies kan worden voorkomen met vochtige lucht in de omgeving. Eventuele dode individuen moeten verwijderd worden, net als beschimmeld voedsel. Om de eierproductie te stimuleren, moeten de volwassen dieren overgebracht worden naar petrischaaltjes met een pas bereid substraat van pleisterkalk en koolstof.

1.c. *Voedingsbron*

Bakkersgistkorrels worden gebruikt als enige voedselvoorziening voor zowel *F. candida* als *F fimetaria*. Om beschimmelen te vermijden, wordt een- of tweemaal per week vers voedsel verstrekt. Dit wordt direct in een klein hoopje op de pleisterkalk geplaatst. De massa van het aangeboden bakkersgist moet worden afgestemd op de omvang van de springstaartpopulatie, maar in de regel is 2-15 mg toereikend.

2. **Synchronisatie**

Opdat de testdieren een homogene groep zouden vormen wat betreft levensstadium en grootte, moet de test worden uitgevoerd met gesynchroniseerde dieren. De synchronisatie maakt het verder mogelijk om vanaf de leeftijd van 3 weken de mannetje en vrouwtjes van *F. fimetaria* te onderscheiden op basis van geslachtsdimorfisme, d.w.z. verschillen in grootte. Onderstaande procedure is een suggestie voor de wijze waarop gesynchroniseerde dieren kunnen worden verkregen (de praktische stappen zijn facultatief).

2.a. *Synchronisatie*

— Prepareer houders met een laag van 0,5 cm pleisterkalk-koolstofsubstraat.

— Verplaats voor de eierleg 150-200 volwassen *F. fimetaria* en 50-100 *F. candida* uit de beste 15-20 houders van de stamcultuur met 4-8 weken oud substraat naar de houders en voeder ze met 15 mg bakkersgist. Vermijd het samenbrengen van juvenielen en volwassen dieren omdat de aanwezigheid van juvenielen de eierproductie kan remmen.

— Bewaar de kweek bij 20 ± 1 °C (gemiddeld 20 °C) en een licht-donker-cyclus van 12-12 uur (400-800 lux). Zorg ervoor dat vers voedsel beschikbaar is en dat de lucht is verzadigd met water. Gebrek aan voedsel kan ertoe leiden dat de dieren zich ontlasten op de eieren waardoor er schimmelgroei op de eieren ontstaat of kan tot gevolg hebben dat *F. candida* de eigen eieren kannibaliseert. Na 10 dagen worden de eieren voorzichtig verzameld met een naald en een spatel en verplaatst naar „eierpapier” (kleine stukjes filterpapier gedoopt in pleisterkalk-koolstoofsmurrie) dat in een houder met vers pleisterkalk-koolstofsubstraat is geplaatst. Er worden een paar korrels gist aan het substraat toegevoegd om de juvenielen aan te trekken en ertoe aan te zetten het eierpapier te verlaten. Het is belangrijk dat het eierpapier en het substraat vochtig zijn, anders drogen de eitjes uit. Als alternatief kunnen de volwassen dieren uit de synchronisatiecultuurbakken worden gehaald nadat ze gedurende 2 of 3 dagen eieren hebben geproduceerd.

— Na drie dagen zijn de meeste eitjes op het eierpapier uitgekomen. Onder het eierpapier zullen enkele juveniele dieren te vinden zijn.

— Om juvenielen van gelijke leeftijd te verkrijgen, wordt het eierpapier met niet-uitgekomen eieren met een tang van het petrischaaltje verwijderd. De juvenielen, nu 0-3 dagen oud, blijven in het schaaltje en worden gevoed met bakkersgist. Niet-uitgekomen eieren worden afgevoerd.

— De eieren en de uitgekomen juvenielen worden gehouden op dezelfde manier als de volwassen dieren. Met name voor *F. fimetaria* moeten de volgende maatregelen worden genomen: zorgen voor voldoende vers voedsel, oud en beschimmeld voedsel verwijderen, na 1 week de juvenielen verdelen over nieuwe petrischaaltjes mits de dichtheid boven de 200 is.

▼**M6**

2.b. *Behandeling van springstaarten bij aanvang van de test*

— De 9-12 dagen oude *F. candida* of de 23-26 dagen oude *F. fimetaria* worden verzameld, bijv. door suctie, en vrijgelaten in een kleine houder met vochtig pleisterkalk-koolstofsubstraat. Ook wordt hun fysieke toestand gecontroleerd onder de binoculaire microscoop (gewonde en beschadigde dieren worden afgevoerd). Al deze stappen moeten worden uitgevoerd terwijl de springstaarten in vochtige lucht worden gehouden om droogtestress te vermijden, bijvoorbeeld door gebruikmaking van nat gemaakte oppervlakken enz.

— Draai de houder ondersteboven en klop op de bodem om de springstaarten op de grond te laten vallen. Statische elektriciteit moet worden geneutraliseerd omdat de dieren anders misschien gewoon de lucht invliegen of aan de zijde van de testhouder blijven hangen en uitdrogen. Voor de neutralisatie kan een ionisator of een vochtige doek onder de houder worden gebruikt.

— Het voedsel moet over heel het grondoppervlak worden verspreid en niet in één klont blijven liggen.

— Tijdens het transport en gedurende de testperiode moet worden vermeden dat er tegen de testhouders wordt gestoten of dat deze anderszins fysiek verstoord worden, omdat hierdoor de bodemdichtheid kan worden vergroot waardoor de interactie van de springstaarten wordt bemoeilijkt.

3. **Alternatieve springstaartsoorten**

Ook andere springstaartsoorten kunnen worden gekozen voor tests volgens deze testmethode, zoals *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi* en *Mesaphorura macrochaeta*. Er moet vooraf aan een aantal voorwaarden worden voldaan voordat de alternatieve soorten worden gebruikt:

— Ze moeten ondubbelzinnig worden geïdentificeerd.

— De keuze voor de soort moet worden verantwoord.

— Er moet worden gewaarborgd dat de reproductieve biologie deel uitmaakt van de testfase zodat deze een mogelijk doel is tijdens de blootstelling.

— De levensgeschiedenis moet bekend zijn: leeftijd bij rijpwording, duur van de eierontwikkeling en het stadium dat wordt onderworpen aan blootstelling.

— Optimale voorwaarden voor groei en reproductie moeten worden verschaft door het testsubstraat en de voeding.

— De variatie moet klein genoeg zijn om een exacte en correcte schatting van de toxiciteit te maken.

▼M6

Aanhangsel 4

Dieren extraheren en tellen

1. **Er kunnen twee extractiemethoden worden toegepast.**

1.a. Eerste methode: er kan een extractor met geregelde temperatuurgradiënt op basis van de principes van MacFadyen worden gebruikt (1). De warmte komt van een verwarmingselement boven op de extractiebox (en wordt geregeld met een thermoweerstand die op het oppervlak van het grondmonster is geplaatst). De temperatuur in de gekoelde vloeistof die de verzamelbak omringt, wordt geregeld met een thermoweerstand die op het oppervlak van de verzamelbox is geplaatst (onder de kern van de grond). De thermoweerstanden zijn verbonden met een programmeerbare besturingseenheid die de temperatuur verhoogt volgens een voorgeprogrammeerd schema. De dieren worden verzameld in een gekoelde verzamelbox (2 °C) met op de bodem een laag pleisterkalk-koolstof. Het extraheren begint bij 25 °C en de temperatuur wordt om de 12 uur met 5 °C verhoogd. De extractie duurt in totaal 48 uur. Na 12 uur bij 40 °C is de extractie voltooid.

1.b. Tweede methode: na de experimentele incubatieperiode wordt het aantal aanwezige juveniele springstaarten bepaald door flotatie. Met dat doel wordt de test uitgevoerd in de potjes van ongeveer 250 ml inhoud. Aan het eind van de test wordt circa 200 ml gedistilleerd water toegevoegd. De grond wordt voorzichtig geroerd met een fijn penseel om de springstaarten op het wateroppervlak te laten drijven. Er mag een kleine hoeveelheid, ca. 0,5 ml, zwarte Kentmere-foto-inkt toegevoegd worden aan het water om het tellen te vergemakkelijken door het contrast tussen het water en de witte springstaarten te vergroten. Deze kleurstof is niet giftig voor springstaarten.

2. **Tellen:**

De aantallen kunnen geteld worden met het blote oog of onder een lichtmicroscoop waarbij een raster over het drijfschaaltje geplaatst wordt of door het oppervlak van ieder schaaltje te fotograferen en later de springstaarten te tellen op vergrote afdrukken of geprojecteerde slides. Tellingen kunnen ook worden uitgevoerd met behulp van digitale beeldverwerkingstechnieken (12). Alle methoden moeten worden gevalideerd.

▼M6

Aanhangsel 5

Bepaling van het maximale WHC van de grond

De volgende methode voor het bepalen van het maximale waterhoudende vermogen (WHC) van de grond is geschikt bevonden. Deze wordt beschreven in bijlage C van ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction).

Verzamel een gedefinieerde hoeveelheid (bijv. 5 g) van het testgrondsubstraat met behulp van een geschikt instrument voor monsterneming (vijzelbuisje o.i.d.). Bedek de bodem van het buisje met een nat stuk filterpapier en plaats het vervolgens op een rek in een waterbad. Het buisje moet geleidelijk worden ondergedompeld totdat het waterpeil boven het grondoppervlak is gestegen. Daarna moet het gedurende ongeveer drie uur in het water worden gelaten. Omdat niet al het door de grondaderen geabsorbeerde water kan worden vastgehouden, moet het grondmonster gedurende twee uur kunnen uitdruipen en op een bed van zeer nat, fijn gemalen kwartszand in een afgedekt potje (ter voorkoming van uitdrogen) worden geplaatst. Het monster moet vervolgens worden gewogen en gedroogd tot een constante massa bij 105 °C. Het waterhoudende vermogen (WHC) moet als volgt worden berekend:

$$\text{WHC (in \% droge massa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Waarbij:

S = waterverzadigd substraat + massa buisje + massa filterpapier

T = tarra (massa buisje + massa filterpapier)

D = droge substraatmassa

▼M6

Aanhangsel 6

Bepaling van de pH van de grond

De volgende methode voor het bepalen van de pH-waarde van de grond is gebaseerd op de beschrijving in ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH.

Een gedefinieerde hoeveelheid grond wordt gedurende ten minste 12 uur gedroogd bij kamertemperatuur. Vervolgens wordt een suspensie van de grond (die minimaal 5 g grond bevat) gemaakt in een vijfmaal zo groot volume van hetzij een 1 M oplossing kaliumchloride (KCl) pro analysi, hetzij een 0,01 M oplossing calciumchloride ($CaCl_2$) pro analysi. De suspensie wordt daarna gedurende 5 minuten grondig geschud en vervolgens met rust gelaten gedurende ten minste 2 uur maar niet langer dan 24 uur. De pH van de vloeibare fase wordt dan gemeten met een pH-meter die voor elke meting is gekalibreerd met een geschikte reeks bufferoplossingen (bijv. pH 4,0 en 7,0).

▼M6

C.40. LEVENSLANGE TOXICITEITSTEST OP CHIRONOMIDEN IN SEDIMENT-WATERSYSTEMEN MET BEHULP VAN VERRIJKT WATER OF VERRIJKT SEDIMENT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtsnoer (TG) 233 (2010) van de OESO. Ze is opgezet om de effecten vast te stellen van levenslange blootstelling aan chemische stoffen op de zoetwatermug *Chironomus sp.*, en bestrijkt de volledige eerste generatie (P-generatie) en het vroege deel van de tweede generatie (F1-generatie). De methode is een uitbreiding op de bestaande testmethoden C.28 (1) en C.27 (15), die respectievelijk gebruikmaken van een blootstellingsscenario met verrijkt water en een blootstellingsscenario met verrijkt sediment. Voor deze methode zijn bestaande toxiciteitstestprotocollen voor *Chironomus riparius* en *Chironomus dilutus* (voorheen *C. tentans* genaamd (2)) in aanmerking genomen, die zijn ontwikkeld in Europa en Noord-Amerika (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) en later ringtests hebben ondergaan (1) (7) (10) (11) (12). Er kunnen ook andere goed gedocumenteerde chironomiden worden gebruikt, bijvoorbeeld *Chironomus yoshimatsui* (13)(14). De volledige blootstellingsduur bedraagt ca. 44 dagen voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui* en ca. 100 dagen voor *C. dilutus*.

2. Zowel het blootstellingsscenario met water als dat met sediment wordt in deze testmethode beschreven. Welk blootstellingsscenario geschikt is, hangt af van het doel van de test. Het waterblootstellingsscenario, waarbij de waterkolom wordt verrijkt, is bedoeld om een gebeurtenis na te bootsen waarbij een gespoten bestrijdingsmiddel overwaait; het scenario heeft betrekking op de initiële concentratiepiek in het oppervlaktewater. Waterverrijking is ook bruikbaar voor andersoortige blootstelling (waaronder weglekkende chemische stoffen), maar niet voor accumulatieprocessen in het sediment die langer duren dan de testperiode. In dat geval, en ook wanneer afvloeiing de voornaamste route is waarlangs bestrijdingsmiddelen in waterlichamen terechtkomen, kan een testopzet met verrijkt sediment geschikter zijn. Als andere blootstellingsscenario's van belang zijn, kan de testopzet eenvoudig worden aangepast. Als bijvoorbeeld de verdeling van de teststof tussen de waterfase en de sedimentlaag niet van belang is en adsorptie aan het sediment moet worden geminimaliseerd, kan het gebruik van een vervangend kunstmatig sediment (bijv. kwartszand) worden overwogen.

3. Stoffen die moeten worden getest op in het sediment levende organismen, kunnen gedurende langere tijd in het sediment aanwezig blijven. In het sediment levende organismen kunnen via een aantal routes worden blootgesteld. Het relatieve belang van elke blootstellingsroute en de tijd die elke route nodig heeft om bij te dragen aan het algehele toxische effect, hangen af van de fysisch-chemische eigenschappen van de stof. Voor sterk adsorberende stoffen of voor stoffen die een covalente binding met het sediment aangaan, kan ingestie van besmet voedsel een belangrijke blootstellingsroute zijn. Om de toxiciteit van zeer lipofiele stoffen niet te onderschatten, kan worden overwogen vóór aanbrenging van de teststof voedsel aan het sediment toe te voegen (zie punt 31). Het is derhalve mogelijk om alle blootstellingsroutes en alle levensstadia in de test op te nemen.

4. Gemeten eindpunten zijn het totale aantal volwassen muggen dat zich heeft ontwikkeld (zowel eerste als tweede generatie), het ontwikkelingstempo (zowel eerste als tweede generatie), de geslachtsverhouding van volledig ontwikkelde en levende volwassen muggen (zowel eerste als tweede generatie), het aantal eiersnoeren per vrouwtje (alleen eerste generatie) en de fertiliteit van de eiersnoeren (alleen eerste generatie).

5. Het gebruik van kunstmatig sediment wordt ten sterkste aanbevolen. Kunstmatig sediment heeft verschillende voordelen ten opzichte van natuurlijke sedimenten:

▼M6

— de experimentele variabiliteit wordt beperkt omdat het een reproduceerbare 'genormaliseerde matrix' vormt en er niet gezocht hoeft te worden naar niet-besmet schoon sediment;

— het testsediment kent geen seizoensveranderingen en op ieder moment kunnen tests worden gestart; het sediment hoeft niet te worden voorbehandeld om inheemse fauna te verwijderen;

— de kosten zijn lager dan voor de in het veld verzamelde hoeveelheden die toereikend zijn voor dagelijks testen;

— kunstmatig sediment maakt toxiciteitsvergelijkingen tussen verschillende onderzoeken en het dienovereenkomstig rangschikken van stoffen mogelijk (3).

6. De gebruikte definities zijn opgenomen in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

7. Larven in het eerste stadium van chironomiden worden in een sediment-watersysteem aan een concentratiebereik van de teststof blootgesteld. De test begint met het plaatsen van larven in het eerste stadium (eerste generatie) in testbekers die verrijkt sediment bevatten. De teststof kan ook aan het water worden toegevoegd na het inbrengen van de larven. De ontwikkeling van de chironomiden, de ontwikkelingstijd en de geslachtsverhouding van de volledig ontwikkelde en levende muggen worden vastgesteld. Ontwikkelde volwassen muggen worden overgebracht naar kweekkooien om te bevorderen dat ze gaan zwermen, paren en eieren leggen. Het aantal geproduceerde eiersnoeren en de fertiliteit ervan worden vastgesteld. Van deze eiersnoeren worden larven in het eerste stadium van de tweede generatie verkregen. Deze larven worden in vers gepreppareerde testbekers geplaatst (verrijkingsprocedure als voor de eerste generatie) om de levensvatbaarheid van de tweede generatie te bepalen door vaststelling van hun ontwikkeling, de ontwikkelingstijd en de geslachtsverhouding van de volledig ontwikkelde en levende muggen (een schematische weergave van de levenscyclustest wordt gepresenteerd in aanhangsel 5). Alle gegevens worden geanalyseerd, hetzij met een regressiemodel waarmee de concentratie wordt geschat die X % verlaging op het desbetreffende eindpunt zou veroorzaken, hetzij door toetsing van een hypothese om een concentratie zonder waargenomen effect (No Observed Effect Concentration of NOEC) te bepalen. In het laatste geval worden de testresponsen door middel van statistische toetsen met de geschikte controleresponsen vergeleken. Hierbij moet worden opgemerkt dat in het scenario met verrijkt water bij snel afbrekende stoffen de latere levensstadia van elke generatie (bijv. de popfase) kunnen worden blootgesteld aan een aanmerkelijk lager concentratieniveau in het bovenliggende water dan de larven in het eerste stadium. Als dit een probleem is omdat voor elk levensstadium een vergelijkbaar blootstellingsniveau nodig is, kunnen de volgende aanpassingen van de testmethode worden overwogen:

— parallelle uitvoering met verrijking in verschillende levensstadia, of

— herhaalde verrijking (of verversing van het bovenliggende water) van het testsysteem in beide testfasen (eerste en tweede generatie), waarbij de tijd tussen de verrijkingen (verversingen) moet worden afgestemd op de lotskenmerken van de teststof.

Dergelijke aanpassingen zijn alleen haalbaar in het scenario met verrijkt water, niet in het scenario met verrijkt sediment.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

8. De oplosbaarheid in water van de teststof, de dampspanning en log K_{ow} ervan, de gemeten of berekende verdeling in sediment en de stabiliteit in water en sediment moeten bekend zijn. Er moet een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de teststof in

▼M6

bovenliggend water, poriewater en sediment. Andere nuttige informatie zijn de structuurformule en de zuiverheid van de teststof. Het uiteindelijke chemische lot van de teststof (bijv. dissipatie, niet-biologische en biologische afbraak enz.) is eveneens nuttige informatie. Nadere richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat de uitvoering van de test problematisch is, zijn in (16) opgenomen.

REFERENTIESTOFFEN

9. Er kunnen regelmatig tests met referentiestoffen worden uitgevoerd om te waarborgen dat de gevoeligheid van de laboratoriumpopulatie niet is veranderd. Net als bij daphnia zou het voldoende zijn om een 48-uurs test op acute toxiciteit (volgens 17) uit te voeren. Zolang er echter geen gevalideerde richtsnoeren voor een acute toxiciteitstest beschikbaar zijn, kan een chronische toxiciteitstest overeenkomstig hoofdstuk C.28 van deze bijlage worden overwogen. Voorbeelden van met succes in ringtests en validatiestudies toegepaste giftige referentiestoffen zijn lindaan, trifluralin, pentachloorfenol, cadmiumchloride en kaliumchloride (1) (3) (6) (7) (18).

GELDIGHEID VAN DE TEST

10. De test is alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden is voldaan:

— de gemiddelde ontwikkeling in de controlegroep moet aan het eind van de blootstellingstermijn ten minste 70 % zijn voor beide generaties (1) (7);

— voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui* moet 85 % van het totale aantal ontwikkelde volwassen muggen uit de controlegroep van beide generaties aangetroffen worden tussen 12 en 23 dagen na introductie van de larven in het eerste stadium in de bekers; voor *C. dilutus* is een periode van 20 tot 65 dagen aanvaardbaar;

— de gemiddelde geslachtsverhouding van volledig ontwikkelde en levende volwassen muggen (mannetjes vs. vrouwtjes) moet in de controlegroep van beide generaties minimaal 0,4 en maximaal 0,6 zijn;

— voor elke kweekkooi moet het aantal eiersnoeren in de controlegroepen van de eerste generatie ten minste 0,6 per in de kweekkooi geïntroduceerd vrouwtje bedragen;

— het aandeel vruchtbare eiersnoeren per kweekkooi van de controlegroepen van de eerste generatie moet minimaal 0,6 zijn;

— aan het eind van de blootstellingstermijn voor beide generaties worden de pH en het gehalte aan opgeloste zuurstof in elke beker gemeten. Het zuurstofgehalte moet ten minste 60 % bedragen van de verzadigingswaarde van lucht (ASV [1]) en het bovenliggende water moet in alle testbekers een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben;

— de watertemperatuur mag niet meer dan ± 1,0 °C verschillen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Monsterpotjes en kweekkooien

11. De larven worden aan de teststof blootgesteld in glasbekers van 600 ml met een diameter van circa 8,5 cm (zie aanhangsel 5). Ook andere houders kunnen geschikt zijn, mits zij voldoende diep zijn voor het bovenliggende water en het sediment. Het sedimentoppervlak moet ten minste 2 tot 3 cm^2 per larve bedragen. De verhouding tussen de dikte van de sedimentlaag en de diepte van het bovenliggende water moet circa 1:4

[1] Bij 20 °C en normale luchtdruk bedraagt de ASV in zoet water 9,1 mg/l (60 % is 5,46 mg/l).

▼M6

zijn. Er moeten kweekkooien (van minimaal 30 cm in alle drie dimensies) worden gebruikt met gaas (maaswijdte circa 1 mm) aan de bovenkant en minimaal één zijkant van de kooi (zie aanhangsel 5). In elke kooi wordt een kristalliseerschaal van 2 l met testwater en sediment geplaatst voor de eitjes. Ook bij de kristalliseerschaal moet de verhouding tussen de dikte van de sedimentlaag en de diepte van het bovenliggende water circa 1:4 zijn. Nadat de eiersnoeren zijn verzameld van de kristalliseerschaal, worden ze in een microtiterplaat met 12 gaten geplaatst (één snoer per gat dat ten minste 2,5 ml water uit de verrijkte kristalliseerschaal bevat), waarna de plaat wordt afgedekt met een deksel om verdamping te voorkomen. Er kunnen ook andere geschikte houders voor het bewaren van de eiersnoeren worden gebruikt. Uitgezonderd de microtiterplaten moeten alle testbekers en andere apparaten die in contact komen met het testsysteem, volledig gemaakt zijn van glas of een ander chemisch inert materiaal (bijv. polytetrafluorethyleen).

Keuze van de soorten

12. Als testsoort heeft *Chironomus riparius* de voorkeur. *C. yoshimatsui* mag ook worden gebruikt. *C. dilutus* is ook geschikt maar is lastiger in het gebruik en vergt een langere testperiode. Aanhangsel 2 bevat bijzonderheden over de kweekmethoden van *C. riparius*. Er is ook informatie beschikbaar over de kweekomstandigheden van andere soorten, namelijk *C. dilutus* (5) en *C. yoshimatsui* (14). Vóór de test moet de identificatie van de soorten worden bevestigd; als de organismen uit eigen kweek afkomstig zijn, is geen bevestiging voorafgaand aan iedere test nodig.

Sediment

13. Er wordt bij voorkeur kunstmatig sediment gebruikt (ook wel bereid, gereconstitueerd of synthetisch sediment genoemd). Als echter natuurlijk sediment wordt gebruikt, moet dit worden gekarakteriseerd (ten minste pH en gehalte aan organische koolstof; bepaling van parameters als C/N-verhouding en korrelgrootteverdeling worden eveneens aanbevolen) en moet het vrij zijn van verontreinigingen en andere organismen die de larven van chironomiden zouden kunnen beconcurreren of opeten. Het verdient ook aanbeveling sedimenten voorafgaand aan de test zeven dagen onder testomstandigheden te conditioneren. Het volgende kunstmatige sediment, beschreven in (1), wordt aanbevolen (1) (20) (21):

a. 4-5 % (drooggewicht) turf: zo dicht mogelijk bij pH-waarde 5,5 tot 6,0. Het is belangrijk uitsluitend fijngemalen turf in poedervorm te gebruiken (partikelgrootte ≤ 1 mm) die uitsluitend aan de lucht gedroogd is;

b. 20 % (drooggewicht) kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

c. 75-76 % (drooggewicht) kwartszand (fijn zand moet overheersen; meer dan 50 procent van de partikels moet tussen de 50 en 200 µm groot zijn);

d. gedeïoniseerd water wordt toegevoegd om het vochtgehalte van het definitieve mengsel op 30-50 % te brengen;

e. Chemisch zuiver calciumcarbonaat ($CaCO_3$) wordt toegevoegd om de pH-waarde van het definitieve mengsel van het sediment op 7,0 ± 0,5 te brengen;

f. Het gehalte aan organische koolstof van het definitieve mengsel moet 2 % (± 0,5 %) bedragen. Dit kan worden gecorrigeerd met de juiste hoeveelheden turf en zand, overeenkomstig (a) en (c).

14. De bron van de turf, de kaolienklei en het zand moet bekend zijn. De bestanddelen van het sediment moeten worden gecontroleerd op verontreiniging met chemische stoffen (bijv. zware metalen, organische chloor-

▼M6

en fosforverbindingen). In aanhangsel 3 wordt een voorbeeld gegeven van de bereiding van kunstmatig sediment. Menging van droge bestanddelen is ook aanvaardbaar, mits wordt aangetoond dat na toevoeging van het bovenliggende water geen scheiding van de bestanddelen van het sediment plaatsvindt (bijv. door drijvende turfdeeltjes) en dat de turf of het sediment voldoende geconditioneerd is.

Water

15. Elk water dat aan de in de aanhangsels 2 en 4 vermelde chemische eigenschappen van aanvaardbaar verdunningswater voldoet, is geschikt als testwater. Als kweek- en testwater is elk geschikt water, natuurlijk water (oppervlakte- of grondwater), synthetisch water (zie aanhangsel 2) of ontchloord kraanwater aanvaardbaar, mits de chironomiden daarin gedurende het kweken en testen overleven zonder tekenen van stress te vertonen. Aan het begin van de test moet het testwater een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben en mag de totale hardheid, uitgedrukt als $CaCO_3$, niet hoger zijn dan 400 mg/l. Als er echter een wisselwerking vermoed wordt tussen de hardheidsionen en de geteste chemische stof, verdient zachter water de voorkeur (Elendt Medium M4 is bijgevolg niet geschikt in deze situatie). Voor de gehele studie moet één soort water worden gebruikt. De in aanhangsel 4 vermelde kwaliteitskenmerken voor water moeten ten minste twee keer per jaar worden gemeten, of wanneer vermoed wordt dat er een significante verandering heeft plaatsgevonden.

Stamoplossingen — verrijkt water

16. a. De testconcentraties worden berekend op basis van de concentraties in de waterkolom, d.w.z. het boven het sediment liggende water. Testoplossingen van de gekozen concentraties worden gewoonlijk bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossingen worden bij voorkeur bereid door oplossing van de teststof in het testwater. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen kan in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van geschikte oplosmiddelen zijn aceton, ethyleenglycolmonoëthylether, ethyleenglycoldimethylether, dimethylformamide en triëthyleenglycol. Als dispergeermiddelen mogen Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40 worden gebruikt. De concentratie oplosmiddel in de laatste testfase moet minimaal (bijv. $\leq$ 0,1 ml/l) zijn en moet hetzelfde zijn voor alle behandelingen. Wanneer een solubilisator wordt gebruikt, mag deze geen significante effecten hebben op het overleven. Dit moet blijken uit een controle met oplosmiddel in vergelijking met een negatieve (water)controle. Het gebruik van deze stoffen moet echter zo veel mogelijk worden vermeden.

Stamoplossingen — verrijkt sediment

16. b. Verrijkte sedimenten worden gewoonlijk in de gekozen concentratie bereid door rechtstreeks een oplossing van de teststof aan het sediment toe te voegen. Een stamoplossing van de in gedeïoniseerd water opgeloste teststof wordt met het kunstmatige sediment gemengd met behulp van een wals of een voedermixer of door handmatig mengen. Indien de teststof slecht in water oplosbaar is, kan deze worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bijv. hexaan, aceton of chloroform). Deze oplossing wordt vervolgens gemengd met

▼M6

10 g fijn kwartszand per testbeker. Het oplosmiddel mag verdampen en dient volledig uit het zand te worden verwijderd. Vervolgens wordt het zand gemengd met een geschikte hoeveelheid sediment. Voor het oplossen, dispergeren of emulgeren van de teststof mogen alleen gemakkelijk verdampende oplosmiddelen worden gebruikt. Bij de bereiding van het sediment moet rekening worden gehouden met het zand dat in het mengsel van teststof en zand aanwezig is (het sediment wordt dus met minder zand bereid). De aan het sediment toegevoegde teststof moet zorgvuldig en gelijkmatig over het sediment worden verdeeld. Zo nodig kunnen deelmonsters worden geanalyseerd om de homogeniteit te bepalen.

TESTOPZET

17. De testopzet heeft betrekking op het aantal testconcentraties en het interval ertussen, het aantal vaten per concentratieniveau, het aantal larven per vat, het aantal kristalliseerschalen en kweekkooien. Opzetten voor EC_x, NOEC en een limiettest worden hieronder beschreven.

Opzet voor regressieanalyse

18. De effectconcentratie (EC_x) en het concentratiebereik waarbinnen het effect van de teststof van belang is, moeten begrepen zijn onder de test, zodanig dat het eindpunt niet buiten de grenzen van de gegenereerde gegevens wordt geëxtrapoleerd. Extrapolaties ver onder de laagste of boven de hoogste concentraties moeten worden vermeden. Een voorafgaande test om het meetgebied vast te stellen volgens testmethoden C.27 of C.28 kan nuttig zijn voor het selecteren van een geschikt bereik van testconcentraties.

19. Voor een EC_x-benadering zijn minstens vijf concentraties en acht duplo's voor elke concentratie vereist. Voor elke concentratie moeten twee kweekkooien (A en B) worden gebruikt. De acht duplo's worden verdeeld in twee groepen van vier duplo's voor elke kweekkooi. Deze samenvoeging van duplo's is noodzakelijk vanwege het aantal muggen dat nodig is voor deugdelijke beoordelingen van de voortplanting. De tweede generatie heeft echter weer acht duplo's, die geïnitieerd worden vanuit de blootgestelde populaties in de kweekkooien. Het verschil tussen de concentraties mag niet meer dan factor 2 bedragen (als de dosis-responscurve een geringe helling vertoont, kan hiervan worden afgeweken). Het aantal duplo's voor elke testgroep kan worden verlaagd naar zes (drie voor elke kweekkooi) wanneer het aantal testconcentraties met een verschillende respons wordt verhoogd. Als het aantal duplo's wordt verhoogd of de intervallen tussen de testconcentraties worden verkleind, worden de betrouwbaarheidsintervallen rond de EC_X gewoonlijk kleiner.

Opzet voor de schatting van een NOEC

20. Voor een NOEC-benadering moeten vijf testconcentraties met ten minste acht duplo's (4 voor elke kweekkooi A en B) worden gebruikt en mag het verschil tussen de concentraties niet meer dan factor 2 bedragen. Het aantal duplo's moet toereikend zijn om voldoende onderscheidend vermogen te waarborgen om een verschil van 20 % met de controlegroep te kunnen vaststellen bij een significantieniveau van 5 % ($\alpha = 0{,}05$). Voor het ontwikkelingstempo, de fecunditeit en vruchtbaarheid is doorgaans een variantieanalyse (ANOVA) geschikt, gevolgd door de Dunnett-toets of Williams-toets (22-25). Voor het uitkomstquotiënt en de geslachtsverhouding kan de toets van Cochran-Armitage, de exacte toets van Fisher (met correctie van Bonferroni) of de toets van Mantel-Haenszel geschikt zijn.

Limiettest

21. Als in de facultatieve voorafgaande test om het meetgebied vast te stellen geen effecten worden waargenomen, kan een limiettest worden uitgevoerd (één testconcentratie en controlegroep(en)). De limiettest dient om aanwijzingen te verzamelen dat de toxische effecten van de teststof groter zijn dan de geteste limietconcentratie. Voor water wordt 100 mg/l aanbevolen en voor sediment 1 000 mg/kg (drooggewicht). Gewoonlijk zijn

▼M6

ten minste acht duplo's voor zowel de testgroep als de controlegroep nodig. Aangetoond moet worden dat het onderscheidend vermogen groot genoeg is om een verschil van 20 % met de controlegroep te kunnen vaststellen bij een significantieniveau van 5 % (α = 0,05). Voor de meetresponsen (bijv. ontwikkelingstempo) is de T-toets een geschikte statistische methode, indien de gegevens aan de voorwaarden van deze test voldoen (normale verdeling, homogene variantie). Als niet aan die voorwaarden wordt voldaan, kan een T-toets voor ongelijke variantie of een niet-parametrische toets, zoals de Wilcoxon-Mann-Whitney-toets, worden gebruikt. Voor het uitkomstquotiënt is de exacte toets van Fisher geschikt.

PROCEDURE

Blootstellingsomstandigheden

Bereiding van het water-sedimentsysteem (verrijking [„spiking"] van water)

22. a. Kunstmatig sediment (zie punten 13-14 en aanhangsel 3) wordt aan elke testvat en elke kristalliseerschaal toegevoegd om een laag te vormen van ten minste 1,5 cm (voor de kristalliseerschaal kan dit wat lager zijn), maar maximaal 3 cm. Water (zie punt 15) wordt toegevoegd zodat de verhouding van de diepte van de sedimentlaag en de diepte van het water niet groter is dan 1:4. Na de bereiding van de testvaten moet het sediment-watersysteem ongeveer zeven dagen voorzichtig belucht worden alvorens de larven in het eerste stadium van de eerste of tweede generatie toe te voegen (zie punt 14 en aanhangsel 3). Het sediment-watersysteem van de kristalliseerschalen wordt tijdens de test niet belucht, aangezien hierop geen larven hoeven te overleven (vóór het uitkomen worden de eistrengen al verzameld). Om te voorkomen dat tijdens de toevoeging van testwater aan de waterkolom bestanddelen zich van het sediment afscheiden en fijn materiaal in resuspensie wordt gebracht, kan het sediment tijdens het gieten worden afgedekt met een kunststof schijf. De schijf wordt onmiddellijk daarna verwijderd. Ook andere middelen kunnen geschikt zijn.

Bereiding van het water-sedimentsysteem (verrijkt sediment)

22. b. De verrijkte sedimenten die volgens punt 16b bereid zijn, worden in de vaten en kristalliseerschaal geplaatst en er wordt bovenstaand water toegevoegd om een volumeverhouding tussen sediment en water van 1:4 te bereiken. De diepte van de sedimentlaag moet in het bereik van 1,5 tot 3 cm liggen (voor de kristalliseerschaal mag dit wat lager zijn). Om te voorkomen dat tijdens de toevoeging van testwater aan de waterkolom bestanddelen zich van het sediment afscheiden en fijn materiaal in resuspensie wordt gebracht, kan het sediment tijdens het gieten worden afgedekt met een kunststof schijf, die onmiddellijk daarna wordt verwijderd. Ook andere middelen kunnen geschikt zijn. Nadat het verrijkte sediment met bovenstaand water is voorbereid, is het wenselijk een verdeling van de teststof te doen plaatsvinden vanuit het sediment naar de waterfase (4) (5) (7) (18). Dit moet bij voorkeur gebeuren onder de in de test heersende temperatuur- en beluchtingsomstandigheden. De tijd die nodig is voor equilibratie hangt af van het sediment en de stof en kan variëren van enkele uren tot verscheidene dagen en soms vijf weken. Aangezien veel stoffen ondertussen zouden kunnen afbreken, wordt niet gewacht tot een evenwicht is ontstaan, maar wordt een equilibratieperiode van 48 uur aanbevolen. Wanneer bekend is dat de afbraakhalfwaardetijd van de stof in sediment lang is (zie punt 8), kan de equilibratietijd verlengd worden. Aan het eind van deze extra equilibratieperiode wordt in het bovenstaande water, het poriënwater en het sediment, bij ten minste de hoogste en een lagere concentratie, de concentratie van de teststof gemeten (zie punt 38). Door deze analysen van de teststof kan de massabalans worden berekend en kunnen de resultaten op basis van gemeten concentraties worden weergegeven.

23. De testvaten worden (bijvoorbeeld met glasplaten) afgedekt. Om verdampingsverliezen te compenseren, kan het waterniveau tijdens de studie worden aangevuld tot het oorspronkelijke volume. Om zoutophoping te voorkomen, moet hiervoor gedestilleerd of gedeïoniseerd water worden

▼M6

gebruikt. Kristalliseerschalen in de kweekkooien worden niet afgedekt en kunnen, maar hoeven niet bijgevuld worden om te compenseren voor waterverlies tijdens de testperiode, omdat de eistrengen maar één dag in contact zijn met het water en de schalen alleen in een korte fase van de test worden gebruikt.

Toevoeging van testorganismen

24. Vier tot vijf dagen voordat de larven in het eerste stadium voor de eerste generatie in de testvaten worden ingebracht, worden eipakketten uit de kweek genomen en in kleine vaten in een kweekmedium geplaatst. Er kan ouder medium uit de stamcultuur of vers bereid medium worden gebruikt. In ieder geval wordt aan het kweekmedium een kleine hoeveelheid voedsel, zoals enkele druppels filtraat uit een fijngemalen suspensie van vissenvoervlokken, toegevoegd (zie aanhangsel 2). Er worden alleen vers afgezette eipakketten gebruikt. Normaliter komen de larven enkele dagen nadat de eieren gelegd zijn uit (2 tot 3 dagen voor *C. riparius* bij 20 °C en 1 tot 4 dagen voor *C. dilutus* bij 23 °C en *C. yoshimatsui* bij 25 °C) en vindt de groei van de larven in vier stadia van elk 4-8 dagen plaats. Voor de test worden larven in het eerste stadium (maximaal 48 uur na uitkomen) gebruikt. Het stadium van de larven kan mogelijk worden gecontroleerd aan de hand van de breedte van het epicranium (7).

25. Twintig larven in het eerste stadium voor de eerste generatie worden met een stompe pipet willekeurig verdeeld over elke testvat die het sediment-watersysteem bevat. Tijdens het inbrengen van de larven in de testvaten en de eerste 24 uur daarna wordt de beluchting van het water uitgezet (zie punt 32). Volgens de gebruikte testopzet (zie punten 19 en 20) is het aantal gebruikte larven per concentratie ten minste 120 (6 duplo's per concentratie) voor de EC_X-benadering en 160 voor de NOEC-benadering (8 duplo's per concentratie). In de opzet met verrijkt sediment begint de blootstelling met het inbrengen van de larven.

Verrijken van het bovenstaande water

26. Vierentwintig uur na het inbrengen van de larven in het eerste stadium voor de eerste generatie wordt de teststof aan de bovenstaande waterkolom toegevoegd en wordt er weer voorzichtig belucht (zie punt 7 voor mogelijke wijzigingen van de testopzet). Onder het wateroppervlak worden met een pipet kleine hoeveelheden van de stamoplossing van de teststof ingebracht. Vervolgens wordt het bovenstaande water voorzichtig gemengd, zonder het sediment te verstoren. In de opzet met verrijkt water begint de blootstelling met het verrijken van het water (d.w.z. één dag na inbrengen van de larven).

Verzamelen van uitgekomen volwassen muggen

27. Uitgekomen muggen van de eerste generatie worden ten minste één keer, maar bij voorkeur twee keer per dag verzameld (zie punt 36) uit de testvaten met behulp van een zuigapparaat of soortgelijk hulpmiddel (zie aanhangsel 5). Dit dient voorzichtig te gebeuren om de volwassen muggen niet te beschadigen. De verzamelde muggen uit vier testvaten binnen één behandeling worden vrijgelaten in een kweekkooi waaraan zij eerder werden toegewezen. Op de dag van het eerste uitkomen (van mannetjes) worden de kristalliseerschalen verrijkt door een klein volume van de stamoplossing van de teststof onder het wateroppervlak te pipetteren (opzet met verrijkt water). Vervolgens wordt het bovenstaande water voorzichtig gemengd, zonder het sediment te verstoren. De nominale teststofconcentratie in de kristalliseerschaal is dezelfde als in de testvaten die aan de betreffende kweekkooi zijn toegewezen. Voor de opzet met verrijkt

▼M6

sediment worden de kristalliseerschalen rond dag 11 na het begin van de blootstelling (d.w.z. het inbrengen van de eerste generatie larven) voorbereid, zodat ze ongeveer 48 uur kunnen equilibreren voordat de eerste eistrengen worden geproduceerd.

28. Eistrengen worden met behulp van een pincet of een stompe pipet uit de kristalliseerschaal in de kweekkooi verzameld. Elke eistreng wordt geplaatst in een vat met kweekmedium uit de kristalliseerschaal waaruit hij verzameld was (bijv. een well van een 12-wells-microtiterplaat, samen met ten minste 2,5 ml medium). De vaten met de eistrengen worden met een deksel afgedekt om aanzienlijke verdamping te voorkomen. Eistrengen worden gedurende ten minste zes dagen nadat ze gelegd zijn ter observatie bewaard zodat ze als vruchtbaar of onvruchtbaar kunnen worden ingedeeld.

Voor het beginnen van de tweede generatie worden ten minste drie, maar bij voorkeur zes vruchtbare eistrengen uit elke kweekkooi geselecteerd en laat men ze met wat voedsel uitkomen. Deze eistrengen moeten geproduceerd zijn in de piek van het eitjes leggen, die in de controles normaliter rond testdag 19 ligt. In het ideale geval wordt op dezelfde dag begonnen met de tweede generatie van alle bewerkingen, maar dit is vanwege effecten van de stof op de ontwikkeling van de larven wellicht niet altijd mogelijk. In zo'n geval is het mogelijk om met de hogere concentraties later te beginnen dan met de lagere bewerkingen en de (oplosmiddel)controle.

29. a. In de opzet met verrijkt water wordt het sediment-watersysteem voor de tweede generatie bereid door de teststof ca. 1 uur vóór het in de testvaten inbrengen van de larven in het eerste stadium aan de bovenstaande waterkolom toe te voegen. Onder het wateroppervlak worden met een pipet kleine hoeveelheden van de teststofoplossingen ingebracht. Vervolgens wordt het bovenstaande water voorzichtig gemengd, zonder het sediment te verstoren. Na het verrijken wordt voorzichtig belucht.

29. b. In de opzet met verrijkt sediment worden de blootstellingsvaten die het sediment-watersysteem voor de tweede generatie bevatten, op dezelfde manier als voor de eerste generatie voorbereid.

30. Twintig larven in het eerste stadium (maximaal 48 u na uitkomen) van de tweede generatie worden met een stompe pipet willekeurig verdeeld over de testvaten met het verrijkte sediment-watersysteem. Tijdens het in de testvaten inbrengen van de larven in het eerste stadium en de eerste 24 uur daarna wordt de beluchting van het water uitgezet. Volgens de gebruikte testopzet (zie punten 19 en 20) is het aantal gebruikte larven per concentratie ten minste 120 (6 duplo's per concentratie) voor de EC_X-benadering en 160 voor de NOEC-benadering (8 duplo's per concentratie).

Voedsel

31. De larven in de testvaten moeten bij voorkeur dagelijks of ten minste drie keer per week worden gevoerd. Voor jonge larven lijkt in de eerste 10 dagen van de ontwikkeling 0,25-0,5 mg vissenvoer (een suspensie in water of fijngemalen voedsel, bijv. Tetra-Min of Tetra-Phyll; zie details in aanhangsel 2) per larve per dag voldoende te zijn (0,35-0,5 mg voor C. yoshimatsui). Oudere larven kunnen iets meer voedsel nodig hebben: 0,5 – 1,0 mg per larve per dag zou voor de rest van de test voldoende moeten zijn. Als schimmelgroei wordt waargenomen of sterfte in de controlegroepen wordt geconstateerd, moet het voedselrantsoen in alle test- en controlegroepen worden verlaagd. Als de schimmelontwikkeling niet kan worden gestopt, moet de test worden herhaald.

De toxicologische relevantie van blootstelling via inslikken is in het algemeen hoger bij stoffen met een sterke affiniteit tot organische koolstof of

▼M6

stoffen die covalent aan het sediment binden. Bij het testen van stoffen met dergelijke eigenschappen kan de benodigde hoeveelheid voedsel voor de overleving en natuurlijke groei van de larven daarom vóór de stabilisatieperiode worden toegevoegd aan het kunstmatige sediment, afhankelijk van de wettelijke eis. Om verslechtering van de waterkwaliteit te voorkomen moet in plaats van visvoer plantaardig materiaal worden gebruikt, bijv. 0,5 % (drooggewicht) fijngemalen bladeren van brandnetel (*Urtica dioica*), witte moerbei (*Morus alba*), witte klaver (*Trifolium repens*), spinazie (*Spinacia oleracea*) of ander plantaardig materiaal (*Cerophyl* of α-cellulose). Toevoeging van het volledige rantsoen van een organische voedingsbron aan het sediment voorafgaand aan de verrijking is niet triviaal met het oog op de waterkwaliteit en biologische prestaties (21), noch een gestandaardiseerde methode, maar recente studies geven aan dat deze methode werkt (19) (26). Volwassen muggen in de kweekkooi hebben normaliter geen voer nodig, maar de fecunditeit en vruchtbaarheid worden verbeterd wanneer een in verzadigde sucroseoplossing gedrenkt wattenschijfje als voedingsbron voor uitgekomen volwassen muggen wordt aangeboden (34).

Incubatieomstandigheden

32. In het bovenstaande water in de testvaten wordt 24 uur na toevoeging van de larven in het eerste stadium voorzichtige beluchting toegepast en gedurende de test voortgezet (waarbij erop moet worden gelet dat het gehalte aan opgeloste zuurstof niet lager wordt dan 60 % van de verzadigingswaarde van lucht (air saturation value — ASV). De beluchting vindt plaats via een glazen pasteurpipet waarvan de opening 2-3 cm boven de sedimentlaag wordt vastgezet en die enkele luchtbellen/sec afgeeft. Bij het testen van vluchtige stoffen moet worden opgelet dat het sediment-watersysteem niet wordt belucht terwijl tegelijkertijd aan het validiteitscriterium van minimaal 60 % van de ASV (punt 10) dient te worden voldaan. Nadere richtsnoeren zijn opgenomen in (16).

33. De test met *C. riparius* wordt uitgevoerd bij een constante temperatuur van 20 °C (± 2 °C). Voor *C. dilutus* en *C. yoshimatsui* bedraagt de aanbevolen temperatuur respectievelijk 23 °C en 25 °C (± 2 °C). Er wordt een fotoperiode van 16 h gebruikt bij een lichtintensiteit van 500 tot 1 000 lux. Voor de kweekkooien kan een extra eenurige fase van ochtend- en avondschemering worden opgenomen.

Blootstellingsduur

34. Opzet met verrijkt water: De blootstellingsperiode van de eerste generatie begint wanneer de teststof in het bovenstaande water van de testvaten wordt gebracht (één dag na inbrengen van de larven — zie punt 7 voor mogelijke wijzigingen van de blootstellingsopzet). Blootstelling van de tweede larvegeneratie begint onmiddellijk, aangezien zij worden ingebracht in een sediment-watersysteem dat reeds verrijkt is. De maximale blootstellingsduur is voor de eerste generatie 27 dagen en voor de tweede generatie 28 dagen (de eerste generatie larven brengt één dag in de vaten door zonder blootstelling) voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui*. Met inachtneming van de overlap is de duur van de volledige test ongeveer 44 dagen. Voor *C. dilutus* is de maximale blootstellingsduur respectievelijk 64 en 65 dagen voor de eerste en tweede generatie. De totale duur is ongeveer 100 dagen.

Opzet met verrijkt sediment: de blootstelling begint met het inbrengen van de larven en duurt maximaal 28 dagen voor beide generaties voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui*, en maximaal 65 dagen voor beide generaties voor *C. dilutus*.

Waarnemingen

Uitkomst van muggen

35. De ontwikkelingstijd en het totale aantal volledig uitgekomen en levende mannelijke en vrouwelijke muggen worden voor beide generaties bepaald. Mannetjes zijn gemakkelijk te herkennen aan hun veerachtige antennes en dunne postuur.

▼M6

36. De testvaten van beide generaties worden ten minste drie keer per week geobserveerd om een visuele beoordeling van eventueel afwijkend gedrag van de larven te verrichten (bijv. verlating van het sediment, ongewoon zwemgedrag), waarbij met de controlegroep wordt vergeleken. Tijdens de periode van het uitkomen, die ongeveer 12 dagen na het inbrengen van de larven begint voor *C. riparius* en *C. yoshimatsui* (na 20 dagen voor *C. dilutus*), worden uitgekomen muggen ten minste één keer, maar bij voorkeur twee keer per dag ('s ochtends vroeg en laat in de middag) geteld en gesekst. Na identificatie worden de muggen van de eerste generatie voorzichtig verwijderd uit de vaten en overgebracht in een kweekkooi. Muggen van de tweede generatie worden verwijderd en na identificatie gedood. Eventuele eistrengen die in de testvaten van de eerste generatie zijn afgezet, moeten individueel worden verzameld en met ten minste 2,5 ml natief water worden overgebracht in 12-wells-microtiterplaten (of andere geschikte vaten) die met een deksel worden afgedekt om aanzienlijke verdamping te voorkomen. Ook worden het aantal dode larven en zichtbare poppen die niet zijn uitgekomen geregistreerd. Voorbeelden van een kweekkooi, testvat en zuigapparaat worden in aanhangsel 5 gegeven.

Voortplanting

37. Effecten op de voortplanting worden beoordeeld aan de hand van het aantal eistrengen dat door de eerste generatie muggen is geproduceerd en de vruchtbaarheid van deze eistrengen. Eens per dag worden de eistrengen verzameld uit de kristalliseerschaal die in elk kweekvat is geplaatst. De eistrengen worden verzameld en met ten minste 2,5 ml natief water overgebracht in een 12-wells-microtiterplaat (één eistreng in elke well) of andere geschikte vaten, die met een deksel afgedekt worden om aanzienlijke verdamping te voorkomen. De volgende kenmerken worden voor elke eistreng geregistreerd: dag van productie, formaat (normaal, d.w.z. 1,0 ± 0,3 cm, of klein, doorgaans ≤ 0,5 cm), en structuur (normaal = banaanvormig met spiraalvormige eistreng of abnormaal, bijv. niet-spiraalvormige eistreng) en vruchtbaarheid (vruchtbaar of onvruchtbaar). In de loop van zes dagen na de productie wordt de vruchtbaarheid van een eistreng beoordeeld. Een eistreng wordt als vruchtbaar beschouwd wanneer ten minste een derde van de eitjes uitkomt. Het totaal aantal vrouwtjes dat in de kweekkooi wordt gebracht, wordt gebruikt om het aantal eistrengen per vrouwtje en het aantal vruchtbare eistrengen per vrouwtje te berekenen. Indien vereist kan het aantal eitjes in een eistreng niet-destructief worden geschat volgens de ringtellingsmethode (uitvoerig beschreven onder punten 32 en 33).

Analytische bepalingen

Concentratie van de teststof

38. Er moeten ten minste bij de hoogste en een lagere concentratie monsters van het bovenstaande water, het poriënwater en het sediment worden geanalyseerd bij het begin van de blootstelling (in het geval van waterverrijking bij voorkeur een uur na aanbrenging van de teststof) en aan het einde van de test. Dit geldt voor vaten van beide generaties. Van de kristalliseerschalen in de kweekkooi wordt alleen het bovenstaande water geanalyseerd, aangezien de eistrengen hiermee in contact komen (voor de opzet met verrijkt sediment kan een analytische bevestiging van de sedimentconcentratie worden overwogen). Er kunnen tijdens de test verdere metingen van sediment, poriënwater of bovenstaand water worden uitgevoerd indien dit noodzakelijk wordt geacht. Deze bepalingen van de teststofconcentratie leveren informatie op over het gedrag en de verdeling van de teststof in het water-sedimentsysteem. Bij bemonstering van sediment en poriënwater aan het begin van en tijdens de test (zie punt 39) zijn aanvullende testvaten nodig om analytische bepalingen te verrichten. Metingen in het sediment in de opzet met verrijkt water zijn mogelijk niet

▼M6

noodzakelijk als in een water/sedimentstudie onder vergelijkbare omstandigheden (bijv. verhouding sediment/water, soort toepassing, gehalte organische koolstof van het sediment) de verdeling van de teststof tussen het water en het sediment duidelijk is bepaald, of als blijkt dat de gemeten concentraties in het bovenstaande water binnen 80 tot 120 % van de nominale of gemeten aanvankelijke concentraties blijven.

39. Wanneer tussenliggende metingen worden verricht (bijv. op dag 7 en/of 14) en voor de analyse grotere monsters nodig zijn die niet uit de testvaten kunnen worden genomen zonder het testsysteem te beïnvloeden, worden analytische bepalingen verricht op monsters uit aanvullende testvaten die op dezelfde wijze zijn behandeld (inclusief toevoeging van testorganismen), maar niet voor biologische waarnemingen zijn gebruikt.

40. Om het interstitiële water (poriënwater) te isoleren, wordt aanbevolen te centrifugeren, bijvoorbeeld 30 min bij 10 000 g en een temperatuur van 4 °C. Filtratie kan echter ook aanvaardbaar zijn, mits aangetoond is dat de teststof niet aan filters adsorbeert. In sommige gevallen kan analyse van de concentraties in het poriënwater onmogelijk zijn doordat het monster te klein is.

Fysisch-chemische eigenschappen

41. De pH, het gehalte aan opgeloste zuurstof in het testwater en de temperatuur van het water in de testvaten en de kristalliseerschalen moeten op een geschikte wijze worden gemeten (zie punt 10). De hardheid en het ammoniumgehalte moeten bij het begin en het eind van de test in de controlevaten en in één testvat en kristalliseerschaal worden gemeten bij de hoogste concentratie.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Bewerking van de resultaten

42. Het doel van deze levenscyclustest is het bepalen van het effect van de teststof op de voortplanting en, voor twee generaties, het ontwikkelingstempo en het totaal aantal volledig uitgekomen en levende mannelijke en vrouwelijke muggen. Voor het uitkomstquotiënt moeten de gegevens van mannetjes en vrouwtjes worden samengevoegd. Als zich geen statistisch significante verschillen voordoen in gevoeligheid in het ontwikkelingstempo tussen de seksen, kunnen de resultaten voor mannetjes en vrouwtjes worden samengevoegd voor statistische analyse.

43. Effectconcentraties, uitgedrukt als concentraties in het bovenstaande water (voor verrijkt water) of in het sediment (voor verrijkt sediment) worden doorgaans berekend aan de hand van de bij het begin van de blootstelling gemeten concentraties (zie punt 38). Daarom worden de concentraties voor verrijkt water doorgaans gemeten aan het begin van de blootstelling in het bovenstaande water van de vaten voor beide generaties en worden die van de kristalliseerschalen voor elke behandeling gemiddeld. Voor verrijkt sediment worden de concentraties die doorgaans aan het begin van de blootstelling worden gemeten in de vaten voor beide generaties (en eventueel die van de kristalliseerschalen) voor elke behandeling gemiddeld.

44. Om een puntschatting te berekenen, d.w.z. een EC_x, kunnen de statistieken per vat en per kweekkooi worden gebruikt als echte duplo's. Bij de berekening van een betrouwbaarheidsinterval voor elke EC_x moet rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen vaten, tenzij wordt aangetoond dat deze verwaarloosbaar klein is. Wanneer voor het model de kleinstekwadratenmethode wordt toegepast, worden de gegevens per vat getransformeerd om de homogeniteit van de variantie te vergroten. Voordat de EC_x-waarden worden berekend, moet de respons echter zijn teruggetransformeerd naar de oorspronkelijke waarde (31).

▼M6

45. Wanneer de statistische analyse dient om de NOEC te bepalen door toetsing van een hypothese, moet rekening worden gehouden met de variabiliteit tussen vaten. Dit wordt gegarandeerd door gebruik te maken van ANOVA-methoden (bijv. Williams- en Dunnett-toets). De Williams-toets is geschikt wanneer een monotone dosisrespons in theorie wordt verwacht en de Dunnett-toets is geschikt wanneer de hypothese van monotoniciteit niet standhoudt. Als de gebruikelijke ANOVA-aannamen niet opgaan (31), kunnen robuustere toetsen (27) wenselijk zijn.

Uitkomstquotiënt

46. Het uitkomstquotiënt betreft een binaire respons en kan, wanneer een monotone dosisrespons wordt verwacht en de gegevens consistent zijn met die verwachting, worden geanalyseerd met de toets van Cochran-Armitage, toegepast met stapjes omlaag. Als dit niet het geval is, kan de exacte toets van Fisher of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt, met volgens Bonferroni-Holm gecorrigeerde p-waarden. Als er aanwijzingen zijn dat de variabiliteit tussen duplo's met dezelfde concentratie groter is dan een binomiale verdeling zou uitwijzen (zogeheten „extrabinomiale" variantie), moet een robuuste toets van Cochran-Armitage of een exacte toets van Fisher, zoals voorgesteld onder punt 27, worden gebruikt.

De som van levende muggen (mannetjes plus vrouwtjes) die per vat uitgekomen zijn, n_e, wordt bepaald en gedeeld door het aantal ingebrachte larven, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

waarin:

ER = uitkomstquotiënt (emergence ratio);

n_e = aantal levende muggen uitgekomen per vat;

n_a = aantal larven dat in één vat is ingebracht (normaliter 20).

Wanneer n_e groter is dan n_a (d.w.z. wanneer onbedoeld meer dan het voorziene aantal larven werd ingebracht), moet n_a gelijk worden gesteld met n_e.

47. Bij wijze van alternatief, dat vooral voor grote monsters geschikt is, kan, in geval van extrabinomiale variantie, het uitkomstquotiënt als een continue respons worden behandeld en kunnen procedures die overeenkomen met deze *ER*-gegevens worden gebruikt. Als grote monsters worden hier beschouwd monsters waarvan per duplo (vat) zowel het aantal uitgekomen als het aantal niet-uitgekomen muggen groter is dan vijf.

48. Voordat ANOVA-methoden worden toegepast, moeten de waarden van het uitkomstquotiënt eerst een hoektransformatie of een freeman-tukeytransformatie ondergaan om een approximatieve normale verdeling te verkrijgen en de variantie te egaliseren. Wanneer de absolute frequenties worden gebruikt, kan de toets van Cochran-Armitage, de exacte toets van Fisher (Bonferroni) of de toets van Mantel-Haenszel worden gebruikt. De hoektransformatie wordt uitgevoerd door de arcsinus ($\sin^{-1}$) van de vierkantswortel van het uitkomstquotiënt te nemen.

49. Voor uitkomstquotiënten worden EC_x-waarden berekend aan de hand van regressieanalyse (bijv. probit-, logit- of Weibull-modellen (28)). Als geen regressieanalyse mogelijk is (bijv. als er minder dan twee partiële responsen zijn), kunnen andere niet-parametrische methoden, zoals voortschrijdend gemiddelde of eenvoudige interpolatie, worden gebruikt.

Ontwikkelingstempo

50. Met de gemiddelde ontwikkelingstijd wordt bedoeld de gemiddelde tijd tussen het moment waarop de larven in het vat worden gebracht (dag 0 van de test) en het moment waarop de experimentele cohort muggen uitkomt (voor berekening van de ware ontwikkelingstijd moet rekening

▼M6

worden gehouden met de leeftijd van de larven ten tijde van het inbrengen). Het ontwikkelingstempo (eenheid: 1/dag) is de reciproque waarde van de ontwikkelingstijd en staat voor het deel van de larvenontwikkeling dat per dag plaatsvindt. Het ontwikkelingstempo heeft de voorkeur voor de evaluatie van deze sedimenttoxiciteitsstudies, omdat deze in vergelijking met de ontwikkelingstijd een kleinere variantie en een grotere homogeniteit heeft en de normale verdeling beter benadert. Daarom kunnen sterke parametrische testprocedures op het ontwikkelingstempo in plaats van de ontwikkelingstijd worden toegepast. Voor het ontwikkelingstempo als continue respons kunnen EC_x-waarden worden geschat door middel van regressieanalyse (bijv. (29)(30)). Een NOEC voor het gemiddelde ontwikkelingstempo kan worden bepaald aan de hand van ANOVA-methoden, bijv. Williams- of Dunnett-toets. Aangezien mannetjes eerder uitkomen dan vrouwtjes (d.w.z. ze hebben een hoger ontwikkelingstempo), is het logisch om het ontwikkelingstempo voor elk geslacht apart te berekenen, naast dat voor de totale muggenpopulatie.

51. Bij de statistische tests wordt aangenomen dat het op inspectiedag x waargenomen aantal muggen is uitgekomen in het midden van het tijdsinterval tussen dag x en dag x - 1 (1 = lengte van het inspectie-interval, doorgaans 1 dag). Het gemiddelde ontwikkelingstempo per vat ($\bar{x}$) wordt als volgt berekend:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

waarin:

$\bar{x}$: gemiddeld ontwikkelingstempo per vat;

i: index van het inspectie-interval;

m: maximumaantal inspectie-intervallen;

f_i: in inspectie-interval i uitgekomen aantal muggen;

n_e: totaal aantal uitgekomen muggen aan het eind van de proef (Σf_i)

x_i: ontwikkelingstempo van de in interval i uitgekomen muggen;

$$x_i = 1/\text{dag}_i - \frac{l_i}{2}$$

waarbij:

dag_i: inspectiedag (dagen sinds inbrengen van de larven)

l_i: lengte van inspectie-interval i (dagen, gewoonlijk één dag).

Geslachtsverhouding

52. De geslachtsverhouding betreft een binaire respons en wordt daarom geëvalueerd aan de hand van de exacte toets van Fisher of andere geschikte methoden. De natuurlijke geslachtsverhouding van *C. riparius* is één, d.w.z. er zijn evenveel mannetjes als vrouwtjes. Voor beide generaties moet de gegevens wat betreft de geslachtsverhouding identiek worden behandeld. Aangezien het maximumaantal muggen per vat (d.w.z. 20) te laag is voor zinvolle statistische analyse, wordt het totaal aantal volledig uitgekomen en levende muggen voor elk geslacht van alle vaten van

▼M6

één test opgeteld. Deze niet-getransformeerde gegevens worden getoetst tegen de (oplosmiddel)controle of gepoolde controlegegevens in een contingentietabel van 2 × 2.

Voortplanting

53. Voortplanting, als fecunditeit, wordt berekend als het aantal eistrengen per vrouwtje. Meer bepaald wordt het totaal aantal eistrengen dat in een kweekkooi geproduceerd is, gedeeld door het totaal aantal levende en niet-beschadigde vrouwtjes dat in die kooi is ingebracht. Een NOEC voor fecunditeit kan worden bepaald aan de hand van ANOVA-methoden, bijv. Williams- of Dunnett-toets.

54. Vruchtbaarheid van de eistrengen wordt gebruikt om het aantal vruchtbare eistrengen per vrouwtje te kwantificeren. Het totaal aantal vruchtbare eistrengen dat in een kweekkooi geproduceerd is, wordt gedeeld door het totaal aantal levende en niet-beschadigde vrouwtjes dat in die kooi is ingebracht. Een NOEC voor vruchtbaarheid kan worden bepaald aan de hand van ANOVA-methoden, bijv. Williams- of Dunnett-toets.

Testverslag

55. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

— fysieke aard en fysisch-chemische eigenschappen (oplosbaarheid in water, dampspanning, log K_{ow}, verdelingscoëfficiënt in de bodem (of in sediment, indien beschikbaar), stabiliteit in water en sediment enz.);

— identificatiegegevens van de stof (triviale naam, chemische naam, structuurformule, CAS-nummer enz.) met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van de teststof.

Geteste soort:

— gebruikte testorganismen: soort, wetenschappelijke naam, bron van de organismen en kweekomstandigheden;

— informatie over hoe de eipakketten en larven werden gehanteerd;

— informatie over behandeling van de uitgekomen volwassen muggen van de eerste generatie met hulp van een zuigapparaat enz. (zie aanhangsel 5);

— leeftijd van het testorganismen ten tijde van inbrengen in de testvaten van de eerste generatie.

Testomstandigheden:

— gebruikt sediment, d.w.z. natuurlijk of kunstmatig sediment;

— natuurlijk sediment: locatie en beschrijving van bemonsteringslocatie, indien mogelijk met inbegrip van verontreinigingsgeschiedenis; kenmerken van het sediment: pH, organischekoolstofgehalte, C/N-verhouding en korrelgrootteverdeling (indien van toepassing).

— kunstmatig sediment: bereiding, ingrediënten en eigenschappen (organischekoolstofgehalte, pH, vocht enz. gemeten aan het begin van de test);

— bereiding van het testwater (bij gebruik van synthetisch water) en eigenschappen (zuurstofgehalte, pH, hardheid enz. gemeten aan het begin van de test);

▼**M6**

— diepte van sediment en bovenstaand water voor de testvaten en kristalliseerschalen;

— volume van bovenstaand water en poriënwater; gewicht aan nat sediment met en zonder poriënwater voor de testvaten en kristalliseerschalen;

— testvaten (materiaal en afmetingen);

— kristalliseerschalen (materiaal en afmetingen);

— kweekkooien (materiaal en afmetingen);

— bereidingswijze van stamoplossingen en testconcentraties voor de testvaten en kristalliseerschalen;

— inbrengen van de teststof in de testvaten en kristalliseerschalen: testconcentraties, aantal duplo's en oplosmiddelen indien nodig;

— incubatieomstandigheden voor de testvaten: temperatuur, lichtcyclus en -intensiteit, beluchting (luchtbellen per seconde);

— incubatieomstandigheden voor de kweekkooien en de kristalliseerschalen: temperatuur, lichtcyclus en -intensiteit;

— incubatieomstandigheden voor de eistrengen in de microtiterplaten (of andere vaten): temperatuur, lichtcyclus en -intensiteit;

— details over het voedsel, met inbegrip van soort voedsel, bereiding, hoeveelheid en voederregime.

Resultaten:

— de nominale testconcentraties, de gemeten testconcentraties en de resultaten van alle analysen die zijn verricht om de concentratie van de teststof in de testvaten en kristalliseerschalen te bepalen;

— waterkwaliteit in de testvaten en kristalliseerschalen, d.w.z. pH, temperatuur, opgeloste zuurstof, hardheid en ammonium;

— vervanging van verdampt testwater voor de testvaten, indien van toepassing;

— aantal uitgekomen mannelijke en vrouwelijke muggen per vat en per dag voor de eerste en tweede generatie;

— geslachtsverhouding van volledig uitgekomen en levende muggen per test voor de eerste en tweede generatie;

— aantal niet tot mug ontwikkelde larven per vat voor de eerste en tweede generatie;;

— percentage/fractie van uitkomst per duplo en testconcentratie (mannelijke en vrouwelijke muggen samengevoegd) voor de eerste en tweede generatie;

— gemiddeld ontwikkelingstempo van volledig uitgekomen muggen per duplo en behandeling (mannelijke en vrouwelijke muggen apart en ook gecombineerd) voor de eerste en tweede generatie;

— aantal eistrengen afgezet in de kristalliseerschalen per kweekkooi en dag;

▼M6

— kenmerken van elke eistreng (formaat, vorm en vruchtbaarheid);

— fecunditeit — totaal aantal eistrengen per totaal aantal in de kweekkooi gebrachte vrouwtjes;

— vruchtbaarheid — totaal aantal vruchtbare eistrengen per totaal aantal in de kweekkooi gebrachte vrouwtjes;

— schattingen van toxische eindpunten, bijv. EC_x (met bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen), NOEC en de statistische methoden waarmee zij zijn bepaald;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van een eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR

(1) Hoofdstuk C.28 van deze bijlage, Test ter bepaling van de toxiciteit voor Chironomidae in sediment en water m.b.v. verrijkt water.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. en M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, eindverslag aan de Europse Commissie, verslag nr.: EC 3738. Augustus 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, tweede uitgave, EPA 600/R-99/064, maart 2000, herziening van de eerste uitgave van 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. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and 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. and 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) Hoofdstuk C.27 van deze bijlage, Test ter bepaling van de toxiciteit voor Chironomidae in sediment en water m.b.v. verrijkt sediment.

(16) OESO (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OESO, Parijs.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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) OESO (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application,* OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 blz., ENV/JM/MONO(2006)18, OESO, Parijs.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and 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. and 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) OESO (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OESO, Parijs.

▼**M6**

Aanhangsel 1

Definities

Voor de toepassing van deze testmethode worden de volgende definities gebruikt:

Stof is een chemische stof of mengsel.

Kunstmatig sediment (ook wel bereid, gereconstitueerd, kunstmatig of synthetisch sediment genoemd) is een mengsel van materialen waarmee de fysische bestanddelen van natuurlijk sediment worden nagebootst.

Bovenstaand water is het water dat in het testvat op het sediment wordt gegoten.

Poriënwater (ook wel interstitieel water genoemd) is het water in de ruimten tussen de sediment- en bodemdeeltjes.

Verrijkt water is het testwater waaraan teststof is toegevoegd.

Teststof is elke volgens deze testmethode getest(e) stof of mengsel.

▼M6

Aanhangsel 2

Aanbevelingen voor de kweek van *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larven kunnen worden gekweekt in kristalliseerschalen of grotere houders. Op de bodem van de houder wordt een 5 tot 10 mm dikke laag fijn kwartszand gestrooid. Ook kiezelgoer (bijv. Merck, art. 8117) is geschikt gebleken als substraat (in dat geval volstaat een dunnere laag van slechts enkele mm). Geschikt water wordt daarna toegevoegd tot een diepte van enkele cm. Het waterniveau moet zo nodig worden aangevuld om verlies door verdamping te compenseren en uitdroging te voorkomen. Indien nodig kan het water worden vervangen. Er wordt voorzichtige beluchting toegepast. De larvenkweekvaten worden in een geschikte kooi geplaatst, zodat de volwassen muggen niet kunnen ontsnappen. De kooi moet groot genoeg zijn om de uitgekomen volwassen muggen te laten zwermen, omdat anders mogelijk niet wordt gecopuleerd (ten minste ca. 30 × 30 × 30 cm).

2. De kooien worden op kamertemperatuur of in een kamer met een constant klimaat bij 20 ± 2 °C gehouden, met een lichtregime van 16 uur licht (intensiteit ca. 1 000 lux), 8 uur donker. Gerapporteerd is dat een relatieve luchtvochtigheid van minder dan 60 % de voortplanting kan belemmeren.

Verdunningswater

3. Elk geschikt natuurlijk of synthetisch water kan worden gebruikt. Gebruikelijk zijn bronwater, ontchloord kraanwater en kunstmatige media (bijv. Elendt-media M4 en M7, zie hieronder). Voor gebruik moet het water worden belucht. Indien nodig kan het kweekwater worden ververst door voorzichtig het gebruikte water uit de kweekvaten te gieten of hevelen zonder de larvenhulzen te beschadigen.

Toediening van voedsel aan larven

4. *Chironomus*-larven worden dagelijks gevoerd met ongeveer 250 mg vissenvoervlokken (Tetra Min®, Tetra Phyll® of een soortgelijk merk vissenvoer) per vat. Dit voer kan worden gegeven als droog gemalen poeder of als suspensie in water: aan 20 ml verdunningswater wordt 1,0 g voedervlokken toegevoegd en gemengd, zodat een homogeen mengsel ontstaat. Dit preparaat kan met ongeveer 5 ml per vat per dag worden gevoerd. (schudden voor gebruik.) Aan oudere larven kan meer voer worden gegeven.

5. Het voedsel wordt aangepast op basis van de waterkwaliteit. Als het kweekmedium troebel wordt, wordt de hoeveelheid voedsel verminderd. De toediening van voedsel moet zorgvuldig worden gecontroleerd. Als te weinig voer wordt gegeven, zullen de larven naar de waterkolom uitwijken; als te veel voer wordt gegeven, neemt de microbiële activiteit toe en daalt het zuurstofgehalte. Beide condities kunnen tot lagere groeisnelheden leiden.

6. Wanneer nieuwe kweekvaten worden ingericht, kunnen ook enige cellen van groene algen (bijv. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) worden toegevoegd.

Toediening van voedsel aan uitgekomen volwassen muggen

7. Enkele onderzoekers hebben erop gewezen dat een in een sucroseoplossing gedrenkt wattenschijfje als voedsel kan dienen voor uitgekomen volwassen muggen.

▼M6

Uitkomst van muggen

8. In de larvenkweekvaten zullen zich bij 20 ± 2 °C na ongeveer 13-15 dagen volwassen muggen ontwikkelen. Mannetjes zijn gemakkelijk te herkennen aan hun veerachtige antennes en dunne lichaam.

Eipakketten

9. Zodra in de kweekkooi volwassen muggen aanwezig zijn, worden alle larvenkweekvaten drie keer per week gecontroleerd op afgezette geleiachtige eipakketten. Als eipakketten aanwezig zijn, worden zij voorzichtig verwijderd. Zij worden overgebracht naar een klein schaaltje met een monster van het kweekwater. De eipakketten worden gebruikt om een nieuw kweekvat te beginnen (bijv. 2-4 eipakketten per vat) of worden voor toxiciteitstests gebruikt.

10. Larven in het eerste stadium moeten na 2-3 dagen uitkomen.

Inrichting van nieuwe kweekvaten

11. Zodra kweken zijn opgezet, moet het mogelijk zijn één keer per week, of minder vaak naargelang de testvoorschriften, een vers larvenkweekvat in te richten, waarbij de oudere vaten worden verwijderd nadat zich volwassen muggen hebben ontwikkeld. Dit systeem zorgt voor een regelmatige aanvoer van volwassen muggen met een minimum aan beheer.

Bereiding van de testoplossingen M4 en M7

12. Elendt (1990) heeft het medium M4 beschreven. Het medium M7 wordt op dezelfde wijze als M4 bereid, maar met een vier keer zo lage concentratie van de in tabel 1 vermelde stoffen. De testoplossing mag niet volgens Elendt en Bias (1990) worden bereid, omdat de voor de stamoplossingen vermelde concentraties van $NaSiO_3 \times 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 en K_2HPO_4 niet geschikt zijn.

Bereiding van het medium M7

13. Elke stamoplossing (I) wordt apart bereid en met deze stamoplossingen (I) wordt een gecombineerde stamoplossing (II) bereid (zie tabel 1). Het medium M7 wordt bereid uit 50 ml gecombineerde stamoplossing (II) en de in tabel 2 vermelde hoeveelheden van elke stamoplossing van macronutriënten en tot 1 liter gedeïoniseerd water aangevuld. Een vitaminestamoplossing wordt bereid door overeenkomstig tabel 3 drie vitaminen toe te voegen aan gedeïoniseerd water; kort voor gebruik wordt 0,1 ml van de gecombineerde vitaminestamoplossing aan het definitieve medium M7 toegevoegd De vitaminestamoplossing wordt in bevroren toestand in kleine porties bewaard. Het medium wordt belucht en gestabiliseerd.

Tabel 1

Stamoplossingen van spoorelementen voor de media M4 en M7

Stamoplossingen (I)	Hoeveelheid (mg) aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water	Gecombineerde stamoplossing (II) bereiden door de volgende hoeveelheden (ml) van de stamoplossingen (I) te mengen en tot 1 liter gedeïoniseerd water aan te vullen		Uiteindelijke concentraties in testoplossingen (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**

Stamoplossingen (I)	Hoeveelheid (mg) aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water	Gecombineerde stamoplossing (II) bereiden door de volgende hoeveelheden (ml) van de stamoplossingen (I) te mengen en tot 1 liter gedeïoniseerd water aan te vullen		Uiteindelijke concentraties in testoplossingen (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Deze stoffen zijn verschillend voor M4 en M7, zoals hierboven is aangegeven.
(2) Deze oplossingen worden apart bereid, vervolgens samengevoegd en onmiddellijk in een autoclaaf behandeld.

Tabel 2

Stamoplossingen van macronutriënten voor de media M4 en M7

	Hoeveelheid aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water (mg)	Hoeveelheid stamoplossing van macronutriënten die wordt toegevoegd om de media M4 en M7 te bereiden (ml/l)	Uiteindelijke concentraties in de testoplossingen M4 en M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tabel 3

Vitaminestamoplossing voor de media M4 en M7

De drie vitamineoplossingen worden tot één vitaminestamoplossing samengevoegd.

	Hoeveelheid aangevuld tot 1 liter gedeïoniseerd water (mg)	Hoeveelheid vitaminestamoplossing die wordt toegevoegd om de media M4 en M7 te bereiden (ml/l)	Uiteindelijke concentraties in de testoplossingen M4 en M7 (mg/l)
Thiaminehydrochloride	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

REFERENTIES

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köblz. Berlijn.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and 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

Aanhangsel 3

Bereiding van kunstmatig sediment

SAMENSTELLING VAN HET SEDIMENT

Het kunstmatige sediment wordt als volgt samengesteld:

Bestanddeel	Kenmerken	% van het sediment (drooggewicht)
Turf	Veenmosturf, zo dicht mogelijk bij pH 5,5-6,0, zonder zichtbare plantenresten, fijngemalen (deeltjesgrootte ≤ 1 mm) en aan de lucht gedroogd	4 - 5
Kwartszand	Korrelgrootte: > 50 % van de deeltjes moet binnen het bereik 50-200 µm liggen	75 - 76
Kaolienklei	Kaoliengehalte ≥ 30 %	20
Organische koolstof	Aangepast door toevoeging van turf en zand	2 (± 0,5)
Calciumcarbonaat	$CaCO_3$, poedervormig, chemisch zuiver	0,05 - 0,1
Watergehalte	Geleidbaarheid ≤ 10 µS/cm	30 - 50

BEREIDING

De turf wordt aan de lucht gedroogd en tot een fijn poeder vermalen. Er wordt een suspensie van de vereiste hoeveelheid turfpoeder in gedeïoniseerd water bereid met een kwalitatief hoogwaardig homogeniseerapparaat. De pH van deze suspensie wordt met $CaCO_3$ aangepast tot 5,5 ± 0,5. De suspensie wordt ten minste twee dagen lang onder zachtjes roeren bij 20 ± 2 °C geconditioneerd om de pH te stabiliseren en een stabiele microbiële component te verkrijgen. De pH wordt opnieuw gemeten en moet nu 6,0 ± 0,5 bedragen. Vervolgens wordt de turfsuspensie met de andere bestanddelen (zand en kaolienklei) en gedeïoniseerd water vermengd om een homogeen sediment te verkrijgen met een watergehalte van 30-50 % van het drooggewicht van het sediment. De pH van het uiteindelijke mengsel wordt nogmaals gemeten en zo nodig met $CaCO_3$ tot 6,5-7,5 aangepast. Er worden monsters van het sediment genomen om het drooggewicht en het gehalte aan organische koolstof te bepalen. Aanbevolen wordt het kunstmatige sediment, voordat het in een test ter bepaling van de toxiciteit voor Chironomidae wordt gebruikt, zeven dagen te laten rusten onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen.

OPSLAG

De droge bestanddelen voor de bereiding van het kunstmatige sediment kunnen op een droge en koele plaats bij kamertemperatuur worden bewaard. Het kunstmatige (natte) sediment mag niet worden opgeslagen voordat het in de test wordt gebruikt. Het moet onmiddellijk na afloop van de zevendaagse conditioneringsperiode die de bereiding afsluit, worden gebruikt.

REFERENTIES

OESO (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OESO, Parijs.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and 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**

Aanhangsel 4

Chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater

BESTANDDEEL	CONCENTRATIES
Deeltjes	< 20 mg/l
Totale hoeveelheid organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonium	< 1 µg/l
Hardheid uitgedrukt als $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chloorresiduen	< 10 µg/l
Totale hoeveelheid organofosfaat-bestrijdingsmiddelen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organochloor-bestrijdingsmiddelen plus polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organisch chloor	< 25 ng/l

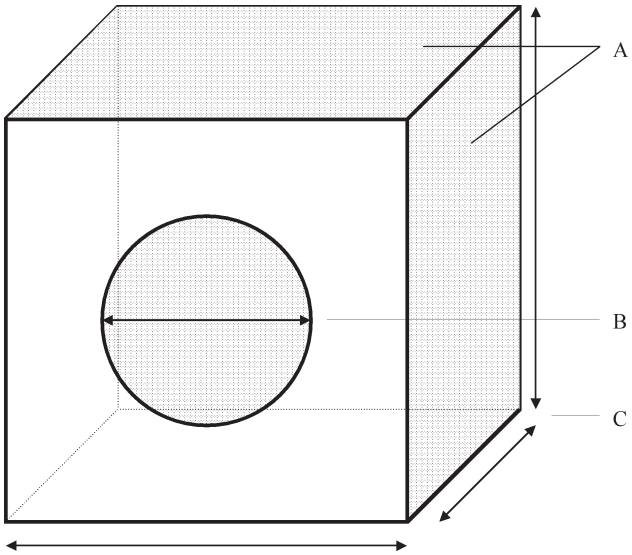
(*) Opgemerkt zij echter dat als er een interactie tussen de hardheidsionen en de teststof wordt vermoed, water met een lagere hardheid moet worden gebruikt (dan is Elendt-medium M4 dus ongeschikt).

▼**M6**

Aanhangsel 5

Richtsnoer voor uitvoering van de test

Voorbeeld van een kweekkooi:



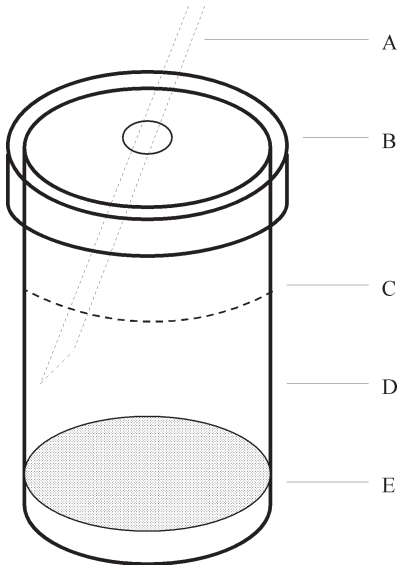
A: gaas bovenop en aan ten minste één zijde van de kooi (maaswijdte ca. 1 mm)

B: opening voor het uitzetten van uitgekomen volwassen muggen in de kweekkooi en om de gelegde eistrengen uit de kristalliseerschalen te verwijderen (niet in deze afbeelding getoond)

C: minimale afmetingen van de kweekkooi: 30 cm lang, 30 cm hoog en 30 cm breed

▼**M6**

Voorbeeld van een testvat:



A: pasteurpipet voor luchttoevoer aan het bovenstaande water

B: glazen deksel om ontsnapping van uitgekomen muggen te voorkomen

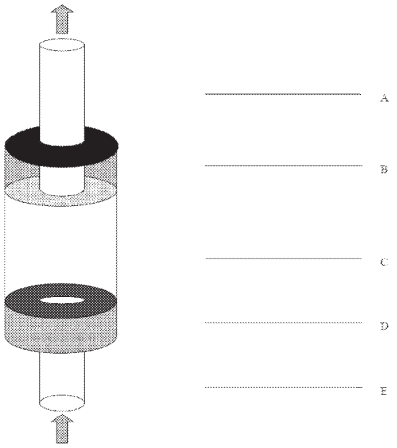
C: wateroppervlak

D: testvat (glazen beker van minimaal 600 ml)

E: sedimentlaag

▼**M6**

Voorbeeld van een zuigapparaat voor het vangen van volwassen muggen (pijlen geven richting van luchtstroom aan):



A: glazen buis (binnendiameter ca. 5 mm) aangesloten op een zelfaanzuigende pomp

B: stop van gevulkaniseerd rubber, geperforeerd met glazen buis (A). Aan de binnenkant is de opening van glazen buis (A) bedekt met watten en een gaas (maaswijdte ca. 1 mm) om te voorkomen dat de muggen beschadigd raken als ze in het apparaat worden gezogen

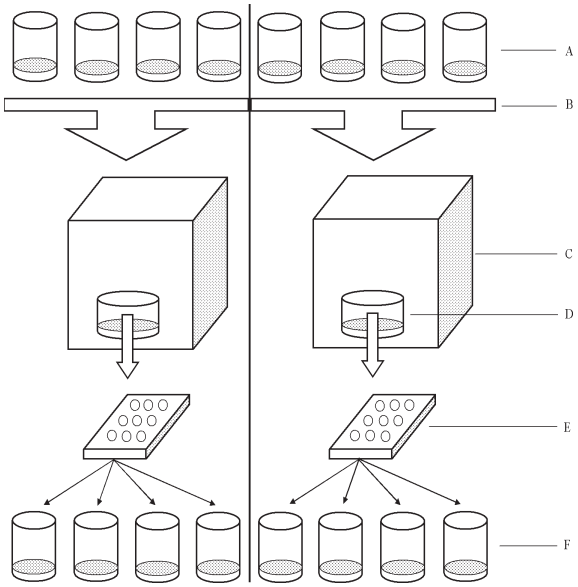
C: doorzichtige houder (plastic of glas, lengte ca. 15 cm) voor het vangen van muggen

D: stop van gevulkaniseerd rubber, geperforeerd met glazen buis (E). Om de muggen in de kweekkooi los te laten, wordt stop D van houder C losgemaakt

E: buis (plastic of glas, binnendiameter ca. 8 mm) om volwassen muggen uit het vat te verzamelen

▼**M6**

Schematische voorstelling van een levenscyclustest:



A: eerste generatie — testvaten met een sediment-watersysteem, acht duplo's, 20 larven in het eerste stadium per vat

B: vier testvaten per kweekkooi A en B

C: kweekkooien (A en B) voor zwermen, paren en eitjes leggen

D: kristalliseerschalen voor afzetting van eistrengen

E: microtiterplaten, één well per eistreng

F: tweede generatie — testvaten met een sediment-watersysteem, acht duplo's, 20 larven in het eerste stadium per vat.

▼M6

C.41. GESLACHTELIJKE-ONTWIKKELINGSTEST MET VISSEN

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan OESO-testrichtsnoer (TG) 234 (2011). De methode is gebaseerd op een besluit uit 1998 om bestaande richtsnoeren te herzien en nieuwe richtsnoeren te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars. Er is vastgesteld dat de geslachtelijke-ontwikkelingstest met vissen (Fish Sexual Development Test, FSDT) een veelbelovende testmethode is die een gevoelig levensstadium van vissen behandelt waarin zij gevoelig zijn voor oestrogeen- en androgeenachtige stoffen. De testmethode is van 2006 tot 2010 in het laboratorium gevalideerd. Daar zijn het Japanse rijstvisje (*Oryzias latipes*), de zebravis (*Danio rerio*) en de driedoornige stekelbaars (*Gasterosteus aculeatus*) gevalideerd en is de Amerikaanse dikkop-elrits (*Pimephales promelas*) gedeeltelijk gevalideerd (41) (42) (43). Dit protocol omvat het Japanse rijstvisje, de driedoornige stekelbaars en de zebravis. Het protocol is in principe een uitbreiding van OESO TG 210 „Fish, Early Life Stage Toxicity Test" (1), waarbij de blootstelling wordt voortgezet totdat de vissen geslachtelijk gedifferentieerd zijn, d.w.z. ongeveer 60 dagen na uitkomen (days post-hatch, dph) voor het Japanse rijstvisje, de driedoornige stekelbaars en de zebravis (de blootstellingsperiode kan korter of langer zijn voor andere soorten die in de toekomst worden gevalideerd), en de hormoongevoelige eindpunten worden toegevoegd. Aan de hand van de FSDT wordt een beoordeling gemaakt van de effecten in het vroege levensstadium en de mogelijke schadelijke gevolgen van vermeende hormoonontregelende stoffen (bijv. oestrogenen, androgenen en remmers van de steroïdogenese) op de geslachtelijke ontwikkeling. Door de combinatie van de twee centrale endocriene eindpunten, de concentratie van vitellogenine (VTG) en fenotypische geslachtsverhouding, kan de test aanwijzingen geven over het werkingsmechanisme van de teststof. Wegens de voor de populatie relevante verandering in de fenotypische geslachtsverhouding kan de FSDT gebruikt worden voor gevaren- en risicobeoordeling. Als de test voor gevaren- of risicobeoordeling wordt gebruikt, dient de stekelbaars echter niet te worden gebruikt omdat de tot nu toe beschikbare validatiegegevens erop wijzen dat bij deze soort de veranderingen in de fenotypische geslachtsverhouding door de teststoffen ongewoon waren.

2. Het protocol is gebaseerd op vissen die via het water aan stoffen worden blootgesteld tijdens de geslachtelijk labiele periode waarin de vissen naar verwachting het gevoeligst zijn voor de effecten van hormoonontregelende stoffen die de geslachtelijke ontwikkeling verstoren. Twee centrale eindpunten worden gemeten als indicatoren van met endocrien verband houdende ontwikkelingsafwijkingen, de VTG-concentraties en geslachtsverhoudingen, bepaald aan de hand van histologie van de geslachtsklieren. Histopathologie van de geslachtsklieren (evaluatie en bepaling van de ontwikkelingsstadia van oöcyten en spermatogenetische cellen) is facultatief. Daarnaast wordt waar mogelijk het genetische geslacht bepaald (bijv. bij het Japanse rijstvisje en de driedoornige stekelbaars). De aanwezigheid van een genetische geslachtsmarker is een aanzienlijk voordeel omdat die het onderscheidend vermogen van de statistieken van de geslachtsverhouding verhoogt en de detectie van individuele fenotypische geslachtsomkering mogelijk maakt. Andere apicale eindpunten die gemeten moeten worden zijn uitkomstpercentage, overleving, lengte en lichaamsgewicht. De testmethode kan mogelijk aangepast worden voor andere dan de bovengenoemde soorten, mits de andere soorten een validatie ondergaan die gelijkwaardig is aan die voor het Japanse rijstvisje, de driedoornige stekelbaars en de zebravis, de controlevissen aan het einde van de test geslachtelijk gedifferentieerd zijn, de VTG-gehaltes hoog genoeg zijn om significante stofgerelateerde variaties te detecteren, en mits de gevoeligheid van het testsysteem wordt vastgesteld met behulp van referentiestoffen met endocriene activiteit ((anti-)oestrogenen, (anti-)androgenen, aromataseremmers enz.). Daarnaast moeten eventuele validatierapporten die verwijzen naar FSDT-gegevens met andere soorten door de OESO beoordeeld worden, en moet de uitkomst van de validatie als bevredigend worden beschouwd.

▼M6

Inleidende overwegingen en beperkingen

3. VTG wordt normaliter aangemaakt door de lever van vrouwelijke eierleggende gewervelde dieren, als reactie op circulerend endogeen oestrogeen (2). Het is een voorloper van dooiereiwitten. Nadat het in de lever is aangemaakt, gaat het via de bloedsomloop naar de eierstok waar het door ontwikkelende eitjes wordt opgenomen en aangepast. De VTG-synthese is zeer beperkt, maar wel detecteerbaar, bij onvolwassen vissen en volwassen mannelijke vissen omdat zij niet genoeg circulerend oestrogeen hebben. Als reactie op exogene oestrogeenstimulatie kan de lever echter VTG synthetiseren en afscheiden (3) (4) (5).

4. De meting van VTG dient voor de detectie van stoffen met oestrogene, antioestrogene of androgene werkingsmechanismen en stoffen die de steroïdogenese verstoren, zoals bijvoorbeeld aromataseremmers. De detectie van oestrogene stoffen is mogelijk aan de hand van de meting van VTG-inductie bij mannelijke vissen, waarover uitvoerig is geschreven in de collegiaal getoetste wetenschappelijke literatuur. VTG-inductie is ook aangetoond na blootstelling aan aromatiseerbare androgenen (6) (7). Een verlaging van de circulerende oestrogeenspiegel bij vrouwtjes, bijvoorbeeld door remming van het aromatase dat het endogene androgeen omzet in het natuurlijke oestrogeen 17β-oestradiol, veroorzaakt een afname in de VTG-concentratie. Deze wordt gebruikt voor de detectie van stoffen met aromataseremmende eigenschappen of, in bredere zin, van remmers van de steroïdogenese (33). De biologische relevantie van de VTG-respons na remming van oestrogeen/aromatase is vastgesteld en uitvoerig gedocumenteerd (8) (9). Het is echter mogelijk dat de aanmaak van VTG bij vrouwtjes ook verstoord kan worden door algemene toxiciteit en niet-endocriene toxische werkingsmechanismen.

5. Er zijn meerdere meetmethoden met succes ontwikkeld en gestandaardiseerd voor routinegebruik om VTG te kwantificeren in monsters van bloed, lever, het hele lichaam of kop-/staarthomogenaat uit afzonderlijke vissen. Dit is het geval voor de zebravis, de driedoornige stekelbaars en het Japanse rijstvisje, evenals voor de gedeeltelijk gevalideerde soort dikkop-elrits; er zijn soortspecifieke Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- (ELISA-) methoden beschikbaar, waarbij gebruik wordt gemaakt van immunochemie, voor de kwantificering van VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Bij het Japanse rijstvisje en de zebravis is er een goede correlatie tussen VTG gemeten in bloedplasma-, lever- en homogenaatmonsters, hoewel homogenaten doorgaans iets lagere waarden vertonen dan plasma (17) (18) (19). Aanhangsel 5 beschrijft de aanbevolen procedures voor bemonstering voor VTG-analyse.

6. Verandering in de fenotypische geslachtsverhouding is een eindpunt dat een afspiegeling is van geslachtsomkering. In principe kunnen oestrogenen, antioestrogenen, androgenen, anti-androgenen en remmers van de steroïdogenese de geslachtsverhouding van ontwikkelende vissen beïnvloeden (20). Bij de zebravis is aangetoond dat deze geslachtsomkering gedeeltelijk omkeerbaar is (21) na blootstelling aan oestrogeenachtige stoffen, terwijl de geslachtsomkering na blootstelling aan androgeenachtige stoffen blijvend is (30). Het geslacht wordt gedefinieerd als vrouwelijk, mannelijk, interseksueel (zowel oöcyten als spermatogenetische cellen in één geslachtsklier) of ongedifferentieerd, vastgesteld bij individuele vissen door middel van histologisch onderzoek van de geslachtsklieren. Richtsnoeren zijn te vinden in aanhangsel 7 en in de OESO-leidraad „Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (22).

7. Het genetische geslacht wordt onderzocht aan de hand van genetische markers, wanneer deze bij een gegeven vissoort aanwezig zijn. Bij het Japanse rijstvisje kunnen de vrouwelijke XX- of mannelijke XY-genen door middel van polymerasekettingreactie (PCR) worden gedetecteerd, of kan het Y-gekoppelde DM-domeingen (DMY) worden geanalyseerd (DMY-negatief of

▼M6

-positief), zoals beschreven in (23) (24). Voor de driedoornige stekelbaars wordt een gelijkwaardige PCR-methode voor genetische geslachtsbepaling beschreven in aanhangsel 10. Wanneer het genetische geslacht individueel gekoppeld kan worden aan het fenotypische geslacht, is het onderscheidend vermogen van de test hoger. Daarom moet het genetische geslacht bepaald worden bij soorten met beschreven genetische geslachtsmarkers.

8. De twee centrale endocriene eindpunten, VTG en geslachtsverhouding, kunnen samen het endocriene werkingsmechanisme (mode of action, MOA) van de stof aantonen (tabel 1). De geslachtsverhouding is een voor de populatie relevante biomarker (25) (26) en voor enkele goed omschreven werkingsmechanismen kunnen de FSDT-resultaten gebruikt worden voor gevaren- en risicobeoordeling, wanneer dit door de regelgevingsinstantie geschikt wordt bevonden. Deze werkingsmechanismen betreffen op het moment oestrogenen, androgenen en steroïdogeneseremmers.

Tabel 1

Reactie van de endocriene eindpunten op verschillende werkingsmechanismen van stoffen:

↑= verhogend, ↓ = verlagend, — = niet onderzocht

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Geslachtsverhouding	Referenties
Zwakke oestrogeenagonist	↑	↑	↑♀ of ↑ongediff.	(27) (40)
Sterke oestrogeenagonist	↑	↑	↑♀ of ↑ongediff., geen ♂	(28) (40)
Oestrogeenantagonist	—	—	↓♀, ↑ongediff.	(29)
Androgeenagonist	↓ of —	↓ of —	↑ ♂, geen ♀	(28) (30)
Androgeenantagonist	—	—	↑♀ ↑Interseksueel	(31)
Aromataseremmer	↓	↓	↓♀	(33)

9. De FSDT behandelt niet het levensstadium van voortplanting van de vissen en daarom moeten stoffen die vermoedelijk de voortplanting beïnvloeden bij lagere concentraties dan de geslachtelijke ontwikkeling, worden onderzocht in een test die de voortplanting behandelt.

10. De in deze testmethode gebruikte definities worden gegeven in aanhangsel 1.

11. De *in vivo*-FSDT is bedoeld voor de detectie van stoffen met androgene en oestrogene eigenschappen, alsmede anti-androgene, anti-oestrogene en steroïdogenese-remmende eigenschappen. De FSDT-validatiefasen (1 en 2) behandelden oestrogene, androgene en steroïdogenese-remmende stoffen. De effecten in de FSDT van oestrogeen- en androgeenantagonisten staan in tabel 1, maar deze MOA's zijn momenteel minder goed beschreven.

PRINCIPE VAN DE TEST

12. In de test worden vissen vanaf net bevruchte eitjes tot volledige geslachtsdifferentiatie blootgesteld aan ten minste drie concentraties van de in water opgeloste teststof. De test moet worden uitgevoerd in een doorstroomprocedure, tenzij dit niet mogelijk is wegens de beschikbaarheid of aard (bijv. beperkte oplosbaarheid) van de teststof. De test begint met het plaatsen van

▼M6

net bevruchte eitjes (vóór de splitsing van de kiemschijf) in de testkamers. Het beladen van de kamers wordt voor elke soort beschreven onder punt 27. Voor de gevalideerde vissoorten (het Japanse rijstvisje, de driedoornige stekelbaars en de zebravis) wordt de test beëindigd op 60 dph. Bij beëindiging van de test worden alle vissen op humane wijze gedood. Er wordt een biologisch monster (bloedplasma, lever- of kop-/staarthomogenaat) bij elke vis afgenomen voor VTG-analyse en het overgebleven deel wordt gefixeerd voor histologische evaluatie van de geslachtsklieren om het fenotypische geslacht te bepalen. Eventueel kan er histopathologie (stadiumbepaling van geslachtsklieren, ernst van interseksualiteit) worden verricht. Bij soorten met geschikte markers wordt een biologisch monster (de anaal- of rugvin) genomen voor bepaling van het genetische geslacht (aanhangsels 9 en 10).

13. Een overzicht van de relevante testomstandigheden specifiek voor gevalideerde soorten (het Japanse rijstvisje, de driedoornige stekelbaars en de zebravis) wordt in aanhangsel 2 gegeven.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

14. De resultaten van een acute-toxiciteitstest of andere toxiciteitstest voor de korte termijn [bijv. testmethode C.14 (34) en OESO TG 210 (1)], bij voorkeur uitgevoerd met de voor deze test gekozen soorten, dienen beschikbaar te zijn. Dit betekent dat de oplosbaarheid in water en de dampspanning van de teststof bekend moeten zijn en dat er een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar is voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testkamers.

15. Andere nuttige gegevens over de teststof zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de stabiliteit van de stof in water en licht, pKa, P_{ow} en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (testmethode C.4) (35).

Aanvaardbaarheidscriteria voor de test

16. De testresultaten zijn alleen geldig als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

— het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test minimaal 60 % van de verzadigingswaarde van lucht (ASV) zijn geweest;

— het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers mag op geen enkel moment tijdens de blootstelling groter zijn dan ± 1,5 °C. Tevens moet de watertemperatuur gehandhaafd worden binnen het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 2).

— er moet een gevalideerde methode beschikbaar zijn voor de analyse van de betreffende stof met een detectiegrens ruim onder de laagste nominale concentratie en er moet bewijs worden verzameld om aan te tonen dat de concentraties van de teststof in oplossing op bevredigende wijze binnen ± 20 % van de gemiddelde meetwaarden zijn gehouden;

— het totale percentage bevruchte eitjes in de controlegroep en eventueel bij de oplosmiddelcontroles, moet groter dan of gelijk zijn aan de minimale percentages zoals gedefinieerd in aanhangsel 2;

— criteria voor acceptatie met betrekking tot groei en geslachtsverhouding bij beëindiging van de test zijn gebaseerd op gegevens uit de controlegroepen (samengevoegde oplosmiddel- en watercontrole, tenzij deze significant verschillen, in dat geval alleen oplosmiddel):

▼M6

		Japanse rijstvisje	Zebravis	Driedoornige stekelbaars
Groei	Natgewicht vis, drooggedept	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Lengte (standaardlengte)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Geslachtsverhouding (% mannetjes of vrouwtjes)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— wanneer een oplosmiddel wordt gebruikt, moet dit geen statistisch significant effect op de overleving hebben en geen hormoonontregelende effecten of andere schadelijke effecten uitoefenen op de vroege levensstadia, zoals aangetoond aan de hand van een oplosmiddelcontrole.

Als er wordt afgeweken van de aanvaardbaarheidscriteria voor de test, moeten de gevolgen wat betreft de betrouwbaarheid van de testgegevens in overweging worden genomen en moeten deze overwegingen in de rapportage worden opgenomen.

BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Testkamers

17. Elke glazen, roestvrijstalen of andere chemisch inerte kamer kan worden gebruikt. De grootte van de kamers moet geschikt zijn om aan de hieronder beschreven densiteitscriteria te kunnen voldoen. Het is wenselijk om de testkamers willekeurig in het testgebied te plaatsen. Een willekeurige blokopzet waarin elke concentratie in elk blok aanwezig is, verdient de voorkeur boven een compleet willekeurig ontwerp. De testkamers moeten worden beschermd tegen ongewenste invloeden van buitenaf.

Keuze van de soorten

18. In aanhangsel 2 worden aanbevolen vissoorten opgesomd. De procedures voor het opnemen van nieuwe soorten worden onder punt 2 gegeven.

Leefomstandigheden van de oudervissen

19. Meer informatie over de relatief beste leefomstandigheden voor de oudervissen vindt u in OESO TG 210(1). Oudervissen worden één of twee keer per dag gevoerd met geschikt voer.

Omgaan met embryo's en larven

20. Aanvankelijk kunnen embryo's en larven binnen een hoofdkamer worden onderverdeeld in kleinere glazen of roestvrijstalen kamers die zijn voorzien van gaaswanden of uiteinden waardoor de teststof vrij door de kamer kan stromen. Een niet-turbulente stroming in deze kleine kamers kan worden verkregen door deze aan een arm te hangen die ze op en neer beweegt en tegelijkertijd de organismen onder water houdt.

21. Indien er eihouders, roosters of gaaswerken zijn gebruikt om de eitjes in de hoofdtestkamer op hun plaats te houden, moeten deze worden verwijderd zodra de larven uitkomen. Stukken gaas die voorkomen dat vissen ontsnappen, mogen niet worden verwijderd. Als het nodig is om de larven over te plaatsen, mogen ze niet aan de lucht worden blootgesteld en mogen er geen netten worden gebruikt om vissen uit de eihouders te halen. Het moment van overplaatsing is afhankelijk van de soort. Soms is overplaatsing niet nodig.

▼M6

Water

22. Elk water waarin de testsoort minstens zo goed kan overleven als in het water dat wordt beschreven in aanhangsel 3, is geschikt als testwater. Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door reactie met de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de broedvissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Totale organische koolstof, geleidbaarheid, pH en gesuspendeerde vaste stoffen moeten bijvoorbeeld elke drie maanden gemeten worden als bekend is dat het verdunningswater betrekkelijk constant van kwaliteit is. Zware metalen (bijv. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), belangrijke anionen en kationen (bijv. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$) en pesticiden moeten gemeten worden als het water van twijfelachtige kwaliteit is. Meer informatie over chemische analyse en waterafname is te vinden onder punt 34.

Testoplossingen

23. Indien praktisch mogelijk wordt een doorstroomsysteem gebruikt. Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat een stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt, en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Een stroomsnelheid die overeenkomt met ten minste vijf testkamervolumes per 24 uur is wenselijk (1). Het gebruik van plastic slangen of andere materialen die mogelijk biologisch actieve stoffen bevatten of de teststof kunnen opnemen, moet worden vermeden.

24. De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid zonder oplosmiddelen te gebruiken door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Als de teststof moeilijk in water oplosbaar is, moeten procedures zoals beschreven in de OESO-leidraad over aquatische toxiciteitstesten van moeilijke stoffen en mengsels worden gevolgd (36). Het gebruik van oplosmiddelen dient vermeden te worden, maar kan in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Voorbeelden van geschikte oplosmiddelen worden in (36) gegeven.

25. Semistatische testomstandigheden moeten vermeden worden, tenzij deze gerechtvaardigd worden door dwingende redenen met betrekking tot de teststof (bijv. stabiliteit, beperkte beschikbaarheid, hoge kosten of gevaar). Voor de semistatische techniek kunnen twee verschillende verversingsprocedures worden toegepast. Nieuwe testoplossingen worden bereid in schone kamers en overlevende eitjes en larven worden voorzichtig overgeplaatst in de nieuwe kamers, of de testorganismen worden in de testkamers gehouden terwijl een deel (ten minste twee derde) van het testwater dagelijks wordt ververst.

PROCEDURE

Blootstellingsomstandigheden

Verzamelen van eitjes en duur

26. Om genetische bias te voorkomen, worden eitjes verzameld uit minimaal drie broedparen of groepen, gemengd en willekeurig geselecteerd om aan de test te beginnen. Zie voor de driedoornige stekelbaars de beschrijving van kunstmatige bevruchting in aanhangsel 11. De test begint zo snel mogelijk

▼M6

nadat de eitjes zijn bevrucht, waarbij de embryo's bij voorkeur in de testoplossingen worden ondergedompeld voordat de splitsing van de kiemschijf begint, of zo snel mogelijk na dit stadium en niet later dan 12 uur na bevruchting. De test duurt voort tot de geslachtsdifferentiatie in de controlegroep voltooid is (60 dph voor het Japanse rijstvisje, de driedoornige stekelbaars en de zebravis).

Densiteit

27. Het aantal bevruchte eitjes aan het begin van de test moet ten minste 120 per concentratie zijn, verdeeld tussen minimaal 4 duplo's (de vierkantswortelindeling mag op de controle worden toegepast). De eitjes worden willekeurig verdeeld (met behulp van statistische tabellen voor randomisatie) tussen testgroepen. De densiteit (zie aanhangsel 1 voor de definitie) moet laag genoeg zijn om te zorgen dat een concentratie opgeloste zuurstof van ten minste 60 % van de ASV gehandhaafd kan worden zonder directe beluchting van de kamers. Bij doorstroomtests wordt een densiteit van maximaal 0,5 g/l per 24 uur en maximaal 5 g/l oplossing op een willekeurig moment aanbevolen. Niet later dan 28 dagen na bevruchting moet het aantal vissen per duplo opnieuw worden verdeeld, zodat elke duplo een zo gelijk mogelijk aantal vissen bevat. Als er aan blootstelling gerelateerde sterfte optreedt, moet het aantal duplo's dienovereenkomstig worden verminderd zodat de visdichtheid tussen testniveaus zo gelijk mogelijk wordt gehouden.

Licht en temperatuur

28. De fotoperiode en watertemperatuur moeten geschikt zijn voor de testsoort (zie aanhangsel 2 voor proefomstandigheden voor de FSDT).

Voeding

29. Voedsel en voeding zijn van kritisch belang en het is essentieel dat het juiste voedsel voor elk stadium wordt geleverd met de juiste tussenpozen en in een voldoende mate om normale groei te ondersteunen. Voer dient ad libitum te worden verstrekt met zo min mogelijk overschot. Om een voldoende groeitempo te bereiken, moeten vissen ten minste twee keer per dag worden gevoerd (waarbij eenmaal daags in het weekend wordt aanvaard), met tussenpozen van ten minste drie uur tussen elke voederbeurt. Overmaat aan voer en uitwerpselen moeten voor zover noodzakelijk worden verwijderd om ophoping van afval te vermijden. Naarmate ervaring wordt opgedaan worden voedings- en voerschema's voortdurend verfijnd om de overleving te verbeteren en de groei te optimaliseren. Daarom moet moeite worden gedaan om het voorgestelde schema te laten bevestigen door erkende deskundigen. 24 uur voor het einde van de test moet met voeren worden gestopt. Voorbeelden van geschikt voer worden in aanhangsel 2 opgesomd (zie ook de Fish Testing Framework van de OESO (39)).

Testconcentraties

30. Teststoffen worden gespreid zoals beschreven in aanhangsel 4. Er worden minimaal drie testconcentraties in ten minste vier duplo's gebruikt. Bij het selecteren van de reeks concentraties moet rekening worden gehouden met de curve van LC_{50} tegen blootstellingsperiode tijdens de acute toxiciteitsonderzoeken. Vijf testconcentraties worden aanbevolen als de gegevens worden gebruikt voor risicobeoordeling.

31. Er hoeven geen concentraties van de stof te worden gebruikt die hoger zijn dan de LC_{50} of, indien dit lager is, 10 mg/l. De maximale testconcentratie voor het larve-/juveniele stadium is 10 % van de LC_{50}.

▼M6

Controles

32. Een controle van verdunningswater (≥ 4 duplo's) en, indien van toepassing, een oplosmiddelcontrole (≥ 4 duplo's) worden naast de testconcentraties gebruikt. Bij de test mogen alleen oplosmiddelen worden gebruikt waarvan na onderzoek is vastgesteld dat ze geen statistisch significante invloed op de testeindpunten hebben.

33. Wanneer een oplosmiddel wordt gebruikt, mag de eindconcentratie niet hoger zijn dan 0,1 ml/l (36) en deze moet in alle testkamers dezelfde zijn, behalve in de controle met verdunningswater. Elke inspanning moet echter worden gedaan om het gebruik van een oplosmiddel te vermijden of om de oplosmiddelconcentratie tot een minimum te beperken.

Frequentie van analytische bepalingen en metingen

34. Alvorens de test te starten, wordt een chemische analyse van de teststofconcentratie verricht om te controleren of aan de aanvaardbaarheidscriteria wordt voldaan. Alle duplo's worden aan het begin en eind van de test afzonderlijk geanalyseerd. Eén duplo per testconcentratie wordt tijdens de test ten minste eens per week geanalyseerd, waarbij systematisch tussen de duplo's wordt gewisseld (1,2,3,4,1,2….). Als er monsters worden opgeslagen om later te worden geanalyseerd, moet de opslagmethode van de monsters eerder zijn gevalideerd. De monsters moeten worden gefiltreerd (bijv. met een poriëngrootte van 0,45 μm) of gecentrifugeerd om te garanderen dat de bepalingen worden verricht op de stof in de oplossing.

35. Tijdens de test worden opgeloste zuurstof, pH, totale hardheid, geleidbaarheid, zoutgehalte (indien relevant) en temperatuur in alle testkamers gemeten. Opgeloste zuurstof, zoutgehalte (indien relevant) en temperatuur worden minimaal wekelijks gemeten, en pH, geleidbaarheid en hardheid aan het begin en eind van de test. De temperatuur moet bij voorkeur in ten minste één testkamer continu worden gecontroleerd.

36. De resultaten moeten gebaseerd zijn op gemeten concentraties. Als de concentratie van de teststof in oplossing gedurende de gehele test echter op bevredigende wijze binnen ± 20 % van de nominale concentratie is gehouden, dan kunnen de resultaten worden gebaseerd op de nominale waarden of de gemeten waarden.

Waarnemingen en metingen

Stadium van embryonale ontwikkeling

37. De blootstelling begint zo snel mogelijk na de bevruchting en voordat de splitsing van de kiemschijf begint, en niet later dan 12 uur na de bevruchting om te zorgen voor blootstelling tijdens de vroege embryonale ontwikkeling.

Uitkomen en overleven

38. Minimaal één keer per dag moet uitkomen en overleven worden geobserveerd en de aantallen geregistreerd. Dode embryo's, larven en juveniele vissen moeten direct nadat ze worden opgemerkt, worden verwijderd, omdat ze snel kunnen ontbinden en door de andere vissen afgebroken kunnen worden. Het verwijderen van dode organismen moet zeer voorzichtig gebeuren om aanstoten en beschadigen van naastgelegen eitjes/larven te voorkomen. Deze zijn namelijk uitermate fragiel en gevoelig. De criteria voor „dood” variëren per stadium:

— eitjes: met name in de eerste stadia duidelijk minder doorzichtig en een verandering van kleur als gevolg van coagulatie en/of precipitatie van proteïne, hetgeen resulteert in een wit ondoorschijnend uiterlijk;

▼M6

— larven en juveniele vissen: onbeweeglijkheid en/of geen ademhaling en/of geen hartslag en/of witte ondoorschijnende kleur van het centrale zenuwstelsel en/of geen reactie op een mechanische prikkel.

Afwijkend uiterlijk

39. Het aantal larven of vissen met een afwijkende lichaamsvorm wordt geregistreerd, en het uiterlijk en de aard van de afwijking worden beschreven. Embryo's en larven met een afwijking kunnen van nature voorkomen en bij sommige vissoorten kan het aantal oplopen tot enkele procenten van de controlegroep(en). Dieren met een afwijking mogen alleen uit de testkamers worden verwijderd als ze dood zijn. Volgens Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en van de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt, moeten de dieren, als de afwijkingen leiden tot pijn, lijden en angst of blijvende schade en als de dood betrouwbaar kan worden voorspeld, worden verdoofd en gedood volgens de beschrijving onder punt 44 en voor de gegevensanalyse worden behandeld als sterfte.

Afwijkend gedrag

40. Afwijkingen, zoals hyperventilatie, ongecoördineerd zwemmen, atypische onbeweeglijkheid en atypisch eetgedrag worden bij constatering gerapporteerd.

Gewicht

41. Aan het eind van de test worden alle overlevende vissen gedood (verdoofd als er bloedmonsters moeten worden afgenomen) en wordt het individuele natgewicht (drooggedept) gemeten.

Lengte

42. Aan het eind van de test wordt de individuele lengte (standaardlengte) gemeten.

43. Deze waarnemingen zullen leiden tot enkele van of alle onderstaande gegevens die beschikbaar zijn voor rapportage:

— cumulatieve sterfte;

— aantal gezonde vissen aan het eind van de test;

— tijd tot begin van uitkomen en einde van uitkomen;

— lengte en gewicht van overlevende dieren;

— aantal misvormde larven;

— aantal vissen dat afwijkend gedrag vertoont.

Bemonstering van vissen

44. Bemonstering van vissen wordt bij beëindiging van de test verricht. Vissen waarbij bemonstering wordt verricht, worden gedood met bijv. MS-222 (100-500 mg per l, gebufferd met 200 mg $NaHCO_3$ per l) of FA-100 (4-allyl-2-methoxyfenol: eugenol) en individueel gemeten en gewogen als natgewicht (drooggedept), of verdoofd als er een bloedmonster moet worden genomen (zie punt 49).

Bemonstering voor VTG-analyse en geslachtsbepaling via histologische evaluatie

45. Alle vissen worden bemonsterd en voorbereid voor analyse van het geslacht en VTG. Alle vissen worden histologisch geanalyseerd om het geslacht te

▼M6

bepalen. Voor de VTG-metingen wordt een deelsteekproef van ten minste 16 vissen uit elke duplo aanvaard. Er moeten meer vissen op VTG worden geanalyseerd als de resultaten van de deelsteekproef onduidelijk blijken.

46. De bemonsteringsprocedure voor VTG en geslachtsbepaling hangt af van de VTG-analysemethoden:

Kop-/staarthomogenaat-methode voor VTG-analyse

47. De vis wordt gedood. Kop en staart van elke vis worden van het lichaam van de vis gescheiden door middel van sneden net achter de borstvinnen en net achter de rugvin, met behulp van een scalpel (zie figuur 1). De kop- en staartdelen van elke vis worden samengevoegd, gewogen en afzonderlijk genummerd, in vloeibare stikstof ingevroren en bewaard bij – 70 °C of kouder voor VTG-analyse. Het lichaamsdeel van de vis wordt genummerd en gefixeerd in een geschikt fixeermiddel voor histologische evaluatie (22). Via deze methode worden VTG en histopathologie geëvalueerd voor elk individu en kan derhalve een mogelijke verandering in het VTG-niveau worden gerelateerd aan het fenotypische geslacht van de vis of het genetische geslacht (het Japanse rijstvisje en de driedoornige stekelbaars) van de vis. Zie voor meer informatie het richtsnoer voor homogenisatie (aanhangsel 5) en het richtsnoer voor VTG-kwantificering (aanhangsel 6).

Leverhomogenaat-methode voor VTG-analyse

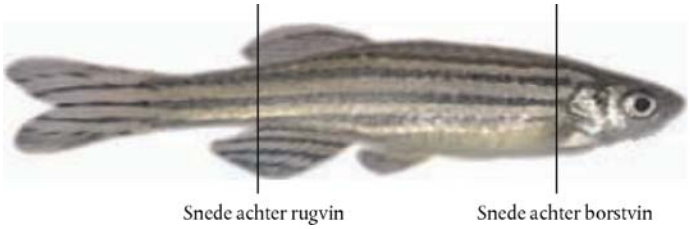
48. De vis wordt gedood. De lever wordt uitgesneden en bewaard bij – 70 °C of kouder. Aanbevolen procedures voor het uitsnijden van de lever en voorbehandeling zijn te vinden in OESO TG 229 (37) of hoofdstuk C.37 van dit aanhangsel (38). De levers worden daarna individueel gehomogeniseerd zoals beschreven in OESO TG 229 of hoofdstuk C.37 van dit aanhangsel. Het verzamelde supernatans wordt gebruikt voor het meten van VTG met behulp van een homologe ELISA-techniek (zie aanhangsel 6 voor een voorbeeld van kwantificering bij de zebravis of OESO TG 229 (37) voor het Japanse rijstvisje). Volgens deze benadering is het ook mogelijk om gegevens van afzonderlijke vissen over zowel VTG als histologie van de geslachtsklieren te verkrijgen.

Bloedplasmamethode voor VTG-analyse

49. Bloed wordt uit de verdoofde vis afgenomen door middel van hartpunctie, snede in de caudale ader of staart, en bij 4 °C gecentrifugeerd voor verzameling van plasma. Het plasma wordt bewaard bij – 70 °C of kouder tot gebruik. De hele vis wordt gedood en gefixeerd voor histologie. Zowel plasmamonsters als vissen worden individueel genummerd om de VTG-niveaus aan het geslacht van de vis te kunnen relateren.

Figuur 1

Het snijden van een vis voor VTG-meting in kop-/staarthomogenaat en histologische evaluatie van het middendeel



▼M6

Bepaling van het genetische geslacht

50. Een biologisch monster voor de bepaling van het genetische geslacht wordt bij afzonderlijke vissen afgenomen bij soorten met geschikte markers. Bij het Japanse rijstvisje wordt de anaalvin of rugvin afgenomen. Een uitvoerige beschrijving wordt gegeven in aanhangsel 9, waarin ook weefselbemonstering en geslachtsbepaling aan de hand van een PCR-methode aan de orde komen. In aanhangsel 10 worden weefselbemonstering en geslachtsbepaling aan de hand van een PCR-methode voor de driedoornige stekelbaars beschreven.

VTG-meting

51. De meting van VTG moet gebaseerd zijn op een kwantitatieve en analytisch gevalideerde methode. Er moet informatie beschikbaar zijn over de variabiliteit tussen en binnen testen van de gebruikte methode in een laboratorium. De bron van de variabiliteit tussen en binnen laboratoria is (hoogstwaarschijnlijk) gebaseerd op de verschillende ontwikkelingsstadia van de vispopulatie. Gezien de variabiliteit van VTG-meting, moeten NOEC's op basis van dit eindpunt met grote zorgvuldigheid worden behandeld. Er zijn verschillende methoden beschikbaar om de aanmaak van VTG in de voor deze test relevante vissoorten te beoordelen. Een relatief gevoelige en specifieke meettechniek is de bepaling van eiwitconcentraties aan de hand van een enzymgekoppelde immunosorbent-assay (ELISA). Er moeten homologe antilichamen (opgewekt tegen VTG van dezelfde soort) en de belangrijkste homologe standaarden worden gebruikt.

Geslachtsbepaling

52. Afhankelijk van de VTG-bemonsteringsprocedure wordt de hele vis of het resterende middendeel van de vis in een vooraf geëtiketteerde verwerkingscassette geplaatst en gefixeerd in een geschikt fixeermiddel voor histologische geslachtsbepaling (eventueel ook voor stadiumbepaling van de geslachtsklieren). Richtsnoeren over fixatie en inbedding zijn te vinden in aanhangsel 7 en in de OESO-leidraad „Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (22). Na verwerking wordt de vis ingebed in paraffineblokken. De afzonderlijke vissen worden in de lengte in het paraffineblok geplaatst. Uit elk organisme worden ten minste zes lengtecoupes (3-5 μm dik) genomen in een frontaal vlak inclusief geslachtsklierweefsel uit beide geslachtsklieren. De ruimte tussen deze coupes is ongeveer 50 μm voor mannetjes en 250 μm voor vrouwtjes. Maar omdat elk blok vaak zowel mannetjes als vrouwtjes bevat (als er meer dan één organisme in elk blok ingebed wordt), moet de ruimte tussen coupes uit deze blokken ongeveer 50 μm zijn totdat er ten minste zes coupes van de geslachtsklieren uit elk mannetje worden verkregen. Daarna kan de ruimte tussen coupes worden vergroot tot ongeveer 250 μm voor de vrouwtjes. De coupes worden daarna gekleurd met hematoxyline en eosine, en met een lichtmicroscoop onderzocht op geslacht (mannelijk, vrouwelijk, interseksueel of ongedifferentieerd). Interseksueel wordt gedefinieerd als de aanwezigheid van meer dan één oöcyt in testis per zes geanalyseerde coupes of spermatogenetische cellen (ja/nee) in eierstokken. Histopathologie en stadiumbepaling van eierstokken en testis is optioneel, maar als hieraan onderzoek wordt verricht moeten de resultaten statistisch geanalyseerd en gerapporteerd worden. Opgemerkt moet worden dat bij sommige vissoorten van nature een volledig ontwikkeld paar geslachtsklieren ontbreekt en er mogelijk slechts één geslachtsklier aanwezig is (bijv. bij het Japanse rijstvisje en soms bij de zebravis). Al dit soort waarnemingen moet worden gerapporteerd.

53. De genetische geslachtsbepaling van afzonderlijke Japanse rijstvisjes is gebaseerd op de aanwezigheid of afwezigheid van het mannelijk-geslachtsbepalende gen, DMY, dat zich op het Y-chromosoom bevindt. Het genotypische geslacht van het rijstvisje kan vastgesteld worden door sequencing

▼M6

van het DMY-gen uit DNA dat verkregen is uit bijvoorbeeld een stuk aars- of rugvin. De aanwezigheid van DMY wijst ongeacht het fenotype op een XY-individu (mannetje), terwijl de afwezigheid van DMY ongeacht het fenotype wijst op een XX-individu (vrouwtje) (23). In aanhangsel 9 wordt een richtsnoer gegeven voor het prepareren van weefsel en de PCR-methode. De genetische geslachtsbepaling van afzonderlijke driedoornige stekelbaarzen wordt ook aan de hand van een PCR-methode uitgevoerd, zoals beschreven in aanhangsel 10.

54. Het aantreffen van interseksuele dieren (zie aanhangsel 1 voor de definitie) moet worden gerapporteerd.

Secundaire geslachtskenmerken

55. Secundaire geslachtskenmerken staan bij soorten zoals het Japanse rijstvisje onder endocriene controle. Daarom worden waarnemingen van het fysieke voorkomen van de vissen indien mogelijk aan het einde van de blootstelling gedaan. Bij het Japanse rijstvisje is de vorming van papillen op het achtereinde van de anaalvin bij vrouwtjes gevoelig voor androgenen. In hoofdstuk C.37 van dit aanhangsel (38) staan relevante foto's van mannelijke secundaire geslachtskenmerken en geandrogeniseerde vrouwtjes.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Bewerking van de resultaten

56. Het is van belang dat de sterkste geldige statistische test het eindpunt bepaalt. De duplo is de experimentele eenheid, maar variabiliteit tussen duplo's moet in de statistische toetsing opgenomen worden. In aanhangsel 8 staat een beslisboom om te helpen de meest geschikte statistische test te kiezen op basis van het kenmerk van de uit de test verkregen gegevens. Het statistische significantieniveau is voor alle eindpunten 0,05.

Geslachtsverhoudingen en genetisch geslacht

57. De geslachtsverhoudingen worden geanalyseerd op significant effect (NOEC/LOEC-benadering) van blootstelling volgens Jonckheere-Terpstra (trendtoets) als er een monotone dosisrespons bestaat. Als er niet-monotoniciteit wordt gevonden, dan wordt een paarsgewijze toets toegepast: Gebruik de Dunnett-toets als er normaliteit en homogene variantie kan worden verkregen. Gebruik Tamhane-Dunnett als er heterogene variantie aanwezig is. Gebruik anders de exacte Mann-Whitney-toets met Bonferroni-Holm-correctie. In aanhangsel 8 staat een stroomdiagram dat de statistieken van de geslachtsverhoudingen beschrijft. De geslachtsverhoudingen worden gepresenteerd in tabellen als concentratieverhoudingen ± SD van mannelijke, vrouwelijke, interseksuele en ongedifferentieerde organismen. Statistische significantie wordt gemarkeerd. Voorbeelden worden beschreven in het FSDT Phase 2 validatierapport (42). Het genetische geslacht wordt gerapporteerd als percentage van fenotypische geslachtsomkering van mannelijke, vrouwelijke, interseksuele en ongedifferentieerde organismen.

VTG-concentraties

58. VTG-concentraties worden geanalyseerd op significant effect (NOEC/LOEC-benadering) van blootstelling. De Dunnett-toets wordt verkozen boven de t-toets met Bonferroni-correctie. Als er een Bonferroni-correctie wordt gebruikt, verdient de Bonferroni-Holm-correctie de voorkeur. Er moet voorzien worden in log-transformatie van VTG om normaliteit en homogeniteit van variantie te bereiken. Als de concentratie-respons overeenkomt met monotoniciteit, dan verdient de Jonckheere-Terpstra-toets de voorkeur boven elk van bovenstaande. Als de t-toets of Dunnett-toets wordt gebruikt, is er geen ANOVA significantie-F-toets nodig om verder te gaan.

▼M6

Zie het stroomdiagram in aanhangsel 8 voor details. De resultaten worden gerapporteerd in tabellen als concentratiegemiddelden ± SD afzonderlijk voor mannelijke, vrouwelijke, interseksuele en ongedifferentieerde organismen. Statistische significantie voor fenotypische vrouwtjes en fenotypische mannetjes wordt gemarkeerd. Voorbeelden worden beschreven in het FSDT Phase 2 validatierapport (42).

Teststof: feitelijke concentraties

59. De feitelijke concentraties van de teststof in de kamer worden geanalyseerd in de onder punt 34 beschreven frequenties. De resultaten worden gerapporteerd in tabellen als gemiddelde concentratie ± SD op basis van duplo en op basis van concentratie, met informatie over het aantal monsters en met gemarkeerde uitschieters van de gemiddelde testconcentratie ± 20 %. Voorbeelden worden beschreven in het FSDT Phase 2 validatierapport (42).

Interpretatie van resultaten

60. De testresultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten concentraties van de teststof in testoplossingen dicht bij de detectiegrens van de analysemethode liggen.

Testverslag

61. In het testverslag moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

Teststof

— Relevante fysisch-chemische kenmerken; chemische identificatiegegevens met inbegrip van de zuiverheid en de analysemethode voor het bepalen van de teststof.

Testomstandigheden

— Toegepaste testprocedure (bijv. doorstroom semistatisch/verversing); testopzet, inclusief testconcentraties, bereidingsmethode van stamoplossingen (in een bijlage), verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moet de concentratie daarvan worden vermeld);

— Nominale testconcentraties, de gemiddelden van de in de testkamers gemeten waarden en de standaardafwijkingen en de methode waarmee zij zijn bepaald (de gebruikte analysemethode wordt in een bijlage beschreven); gegevens waaruit blijkt dat de resultaten van de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in de oplossing;

— Waterkwaliteit in de testkamers: pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof;

— Gedetailleerde informatie over de voeding (bijv. type voedsel, leverancier, het rantsoen en de frequentie, en analyses van verontreinigingen (bijv. PCB's, PAK's en organochloor-pesticiden), indien relevant).

Resultaten

— Gegevens waaruit blijkt dat de controlegroepen voldeden aan de validiteitscriteria: gegevens over het uitkomstpercentage worden gepresenteerd in tabellen als percentage per duplo en per concentratie. Uitschieters van de aanvaardingscriteria (in controlegroepen) worden gemarkeerd. Overleving wordt gepresenteerd als percentage per duplo en per concentratie. Uitschieters van de aanvaardingscriteria (in controlegroepen) worden gemarkeerd;

— Duidelijke indicatie van de verkregen resultaten over de verschillende waargenomen eindpunten: embryonale overleving en uitkomen eitjes; uitwendige afwijkingen; lengte en gewicht; VTG-metingen (ng/g homogenaat, ng/ml plasma of ng/mg lever); histologie van de geslachtsklieren,

▼M6

geslachtsverhouding, gegevens over het genetische geslacht; incidentie van eventuele ongewone reacties van de vissen en eventuele door de teststof veroorzaakte zichtbare effecten.

62. De resultaten worden weergegeven als gemiddelde waarden ± standaardafwijking (SD) of standaardfout (SE). De statistieken worden gerapporteerd als minimaal NOEC en LOEC en betrouwbaarheidsintervallen. Het statistische stroomdiagram (aanhangsel 8) wordt gevolgd.

LITERATUUR

(1) OESO (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OESO, Parijs.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", Environmental Toxicology and Chemistry 15, blz. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", Environmental Health Perspectives 103, blz. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and 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, blz. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and 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, blz. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters", Fish Physiology and Biochemistry 28, blz. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", Aquatic Toxicology 65, blz. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", Environmental Toxicology and Chemistry 21, blz. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and 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, blz. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), „Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, blz. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and 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, blz. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and 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, blz. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, blz. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", Journal of Health Science 50, blz. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology", 78, blz. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Ecotoxicology and Environmental Safety 64, blz. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and 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*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, blz. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, blz. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and 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, blz. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3", blz. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio", Environmental Toxicology and Chemistry 24, blz. 1088-1098.

(22) OESO (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, OESO, Parijs.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes", Developmental Dynamics 231, blz. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations", Zoological Science 21, blz. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and 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, blz. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and 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, blz. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and 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, blz. 279-290.

▼M6

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, blz. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and 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, blz. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", Aquatic Toxicology 98, blz. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)", Aquatic Toxicology 63, blz. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and 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, blz. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, blz. 165-170.

(34) Hoofdstuk C.14 van deze bijlage, Groeitest onvolwassen vissen.

(35) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage, Gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.

(36) OESO (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OESO, Parijs.

(37) OESO (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OESO, Parijs.

(38) Hoofdstuk C.37 van deze bijlage, 21-Day Fish Assay: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.

(39) OESO (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OESO, Parijs

(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-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OESO (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OESO, Parijs.

(42) OESO (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OESO, Parijs.

(43) OESO (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, OESO, Parijs.

(44) Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33.

▼M6

Aanhangsel 1

Afkortingen en definities

Apicaal eindpunt: causaal effect op populatieniveau

ASV: verzadigingswaarde van lucht

Biomarker: causaal effect op individueel niveau

Densiteit: natgewicht aan vis per volume water

Dph: dagen na uitkomen

DMY: Y-specifiek DM-domein-gen dat nodig is voor mannelijke ontwikkeling bij het Japanse rijstvisje

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FSDT: geslachtelijke-ontwikkelingstest met vissen

HPG-as: hypothalamus-hypofyse-gonaden-as

Interseksuele vis: vis met meer dan één oöcyt in testis per zes geanalyseerde coupes of spermatogenetische cellen in eierstokken (ja/nee)

MOA: werkingsmechanisme

Ongedifferentieerde vis: vis met geslachtsklieren zonder waarneembare kiemcellen.

RT-PCR: reverse-transcriptase-polymerasekettingreactie

Stof: een stof of mengsel.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Visgewicht: Natgewicht vis (drooggedept)

VTG: vitellogenine

▼M6

Aanhangsel 2

Testomstandigheden voor de FSDT (zoetwatersoorten)

1. Aanbevolen soort	Japanse rijstvisje (*Oryzias latipes*)	Zebravis (*Danio rerio*)	Driedoornige stekelbaars (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Testtype	Doorstroom of semistatisch	Doorstroom of semistatisch	Doorstroom of semistatisch
3. Watertemperatuur	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Belichtingskwaliteit	Fluorescente lampen (breed spectrum)	Fluorescente lampen (breed spectrum)	Fluorescente lampen (breed spectrum)
5. Lichtsterkte	10-20 µE/m^2/s, 540-1 080 lux of 50-100 ft-c (omgevingsniveau in laboratorium)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 080 lux of 50-100 ft-c (omgevingsniveau in laboratorium)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 080 lux of 50-100 ft-c (omgevingsniveau in laboratorium)
6. Fotoperiode	12-16 h licht, 8-12 h donker	12-16 h licht, 8-12 h donker	16 h licht, 8 h donker
7. Minimale kamergrootte	Afzonderlijke kamers moeten minimaal 7 l water bevatten	Afzonderlijke kamers moeten minimaal 7 l water bevatten	Afzonderlijke kamers moeten minimaal 7 l water bevatten
8. Volumewisselingen van testoplossingen	Minimaal 5 per dag	Minimaal 5 per dag	Minimaal 5 per dag
9. Leeftijd van testorganisme aan het begin van blootstelling	Net bevruchte eitjes (vroeg blastulastadium)	Net bevruchte eitjes (vroeg blastulastadium)	Net bevruchte eitjes
10. Aantal eitjes per behandeling	Ten minste 120	Ten minste 120	Ten minste 120
11. Aantal behandelingen	Minimaal 3 (plus afdoende controles)	Minimaal 3 (plus afdoende controles)	Minimaal 3 (plus afdoende controles)
12. Aantal duplo's per behandeling	Minimaal 4 (tenzij de vierkantswortelindeling op de controles wordt toegepast)	Minimaal 4 (tenzij de vierkantswortelindeling op de controles wordt toegepast)	Minimaal 4 (tenzij de vierkantswortelindeling op de controles wordt toegepast)
13. Voerschema	Levende *Artemia*, bevroren volwassen pekelkreeftjes, voervlokken enz. Het wordt aanbevolen om twee keer per dag te voeren	Speciaal voer voor jonge vissen, levende *Artemia*, bevroren volwassen pekelkreeftjes, voervlokken enz. Het wordt aanbevolen om twee keer per dag te voeren	Levende *Artemia*, bevroren volwassen pekelkreeftjes, voervlokken enz. Het wordt aanbevolen om twee keer per dag te voeren
14. Beluchting	Geen, tenzij de concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % verzadiging daalt	Geen, tenzij de concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % verzadiging daalt	Geen, tenzij de concentratie opgeloste zuurstof onder 70 % verzadiging daalt

▼**M6**

15. Verdunningswater	Schoon oppervlaktewater, bronwater of synthetisch water	Schoon oppervlaktewater, bronwater of synthetisch water	Schoon oppervlaktewater, bronwater of synthetisch water
16. Duur van blootstelling aan teststof	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biologische eindpunten	Uitkomen eitjes, overleving, macroscopische morfologie, VTG,histologie van geslachtsklieren, genetisch geslacht,geslachtsverhouding	Uitkomen eitjes, overleving,macroscopische morfologie, VTG,histologie van geslachtsklieren, geslachtsverhouding	Uitkomen eitjes, overleving,macroscopische morfologie, VTG,histologie van geslachtsklieren, geslachtsverhouding
18. Aanvaardbaarheidscriteria van de test voor samengevoegde duplo's van controles	Uitkomen eitjes > 80 %	Uitkomen eitjes > 80 %	Uitkomen eitjes > 80 %
	Overleving na uitkomen ≥ 70 %	Overleving na uitkomen eitjes ≥ 70 %	Overleving na uitkomen eitjes ≥ 70 %
	groei (natgewicht vis, drooggedept) > 150 mg	groei (natgewicht vis, drooggedept) > 75 mg	groei (natgewicht vis, drooggedept) > 120 mg
	Lengte (standaardlengte) > 20 mm	Lengte (standaardlengte) > 14 mm	Lengte (standaardlengte) > 20 mm
	Geslachtsverhouding (% mannetjes of vrouwtjes) 30 %-70 %	Geslachtsverhouding (% mannetjes of vrouwtjes) 30 %-70 %	Geslachtsverhouding (% mannetjes of vrouwtjes) 30 %-70 %

▼**M6**

Aanhangsel 3

Chemische kenmeken van aanvaardbaar verdunningswater

BESTANDDEEL	CONCENTRATIE
Deeltjes	< 20 mg/l
Totale hoeveelheid organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonium	< 1 ug/l
Chloorresiduen	< 10 µg/l
Totale hoeveelheid organofosfaat-bestrijdingsmiddelen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organochloor-bestrijdingsmiddelen plus polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

▼**M6**

Aanhangsel 4

Uit testmethode C.14/Richtsnoer voor testconcentraties

Kolom (aantal concentraties tussen 100 en 10 of tussen 10 en 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

(*) Uit de kolom kan een reeks van drie (of meer) opeenvolgende concentraties worden gekozen. De klassemiddenwaarden tussen de concentraties in kolom (x) worden verkregen uit kolom (2x + 1). De waarden in de tabel staan voor concentraties uitgedrukt in percentage per volume of in gewicht (mg/l of µg/l). De waarden kunnen waar nodig worden vermenigvuldigd met of gedeeld door elke tiende macht. Kolom 1 kan worden gebruikt als er veel onduidelijkheid bestaat over het toxiciteitsniveau.

▼M6

Aanhangsel 5

Richtsnoer voor homogenisering van kop en staart van de juveniele zebravis, de dikkop-elrits, de driedoornige stekelbaars en het Japanse rijstvisje

Het doel van dit onderdeel is het beschrijven van de procedures die plaatsvinden voordat de VTG-concentratie wordt bepaald. Er kunnen ook andere procedures worden gebruikt die een vergelijkbare kwantificering van VTG opleveren. Het is een optie om de VTG-concentratie in bloedplasma of de lever te bepalen in plaats van in kop-/staarthomogenaat.

Procedure

1. De vissen worden volgens de testbeschrijving verdoofd en gedood.

2. De kop en staart worden volgens de testbeschrijving van de vis afgesneden. **Belangrijk**: Alle instrumenten voor ontleding en het snijbord moeten tussen het verwerken van elke vis goed gespoeld en gereinigd worden (bijv. met 96 % ethanol), om „VTG-verontreiniging" vanuit vrouwtjes of geïnduceerde mannetjes naar niet-geïnduceerde mannetjes te voorkomen.

3. Het gewicht van de samengevoegde kop en staart van elke vis wordt op het dichtstbijzijnde mg afgerond.

4. Na het wegen worden de delen in geschikte buizen geplaatst (bijv. 1,5 ml eppendorf) en bij – 80 °C ingevroren tot homogenisatie, of direct gehomogeniseerd op ijs met twee plastic stampers. (Er kunnen andere methoden worden gebruikt mits ze op ijs worden uitgevoerd en het resultaat een homogene massa is). **Belangrijk**: *De buizen moeten goed worden genummerd zodat de kop en staart van de vis gerelateerd kunnen worden aan het overeenkomstige rompdeel dat voor histologie van de geslachtsklieren wordt gebruikt.*

5. Als een homogene massa is bereikt, wordt een hoeveelheid van 4-10 maal het weefselgewicht aan ijskoude **homogenisatiebuffer** (*) toegevoegd (noteer de verdunning). Blijf met de stampers werken tot het mengsel homogeen is. **Belangrijke opmerking**: *Voor elke vis worden nieuwe stampers gebruikt.*

6. De monsters worden op ijs bewaard tot ze worden gecentrifugeerd bij **4 °C** bij 50 000 g gedurende 30 minuten.

7. Verdeel met een pipet porties van 20 tot 50 µl (noteer de hoeveelheid) supernatans in **ten minste twee** buizen door de punt van de pipet onder de vetlaag op het oppervlak te dopen en voorzichtig het supernatans zonder vet of pellet op te zuigen.

8. De buizen worden tot gebruik bewaard bij – 80 °C.

(*) *Homogenisatiebuffer:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaseremmercocktail (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaseremmercocktail (of gelijkwaardige proteaseremmercocktails).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteaseremmercocktail: Van Sigma (voor zoogdierweefsel) Productnummer **P 8340**.

Opmerking: De homogenisatiebuffer moet op de dag van bereiding gebruikt worden. Tijdens gebruik op ijs zetten.

▼M6

Aanhangsel 6

Richtsnoer voor kwantificering van vitellogenine uit kop- en staarthomogenaat van de zebravis (*Danio rerio*) (aangepast uit Holbech et al., 2001). er kunnen andere procedures, gebruikmakend van homologe antilichamen en standaarden worden gebruikt

1. Microtiterplaten (gecertificeerd Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denemarken) van tevoren gecoat met 5 µg/ml anti-zebravis-lipovitelline-IgG worden ontdooid en 3 keer gewassen met wasbuffer (*).

2. Gezuiverde zebravis-vitellogeninestandaard ([1]) wordt serieel verdund tot 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 en 20 ng/ml in verdunningsbuffer (**) en monsters worden ten minste 200 keer verdund (om matrixeffect te voorkomen) in verdunningsbuffer en op de platen aangebracht. Een assaycontrole wordt in duplo aangebracht. In elke well wordt 150 µl aangebracht. Standaarden worden in duplo aangebracht en monsters in triplo. Incubeer een nacht bij 4 °C op een schudder.

3. De platen worden 5 keer gewassen met wasbuffer (*)

4. HRP gekoppeld aan een dextraanketen (bijv. AMDEX A/S, Denemarken) en geconjugeerde antilichamen worden verdund in wasbuffer. Feitelijke verdunning verschilt per batch en leeftijd. 150 µl wordt in elke well aangebracht en de platen worden 1 uur bij kamertemperatuur op een schudder geïncubeerd.

5. De platen worden 5 keer gewassen met wasbuffer (*) en de bodem van de platen wordt voorzichtig met ethanol gereinigd.

6. In elke well wordt 150 µl TMB plus (***) aangebracht. Bescherm de plaat met aluminiumfolie tegen licht en bekijk de kleurontwikkeling op een schudder.

7. Als de standaardcurve volledig is ontwikkeld, wordt de enzymactiviteit gestopt door toevoeging van 150 µl 0,2 M H_2SO_4 aan elke well.

8. De absorbantie wordt bij 450 nm gemeten (bijv. op een Thermomax plaatlezer van Molecular Devices). De gegevens worden geanalyseerd op de bijbehorende software (bijv. Softmax).

(*) Wasbuffer:

PBS-stam (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

pH instellen op 7,3 en aanvullen tot 5 l met millipore H_2O. Bewaren bij 4 °C.

(**) Verdunningsbuffer:

PBS-stam (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

pH instellen op 7,3 en aanvullen tot 1 l met millipore H_2O. Bewaren bij 4 °C.

(***) TMB plus is een „gebruiksklaar” substraat dat geproduceerd wordt door KemEnTec (Denemarken). Het is gevoelig voor licht. Bewaren bij 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), gezuiverd volgens: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenine as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) PBS-stamoplossing

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

pH instellen op 6,8 en aanvullen tot 2 l met millipore H_2O. Bewaren bij kamertemperatuur.

▼M6

Aanhangsel 7

Richtsnoer voor de bereiding van weefselcoupes voor geslachtsbepaling en stadiumbepaling van de geslachtsklieren

Het doel van dit aanhangsel is het beschrijven van de procedures die voorafgaan aan de evaluatie van histologische coupes. Er kunnen ook andere procedures gevolgd worden die leiden tot vergelijkbare geslachtsbepaling en stadiumbepaling van de geslachtsklieren.

Afgezien van enkele verschillen zijn deze procedures vergelijkbaar voor het Japanse rijstvisje (JMD) en de zebravis (ZF).

Euthanasie, necropsie en weefselfixatie

Doelstellingen:

1. Zorgen dat de vissen op humane wijze geëuthanaseerd worden.

2. Verkrijgen van noodzakelijke lichaamsgewichten en -metingen.

3. Evalueren van secundaire geslachtskenmerken.

4. Ontleden van weefsels voor VTG-analyse.

5. Fixatie van de geslachtsklieren.

Procedures:

1. Vissen worden onmiddellijk voorafgaand aan necropsie gedood. Daarom worden er niet meerdere vissen tegelijk gedood, tenzij er meerdere prosectoren beschikbaar zijn.

2. Een vis wordt met behulp van een schepnetje uit de testkamer verwijderd en in de transporthouder naar de necropsieruimte gebracht.

3. De vis wordt in de euthanasieoplossing gelegd. De vis wordt uit de oplossing gehaald als hij niet meer ademt en niet meer reageert op externe prikkels.

4. De vis wordt nat gewogen.

5. Voor de bereiding van weefsels voor VTG-analyse kan de vis op een kurkplaat op het platform van een ontledingsmicroscoop worden gelegd.

   a. Voor de zebravis wordt de kop net achter de borstvin afgesneden en wordt de staart net achter de rugvin afgesneden.

   b. Voor het Japanse rijstvisje wordt de buikholte geopend via een zorgvuldige incisie langs de ventrale middellijn, van de pectorale gordel tot een punt net craniaal van de anus. De lever wordt met behulp van een kleine tang en kleine schaar voorzichtig verwijderd.

6. Monsters voor VT-analyse worden in eppendorfbuizen geplaatst en onmiddellijk ingevroren in vloeibare stikstof.

7. Het karkas, inclusief de geslachtsklieren, wordt in een vooraf geëtiketteerde plastic weefselcassette geplaatst en in Davidson- of Bouin-fixeermiddel overgebracht. Het volume aan fixeermiddel is ten minste 10 maal het geschatte volume van de weefsels. De fixeermiddelhouder wordt vijf seconden zacht geschud om luchtbellen uit de cassette te verwijderen.

8. a. Alle weefsels blijven een nacht in Davidson-fixeermiddel, waarna ze de volgende dag worden overgebracht in afzonderlijke houders met 10 % neutraal gebufferde formaline. De houders met cassettes worden 5 seconden zacht geschud om te zorgen dat de formaline afdoende in de cassettes doordringt.

▼M6

b. De weefsels blijven 24 uur in Bouin-fixeermiddel en worden daarna overgebracht in 70 % ethanol.

Verwerking van weefsel

Doelstellingen:

1. Weefsel uitdrogen voor afdoende doordringing van paraffine.

2. Impregneren van het weefsel met paraffine om de integriteit van het weefsel te behouden en een stevig oppervlak voor microtomie te verkrijgen.

Procedures:

3. Geëtiketteerde weefselcassettes worden uit de formaline/ethanol-opslag gehaald en in de verwerkingsmand(en) geplaatst. De verwerkingsmand wordt in de weefselverwerker gezet.

4. Het verwerkingsschema wordt gekozen.

5. Nadat de weefselverwerker de verwerkingscyclus heeft voltooid, kan/kunnen de mand(en) naar het inbeddingsstation worden overgebracht.

Inbedding

Doelstelling:

Het monster naar behoren in vaste paraffine oriënteren voor microtomie.

Procedures:

1. De mand(en) van cassettes wordt/worden uit de verwerker gehaald en ondergedompeld in de met paraffine gevulde voorste kamer van de thermische console van het inbeddingsstation, of de cassettes worden verplaatst naar een aparte paraffineverwarmer.

2. De eerste in te bedden cassette wordt uit de voorste kamer van de thermische console of de paraffineverwarmer gehaald. Het deksel van de cassette wordt verwijderd en weggegooid, en het etiket van de cassette wordt vergeleken met de diergegevens om mogelijke discrepanties voorafgaand aan inbedding te voorkomen.

3. Er wordt een inbeddingsvorm van de juiste afmetingen gekozen.

4. De vorm wordt onder de tuit van de dispenserconsole gehouden en gevuld met gesmolten paraffine.

5. Het monster wordt uit de cassette gehaald en in de gesmolten paraffine in de vorm geplaatst. Dit wordt voor elke paraffinevorm met 4-8 monsters herhaald. De positie van individuele vissen wordt gemarkeerd door vis nr. 1 180 graden ten opzichte van vissen 2-4/8 te plaatsen.

6. Er wordt extra paraffine toegevoegd om het monster te bedekken.

7. De vorm met de cassettebasis wordt op de koelplaat van de cryoconsole gezet.

8. Nadat de paraffine gestold is, wordt het blok (d.w.z. de uitgeharde paraffine met daarin de weefsels en de cassettebasis) van de vorm verwijderd.

Microtomie

Doelstelling:

Snijden en monteren van histologische coupes voor kleuring.

Procedures:

1. De eerste fase van microtomie, genaamd „facing”, wordt als volgt uitgevoerd:

   a. Het paraffineblok wordt in de klem van de microtoom gezet.

   b. De klem wordt naar voren bewogen door aan het wiel van de microtoom te draaien. Dikke coupes worden van het paraffineoppervlak gesneden totdat het mes de ingebedde weefsels bereikt.

▼M6

c. De coupedikte wordt op de microtoom ingesteld op 3 tot 5 micron. De klem wordt naar voren bewogen en er worden meerdere coupes van het blok gesneden om eventuele artefacten te verwijderen die op het snijoppervlak van het weefsel kunnen zijn ontstaan door ruw afsnijden.

d. Het blok kan uit de klem worden gehaald en met het snijvlak naar beneden op ijs worden gelegd om het weefsel te weken.

2. De volgende fase van de microtomie is het uiteindelijke snijden en aanbrengen van de weefselcoupes op objectglaasjes. Deze procedures worden als volgt uitgevoerd:

a. Als het blok op ijs is gelegd, kan het blok uit het ijs worden gehaald en weer in de klem van de microtoom worden gelegd.

b. Met een op de microtoom ingestelde coupedikte van 3 tot 5 micron wordt de klem naar voren bewogen door aan het wiel van de microtoom te draaien. Coupes worden van het blok afgesneden totdat er een „lint" met daarin ten minste één aanvaardbare coupe, waaronder de geslachtsklieren, is gemaakt. (Indien nodig kan het blok tijdens het snijden uit de klem worden gehaald, op ijs worden gelegd om het weefsel te weken, en weer in de klem worden teruggezet).

c. De coupes worden plat op het wateroppervlak van het waterbad gelegd. Er wordt geprobeerd om ten minste één coupe te krijgen zonder rimpels of ingevangen luchtbellen.

d. Onder de beste coupe wordt een objectglaasje ondergedompeld, en met behulp van het objectglaasje uit het water gehaald. Dit proces wordt het „monteren" van de coupe op het objectglaasje genoemd.

e. Voor een reeks vissen worden drie coupes geprepareerd. De tweede en derde coupes worden met een tussenruimte van 50 micron na de eerste coupe genomen. Als de vissen niet met hun geslachtsklieren op dezelfde snijniveau zijn ingebed, worden meer coupes gemaakt om te garanderen dat ten minste zes coupes met de geslachtsklieren van elke vis worden verkregen.

f. Het bloknummer waaruit de coupe is gemaakt wordt met een merkstift op het objectglaasje genoteerd.

g. Het objectglaasje wordt in een rek voor kleuring gezet.

h. Het blok wordt uit de klem gehaald en met het snijvlak naar beneden geplaatst voor opslag.

Kleuren, dekglaasje aanbrengen en etiketteren van het glaasje

Doelstellingen:

— Kleuren van de coupes voor histopathologisch onderzoek

— Permanent afdekken van gemonteerde en gekleurde weefsels

— Permanent identificeren van gekleurde coupes om volledige traceerbaarheid mogelijk te maken.

Procedures:

1. Kleuren

a. De objectglaasjes worden een nacht aan de lucht gedroogd alvorens ze te kleuren.

b. De coupes worden gekleurd met hematoxyline-eosine.

2. Dekglaasjes aanbrengen

a. Dekglaasjes kunnen handmatig of automatisch worden aangebracht.

b. Een objectglaasje wordt in xyleen of TissueClear gedoopt en de overmaat aan xyleen/TissueClear wordt voorzichtig van het objectglaasje af getikt.

▼**M6**

c. Er wordt ongeveer 0,1 ml montagemedium aangebracht bij het uiteinde van het objectglaasje dat het verst van het matglazen deel ligt, of op het dekglaasje.

d. Het dekglaasje wordt onder een schuine hoek gehouden en op het objectglaasje aangebracht.

3. Etikettering

a. Het etiket van het objectglaasje bevat de volgende informatie:

i. Naam laboratorium

ii. Soort

iii. Monsternr. / Objectglaasjesnr.

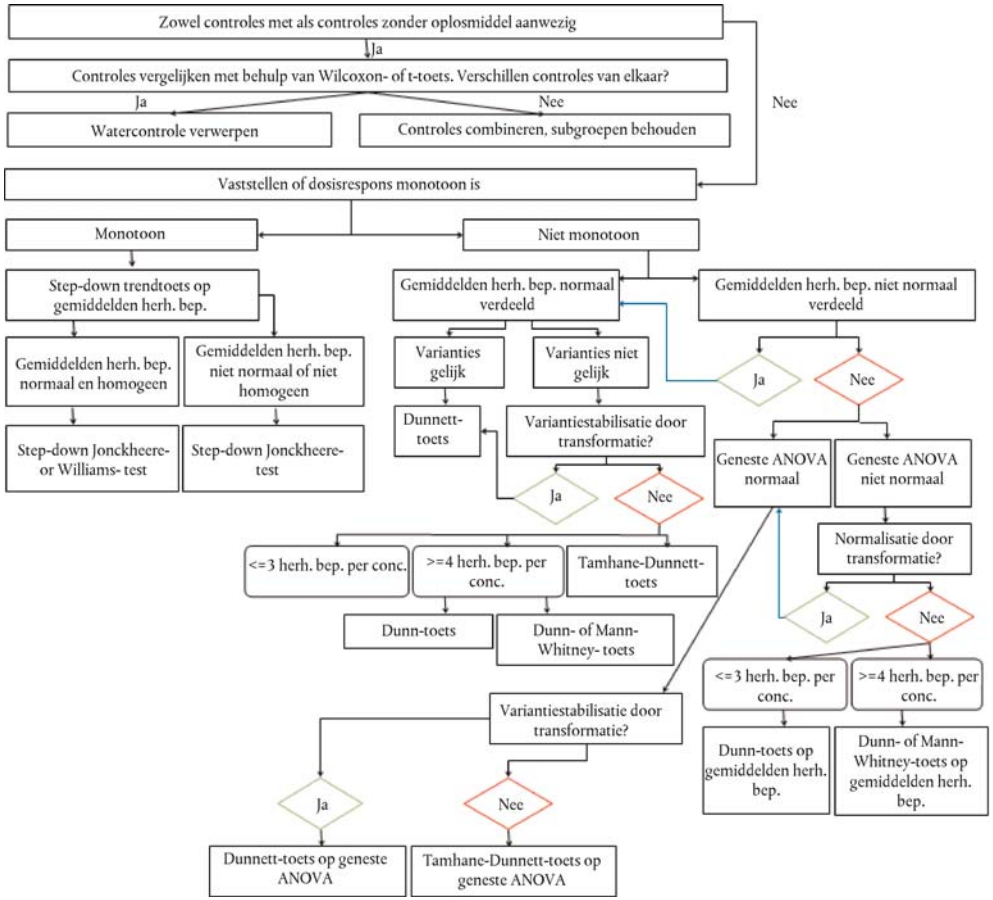
iv. Stof / Behandelingsgroep

v. Datum

▼M6

Aanhangsel 8

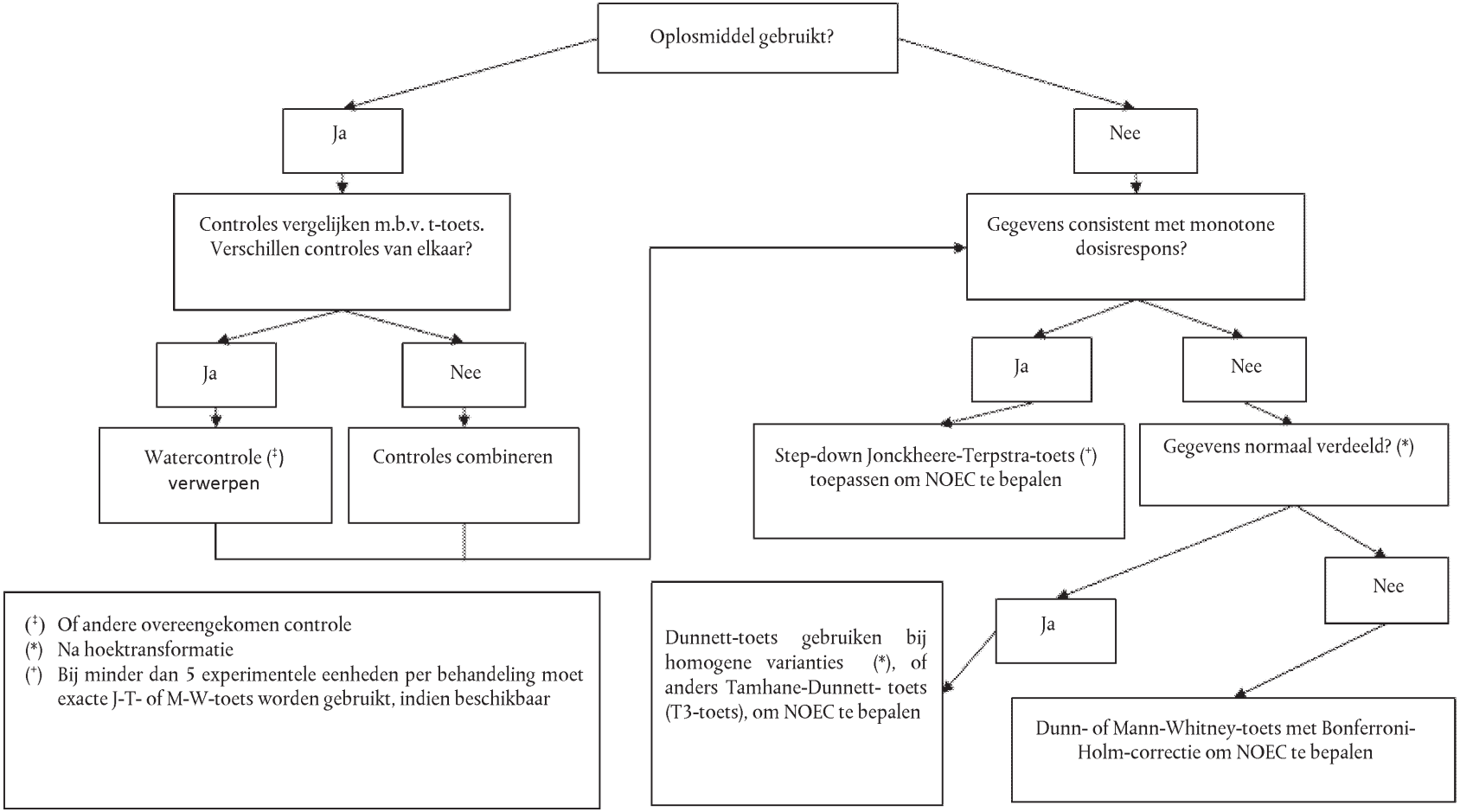
Statistisch stroomdiagram voor analyse van vitellogenine



02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 1935

▼M6

Statistisch stroomdiagram voor analyse van geslachtsverhouding



▼M6

Aanhangsel 9

Richtsnoer voor weefselbemonstering voor genetische geslachtsbepaling en voor genetische geslachtsbepaling door middel van PCR

Bemonstering, preparatie en opslag van weefsel voor genetische geslachtsbepaling door middel van PCR voor het Japanse rijstvisje (opgesteld door het Laboratory for Aquatic Organisms van Bayer CropScience AG)

1. Met een fijne schaar wordt de aars- of rugvin van elke vis afgesneden en in een buis gedaan met daarin 100 µl extractiebuffer 1 (zie onder voor details over bereiding van de buffer). De schaar wordt na elke vis gereinigd in een beker met gedestilleerd H_2O en met een papieren doekje gedroogd.

2. De vinweefsels worden nu gehomogeniseerd met behulp van een teflon microbuisstamper om de cellen te lyseren. Voor elke buis wordt een nieuwe stamper gebruikt om verontreinigingen te voorkomen. De stampers worden een nacht in 0,5 M NaOH gelegd, 5 minuten gespoeld in gedestilleerd H_2O en in ethanol of steriel na autoclaveren bewaard tot ze gebruikt worden.

3. Het is ook mogelijk om het vinweefsel zonder extractiebuffer 1 te bewaren op droogijs en daarna bij – 80 °C om afbraak van het DNA te voorkomen. Maar de extractie verloopt beter als het DNA tegelijkertijd wordt geëxtraheerd (zie boven voor behandeling; monsters worden op ijs ontdooid na opslag bij – 80 °C alvorens de buffer in de buizen te doen).

4. Na homogeniseren worden alle buizen in een waterbad gezet en 15 minuten gekookt bij 100 °C.

5. Daarna wordt in elke buis 100 µl van extractiebuffer 2 gepipetteerd (zie onder voor details over de bereiding van de buffer). De monsters worden 15 minuten bij kamertemperatuur bewaard en ondertussen af en toe zachtjes met de hand geschud.

6. Daarna worden alle buizen weer in een waterbad gezet en nog eens 15 minuten gekookt bij 100 °C.

7. Tot verdere analyse worden de buizen bij – 20 °C ingevroren.

Bereiding van buffers

PCR-buffer 1:

500 mg N-lauroylsarcosine (bijv. Merck KGaA, Darmstadt, DE)

2 ml 5 M NaCl

voeg toe: 100 ml gedest. H_2O

→ autoclaveren

PCR-buffer 2:

20 g Chelex (bijv. Biorad, München, DE)

Zwellen in 100 ml gedest. H_2O

→ autoclaveren

Bepaling van het genetische geslacht (door middel van PCR) bij het Japanse rijstvisje (opgesteld door het Laboratory for Aquatic Organisms van Bayer CropScience AG en Universität Würzburg Biozentrum)

De geprepareerde en ingevroren buizen (zoals hierboven beschreven) worden op ijs ontdooid. Daarna worden ze gecentrifugeerd in een eppendorf-centrifuge (30 seconden bij max. snelheid bij kamertemperatuur). Voor de PCR wordt het heldere supernatans apart van de neerslag gebruikt. Het moet absoluut worden vermeden dat spoortjes Chelex (gelokaliseerd in de neerslag) worden overgebracht naar de PCR-reactie, omdat dit de activiteit van „Taq"-polymerase zal verstoren. Het supernatans wordt direct gebruikt of kan ingevroren worden bewaard (bij – 20 °C) en weer ontdooid voor latere analyses. Dit kan zelfs worden herhaald zonder negatieve invloed op het DNA.

▼**M6**

1. *Bereiding van de „reactiemix" (25 µl per monster):*

	Volume	Uiteindelijke concentratie
Sjabloon-DNA	0,5 µl tot 2 µl	
10xPCR-buffer met MgCl2	2,5 µl	1x
Nucleotiden (elk van dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Voorwaartse primer (10 µM) (zie onder 3-5)	0,5 µl	200 nM
Achterwaartse primer (10 µM) (zie onder 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Water (PCR-kwaliteit)	tot 25 µl	
Taq E-polymerase	0,3 µl	1,5 U
10xPCR-buffer met $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 bij 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM MgCl2, 0,1 % Tween 20		

Benodigd voor elke PCR (zie onder 3-5) is de speciale primer als een nieuwe combinatie van „reactiemix" en de benodigde hoeveelheid sjabloon-DNA voor elk monster (zie boven). De respectievelijke volumes worden met behulp van pipetten in nieuwe buizen overgebracht. Daarna worden alle buizen afgesloten, geroerd (ca. 10 sec.) en gecentrifugeerd (10 sec. bij kamertemperatuur). Nu kunnen de respectievelijke PCR-programma's worden gestart. Daarnaast worden een positieve controle (voorbeeld-DNA-monster met bekende activiteit en duidelijke resultaten) en een negatieve controle (1 µl gedest. H_2O) in elk PCR-programma gebruikt.

2. *Bereiding van de agarosegel (1 %) — Tijdens het uitvoeren van PCR-programma's:*

— Los 3 g agarose op in 300 ml 1 × TAE-buffer (1 % agarosegel).

— Deze oplossing wordt gekookt in een magnetron (ca. 2-3 min.).

— Breng de hete oplossing over in een speciale gietvorm die op ijs ligt.

— Na ca. 20 min. is de agarosegel klaar voor gebruik.

— Bewaar de agarosegel in 1 × TAE-buffer tot het eind van de PCR-programma's.

3. *Actine-PCR-programma:*

Deze PCR-reactie is bedoeld om aan te tonen dat het DNA in het monster niet beschadigd is.

— Speciale primer:

„Mact1(upper/forward)" → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(lower/reverse)" → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programma:

5 min. 95 °C

Cyclus (35 keer):

Denaturatie → 45 sec. bij 95 °C

Hybridisatie → 45 sec. bij 56 °C

Verlenging → 1 min. bij 68 °C

15 min. 68 °C

▼**M6**

4. *X- en Y-gen-PCR-programma:*

De monsters met intact DNA worden in dit PCR-programma gebruikt om de X- en Y-genen te detecteren. Mannelijk DNA zou één dubbele band moeten vertonen en vrouwelijk DNA één enkele band (na kleuring en gelelektroforese). Voor dit programma moet één positieve controle voor mannetjes (XY-monster) en één voor vrouwtjes (XX-monster) worden opgenomen.

— Speciale 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

— Programma:

5 min. 95 °C

Cyclus (40 keer):

Denaturatie	→ 45 sec. bij 95 °C
Hybridisatie	→ 45 sec. bij 55 °C
Verlenging	→ 1 min 30 sec. bij 68 °C

15 min. 68 °C

5. *Y-gen-PCR-programma als „controle" voor X- en Y-gen-PCR-programma:*

Met dit PCR-programma worden de resultaten van het „X- en Y-gen-PCR-programma" geverifieerd. De „mannelijke monsters" zouden één band moeten vertonen en de „vrouwelijke monsters" zouden geen band moeten vertonen (na kleuring en gelelektroforese).

— Speciale primer:

„DMTYa (upper/forward)" → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (lower/reverse)" → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programma:

5 min. 95 °C

Cyclus (40 keer):

Denaturatie	→ 45 sec. bij 95 °C
Hybridisatie	→ 45 sec. bij 56 °C
Verlenging	→ 1 min. bij 68 °C

15 min. 68 °C

6. *Kleuring van de PCR-monsters:*

Kleuroplossing:

50 % glycerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % broomfenolblauw

0,25 % xyleencyanol

Pipetteer 1 µl van de kleuroplossing in elke buis.

7. *Start van de gelelektroforese:*

— De bereide 1 % agarosegel wordt overgebracht in een elektroforesekamer, gevuld met 1 × TAE-buffer.

— 10-15 µl van elk gekleurd PCR-monster wordt in een agarosegel-slotje gepipetteerd.

— Tevens wordt 5-15 µl van de 1 kb-„ladder" (Invitrogen) in een afzonderlijk slotje gepipetteerd.

— Start de gelelektroforese bij 200 V.

— Stop na 30-45 min.

▼**M6**

8. *Bepaling van de banden:*

— Reinig de agarosegel in gedistilleerd H_2O.

— Breng nu de agarosegel over in ethidiumbromide en laat hem daar 15-30 min. liggen.

— Daarna wordt een foto van de agarosegel genomen in een uv-lichtdoos.

— Tot slot worden de monsters geanalyseerd in vergelijking met de band(en) van de positieve controle en de ladder.

▼M6

Aanhangsel 10

Richtsnoer voor weefselbemonstering voor genetische geslachtsbepaling door middel van PCR bij de driedoornige stekelbaars

Weefselbemonstering en DNA-extractie

DNA kan worden geëxtraheerd met een verscheidenheid aan in de handel verkrijgbare reagentia en met behulp van handmatige en geautomatiseerde extractiesystemen. Het in het Cefas Weymouth-laboratorium gebruikte protocol wordt hieronder beschreven en de alternatieve benaderingen zijn waar van toepassing toegevoegd.

1. Met een fijne schaar wordt een stukje weefsel (10-20 mg) van het dorsolaterale gebied (na afsnijden van kop en staart voor VTG-analyse), bij elke vis afgenomen. Het weefsel wordt in een buis gedaan en deze wordt ofwel direct in vloeibare stikstof gedaan (voor opslag bij – 80 °C) of gevuld met 70 % ethanol (voor transport en vervolgens opslag bij 4 °C). De schaar wordt na elke vis gereinigd in 70 % ethanol en daarna in gedestilleerd water, en gedroogd met een papieren doekje.

2. De ethanol (indien aanwezig) wordt verwijderd door afzuiging en het weefsel wordt gedurende een nacht gedigereerd met proteïnase K in 400 µl ATL-buffer (Qiagen). Een aliquot (200 µl) van het digest wordt overgebracht in een 96-well S-blok (Qiagen) en het DNA wordt geëxtraheerd in een 96-well format met behulp van de Qiagen Universal BioRobot en de QIamp Investigator BioRobot kit. Het DNA wordt geëlueerd in 50 µl DNase- en RNase-vrij water. Voor het extraheren van DNA uit harde weefsels (zoals een stekel of een borstvin) kan het nodig zijn om het monster in de lysisbuffer te homogeniseren met behulp van een FastPrep® weefsellyseerder of gelijkwaardig systeem voor weefsellysis.

   Alternatieve mogelijkheden zijn:

   a) het digereren van weefsel gedurende een nacht met proteïnase K in 400 µl G2-lysisbuffer (Qiagen) en het extraheren van DNA uit 200 µl van dit digest met behulp van ofwel de EZ-1 DNA easy tissue kit en de EZ-1 biorobot, dan wel de DNA easy tissue mini kit. Het DNA wordt geëlueerd in een volume van 50 µl.

   b) De weefsels worden verwerkt met het reagens DNAzol. In het kort worden de weefselmonsters 10 minuten gelyseerd in 1 ml DNAzol in een microcentrifugebuis van 1,5 ml en daarna 5 minuten bij 13 000 rpm gecentrifugeerd om eventuele deeltjes te verwijderen. Het gelyseerde monster wordt daarna overgebracht in een nieuwe microcentrifugebuis van 1,5 ml met daarin 500 µl 100 % moleculaire kwaliteit ethanol en daarna 10 minuten bij 13 000 rpm gecentrifugeerd om het DNA neer te slaan. De ethanol wordt verwijderd en vervangen door 400 µl 70 % moleculaire kwaliteit ethanol. Het mengsel wordt 5 minuten bij 13 000 rpm gecentrifugeerd, waarna de DNA-neerslag wordt opgelost in 50 µl moleculair DNase- en RNase-vrij water. Wederom geldt dat voorafgaand aan het extraheren van DNA uit harde weefsels (borstvin) het nodig kan zijn om het monster in de lysisbuffer te homogeniseren met behulp van een FastPrep® weefsellyseerder of gelijkwaardig systeem voor weefsellysis.

3. Het DNA wordt, totdat het nodig is, bewaard bij – 20 °C.

Belangrijke opmerking: tijdens de procedures moeten handschoenen worden gedragen.

Polymerasekettingreactie- (PCR-)analyse

Amplificaties werden uitgevoerd met gebruikmaking van 2,5 µl van het DNA-extract in een reactievolume van 50 µl met gebruikmaking van de IDH-locusprimers (zoals beschreven door Peichel et al., 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

Er zijn talloze leveranciers van geschikte PCR-reagentia. De in het onderstaande beschreven methode is de methode die op dit moment wordt gebruikt door het Cefas Weymouth-laboratorium.

1. *Bereiding van het „reactiemengsel" (50 µl per monster):*

Een stammengsel wordt als volgt bereid. Het mengsel kan van tevoren worden bereid en bewaard in bevroren toestand bij – 20 °C, totdat het nodig is. Bereid voldoende stammengsel voor een negatieve controle (alleen moleculair-biologisch zuiver water).

	Volume (conc. stamoplossing)/ monster	Uiteindelijke concentratie
5xGoTaq® reactiebuffer	10µl	1x
MgCl2	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nucleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM elk)	250 µM elk
Forward primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Reverse primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Moleculair-biologisch zuiver water	30,75 µl	
GoTaq polymerase	0,25 µl	1,25 U

— 47,5 µl wordt overgebracht in een gemerkt PCR-buisje van 0,5 ml met een dunne wand.

— 2,5 µl van het gezuiverde DNA wordt toegevoegd aan het correct gemerkte buisje. Herhaal voor alle monsters en de negatieve controle.

— Dek af met een deklaagje van 2 druppels minerale olie. In plaats daarvan kunt u ook een thermocycler met een verwarmd deksel gebruiken.

— Sluit de deksels.

— Monsters werden gedenatureerd in een Peltier PTC-225 thermocycler bij 94 ± 2 °C gedurende 5 minuten gevolgd door 39 cycli van 94 ± 2 °C gedurende 1 minuut, 55 ± 2 °C gedurende 1 minuut, 72 ± 2 °C gedurende 1 minuut, en een laatste verlenging bij 72 ± 2 °C gedurende 10 minuten.

2. *Bereiding van de agarosegel (2 %):*

Traditioneel worden de PCR-producten opgelost in een agarosegel van 20 % die ethidiumbromide bevat.

Capillaire elektroforesesystemen kunnen ook worden gebruikt.

— 2 g agarose wordt afgewogen in 100 ml 1 × TAE-buffer.

— In een magnetron (ca. 2-3 min.) opwarmen om het agarose op te lossen.

— 2 druppels ethidiumbromide in de uiteindelijke concentratie 0,5 µg/ml worden toegevoegd.

— De hete oplossing wordt overgeheveld in het gelgietapparaat.

— Laat de gel hard worden.

3. *Gelelektroforese:*

— De agarosegel wordt overgebracht naar het elektroforeseapparaat en ondergedompeld in 1 × TAE-buffer.

— 20 µl van elk monster wordt geïnjecteerd in een afzonderlijke well en een merkstof voor molecuulgewicht (100 bp DNA ladder, Promega) wordt aan een reserve-well toegevoegd.

— Elektroforese wordt uitgevoerd bij 120 V gedurende 30-45 minuten.

▼**M6**

4. *Visualisering van de amplificatieproducten*

Indien het ethidiumbromide op de hierboven beschreven wijze in de agarosegel is opgenomen, worden de DNA-producten gevisualiseerd onder een UV-lichtbron. In plaats daarvan kan de agarosegel voorafgaand aan de visualisering worden gekleurd door de gel gedurende 30 minuten onder te dompelen in een verdunde ethidiumbromideoplossing (0,5 μg/ml in water).

▼M6

Aanhangsel 11

Richtsnoer voor de procedure van de kunstmatige bevruchting voor de driedoornige stekelbaars

Het doel van dit deel is om de procedures te beschrijven voor het verkrijgen van bevruchte eitjes uit de driedoornige stekelbaars om deze te gebruiken in de FSDT.

Procedures

Sperma uit de mannetjes verkrijgen

1. Een goed gekleurd mannetje van de doelpopulatie wordt geëuthanaseerd.

2. De testes worden aan beide zijden van de vis uitgesneden. *De testes zijn over het algemeen felgekleurde, staafvormige structuren die duidelijk te zien zijn bij de laterale middenlijn van het lichaam*. Pas een van de volgende methoden toe:

3. Gebruik een fijne schaar, begin bij de cloaca en maak een incisie van 1-1,5 cm met één knip met een hoek van ongeveer 45 graden.

4. Gebruik een scalpel om een kleine incisie te maken in de zijkant van de vis iets achter het bekken en precies ventraal ten opzichte van de beenplaten.

5. De testes worden verwijderd met behulp van een fijn tangetje en in een petrischaal geplaatst.

6. Elke testis wordt bedekt met 100 µl vers bereide **Hank's gebalanceerde zoutoplossing (HBSS)** (*).

7. De testes worden in kleine blokjes gesneden met een scheermesje of scalpel. Hierdoor komt het sperma vrij en gaat de Hank's oplossing er melkachtig uitzien.

8. De vloeistof met daarin het sperma wordt toegevoegd aan een buis, waarbij tijdens het pipetteren moet worden vermeden dat stukjes weefsel van de testes meekomen.

9. 800 µl Hank's gebalanceerde zoutoplossing wordt aan de buis toegevoegd en goed gemengd.

10. Indien nodig kan het mannetje worden geconserveerd door fixatie in 100 % ethanol of desgewenst een andere fixeerstof. Dit is met name van belang, indien het onderzoek vaststelt van welke ouders nakomelingen afstammen.

Belangrijke opmerking: *Hoewel de meeste benodigde stamoplossingen van tevoren kunnen worden bereid, moeten* ***stamoplossing 5*** *en vervolgens de* **gebalanceerde zoutoplossing** *op de dag van gebruik* **vers** *worden bereid*.

Stamoplossing 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Gedistilleerd water	100 ml

Stamoplossing 2

Na_2HPO_4 (watervrij)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Gedistilleerd water	100 ml

Stamoplossing 3

$CaCl_2$	0,72 g
Gedistilleerd water	50 ml

(*) HBSS = Hank's buffered/balanced salt solution:

HBSS is nodig om het sperma te conserveren terwijl het wordt geprepareerd voor bevruchting.

▼M6

Stamoplossing 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
Gedistilleerd water	50 ml

Stamoplossing 5 (vers bereid)

$NaHCO_3$	0,35 g
Gedistilleerd water	10 ml

Opmerking: Als u reeds enkele van bovengenoemde zouten hebt, maar met een ander watergehalte (d.w.z. $2H_2O$ in plaats van watervrij), kunt u deze zouten nog steeds gebruiken, als u het gewicht eerst aanpast op basis van het molecuulgewicht).

Combineer voor Hank's gebalanceerde zoutoplossing in de volgende volgorde:

stamoplossing 1	1,0 ml
stamoplossing 2	0,1 ml
stamoplossing 3	0,1 ml
gedistilleerd water	8,6 ml
stamoplossing 4	0,1 ml
stamoplossing 5	0,1 ml

Goed mengen alvorens te gebruiken.

Bevruchting

1. Grote, drachtige vrouwtjes worden geïdentificeerd binnen de doelpopulatie; vrouwtjes zijn pas klaar om geknepen te worden als zichtbaar is dat de eitjes uit de cloaca steken. Als vrouwtjes klaar zijn, vertonen ze de karakteristieke houding met de „kop omhoog”

2. Wrijf voorzichtig met uw vinger of duim langs de zijkant van de vis in de richting van de staart om het uitscheiden van een eizakje in een schoon petrischaaltje te stimuleren. Herhaal aan de andere kant en breng de vis weer over naar haar bak.

3. De eitjes kunnen met een fijn penseel worden uitgespreid (zodat ze een monolaag vormen). Het is belangrijk om zoveel mogelijk eitjes aan het sperma bloot te stellen en daarom is het nuttig om een zo groot mogelijk oppervlak van eitjes te maken. Belangrijke opmerking: Houd de eitjes vochtig door een vochtige tissue rond de eitjes te leggen (het is belangrijk dat de eitjes niet rechtstreeks met water in aanraking komen, aangezien dit kan leiden tot voortijdige verharding van het eivlies, waardoor bevruchting onmogelijk wordt). Het aantal eitjes dat elk vrouwtje kan produceren, varieert in aanzienlijke mate, maar gemiddeld zouden gemakkelijk ongeveer 150 eitjes uit één drachtig vrouwtje moeten kunnen worden verkregen.

4. 25µl sperma in Hank's oplossing wordt gelijkelijk verspreid over het gehele oppervlak van de eitjes met behulp van het penseel. De eitjes zullen snel hard worden en van kleur veranderen (binnen een minuut), zodra de bevruchting is begonnen. Herhaal de procedure, indien het geschatte aantal eitjes groter is dan 150. Voeg wat meer sperma toe, indien de eitjes niet binnen een minuut hard worden. Belangrijke opmerking: Het toevoegen van meer sperma verbetert niet noodzakelijkerwijs het bevruchtingspercentage.

5. De eitjes en het sperma moeten ten minste 15 minuten de tijd krijgen voor de onderlinge „interactie” en de bevruchte eitjes moeten binnen 1,5 uur na de bevruchting in de blootstellingsaquaria worden geplaatst.

6. De procedure wordt herhaald met een ander vrouwtje, totdat het gewenste aantal eitjes is verzameld.

7. Houd enkele eitjes uit de laatste batch apart en fixeer ze in 10 % azijnzuur.

▼M6

Eitjes tellen en verdelen over testaquaria

1. De eitjes moeten gelijkelijk worden verdeeld tussen de verschillende behandelingsniveaus om genetische vertekening te voorkomen. Elke batch bevruchte eitjes moet worden opgedeeld in groepen (zoveel als er behandelingsniveaus zijn) van gelijke grootte door een stomp instrument te gebruiken (d.w.z. een entomologische tang met een breed blad of een entoog). Als u 4 duplo's per behandeling met 20 eitjes per duplo als doel hebt, moet u 80 eitjes per blootstellingsaquarium verdelen. Belangrijke opmerking: Het is aan te bevelen om 20 % extra (d.w.z. 96 eitjes per behandelingsniveau) toe te voegen, totdat u ervan overtuigd bent dat u bevruchtingspercentages van 100 % hebt bereikt.

2. Eitjes van stekelbaarzen zijn buiten het door de vader bewaakte nest zeer vatbaar voor schimmelinfecties. In dit verband is het van essentieel belang dat alle eitjes tijdens de eerste 5 dagen van de test met methyleenblauw worden behandeld. Een stamoplossing methyleenblauw wordt bereid met 1 mg/ml en toegevoegd aan de blootstellingsaquaria om een maximale totale concentratie van 2,125 mg/l te verkrijgen. Belangrijke opmerking: Stekelbaarzen mogen niet aan methyleenblauw worden blootgesteld zodra ze zijn uitgekomen; dus het systeem moet op dag 6 vrij zijn van methyleenblauw.

3. De eitjes worden dagelijks geïnspecteerd en eventuele dode of onbevruchte eitjes worden als zodanig geregistreerd. Belangrijke opmerking: De eitjes mogen nooit buiten het water zijn, zelfs niet gedurende korte tijd, totdat ze uitkomen.

▼M6

C.42. BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID IN ZEEWATER

ALGEMENE INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan OESO-testrichtsnoer (TG) 306 (1992). Toen de oorspronkelijke testmethoden werden ontwikkeld, was niet bekend in hoeverre resultaten uit de screeningtests voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid met gebruikmaking van zoet water, en van effluent van afvalwater of actief slib als entmateriaal, zouden kunnen worden toegepast op het mariene milieu. De in dit verband gemelde resultaten (bijv. (1)) variëren.

2. Veel industrieel afvalwater, dat diverse chemische stoffen bevat, bereikt de zee hetzij door directe lozing, hetzij via estuaria en rivieren, waarin de stoffen relatief kort verblijven in vergelijking met de tijd die nodig is voor de volledige biologische afbraak van veel van de aanwezige chemische stoffen. Vanwege het groeiende bewustzijn omtrent de noodzaak om het mariene milieu te beschermen tegen de toenemende belasting met chemische stoffen evenals de noodzaak om de waarschijnlijke concentratie van de in de zee aanwezige chemische stoffen te bepalen, zijn er testmethoden voor de biologische afbreekbaarheid in zeewater ontwikkeld.

3. De hier beschreven methoden gebruiken natuurlijk zeewater niet alleen als waterfase, maar ook als bron van micro-organismen. Om te proberen deze methoden in overeenstemming te brengen met de methoden voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid in zoet water, is het gebruik van ultragefiltreerd en gecentrifugeerd zeewater onderzocht, evenals het gebruik van mariene sedimenten als entmateriaal. Deze onderzoeken leverden geen succes op. Het testmedium is derhalve natuurlijk zeewater dat voorbehandeld is om er grove deeltjes uit te verwijderen.

4. Om de totale biologische afbreekbaarheid te evalueren met de schudflesmethode (shake flask method), moeten relatief hoge concentraties teststof worden gebruikt vanwege de geringe gevoeligheid van de analysemethode met opgeloste organische koolstof (dissolved organic carbon, DOC). Dit betekent verder dat het nodig is om aan het zeewater minerale nutriënten (N en P) toe te voegen, omdat ze anders in zodanig lage concentraties zouden voorkomen dat de verwijdering van DOC daardoor beperkt zou worden. Ook bij de gesloten-flesmethode is het nodig om de nutriënten toe te voegen vanwege de concentratie van de toegevoegde teststof.

5. Daarom zijn deze methoden geen tests voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid, aangezien er geen entmateriaal wordt toegevoegd naast de reeds in het zeewater aanwezige micro-organismen. Noch simuleren de tests het mariene milieu, aangezien nutriënten worden toegevoegd en de concentratie van de teststof zeer veel hoger is dan het geval zou zijn in de zee. Om deze redenen worden de methoden voorgesteld onder een nieuwe onderafdeling „Biologische afbreekbaarheid in zeewater”.

TOEPASSING

6. De resultaten van de tests, die toegepast zouden worden omdat het patroon van het gebruik en de lozing van de stof in kwestie duiden op een route naar de zee, geven een eerste indruk van biologische afbreekbaarheid in zeewater. Indien het resultaat positief is (> 70 % DOC verwijderd; > 60 % theoretisch zuurstofverbruik (theoretical oxygen demand, ThOD), kan worden geconcludeerd dat de mogelijkheid van biologische afbreekbaarheid in het mariene milieu bestaat. Echter, een negatief resultaat sluit een dergelijke mogelijkheid niet uit, maar duidt erop dat verder onderzoek nodig is, bijvoorbeeld met gebruik van een zo laag mogelijke concentratie van de teststof.

▼M6

7. Indien een meer definitieve waarde voor het percentage of de mate van biologische afbreekbaarheid in zeewater op een bepaalde locatie vereist is, moeten in ieder geval complexere en meer geavanceerde, en daardoor ook duurdere, methoden worden toegepast. Een simulatietest zou bijvoorbeeld kunnen worden toegepast met gebruikmaking van een concentratie teststof die dichter in de buurt komt bij de concentratie die waarschijnlijk in het milieu voorkomt. Ook zou gebruik kunnen worden gemaakt van niet-verrijkt, niet-voorbehandeld zeewater dat wordt verzameld op de locatie in kwestie, waarna de primaire biologische afbreekbaarheid gevolgd zou kunnen worden door middel van specifieke chemische analyse. Voor de totale biologische afbreekbaarheid zouden met ^{14}C gemerkte stoffen nodig zijn om de verdwijningspercentages van oplosbare organische ^{14}C en de productie van $^{14}CO_2$ te kunnen meten bij in milieuopzicht realistische concentraties.

KEUZE VAN METHODEN

8. De selectie van de te gebruiken methode is afhankelijk van een aantal factoren; onderstaande tabel is bedoeld als hulp bij de selectie. Stoffen met een oplosbaarheid in water van minder dan het equivalent van ongeveer 5 mg C/l kunnen niet worden getest in de schudflesmethode, terwijl slecht oplosbare stoffen wel kunnen worden getest, althans in principe, in de gesloten-flesmethode.

Tabel

Voordelen en nadelen van de schudflesmethode en de gesloten-flesmethode

METHODE	VOORDELEN	NADELEN
SCHUDFLES	— eenvoudig apparaat met uitzondering van het C-analyseapparaat — duur van 60 d is geen probleem — geen interferentie door nitrificatie — kan aan vluchtige stoffen worden aangepast	— vereist een C-analyseapparaat — gebruikt 5-40 mg DOC/l, zou remmend kunnen werken — DOC-bepaling is moeilijk bij lage concentraties in zeewater (chloride-effect) — DOC soms hoog in zeewater
GESLOTEN FLES	— eenvoudig apparaat — eenvoudige bepaling van de totaalwaarden — gebruikt lage concentraties teststof (2 mg/l), dus minder kans op remmende werking — gemakkelijk aan te passen aan vluchtige stoffen	— de luchtdichtheid van flessen zou moeilijk te handhaven kunnen zijn — groei van bacteriën op wanden kan leiden tot onjuiste waarden — de blanco-opnamewaarden voor O_2 kunnen hoog zijn, met name na 28 dagen; zou verholpen kunnen worden door veroudering van het zeewater — mogelijke interferentie vanwege O_2-opname door nitrificatie

SCHUDFLESMETHODE

INLEIDING

1. Deze methode is een zeewatervariant van de gewijzigde OESO-screeningtest (Modified OECD Screening Test) die wordt beschreven in hoofdstuk C.4B van deze bijlage (2). De methode is in zijn definitieve vorm opgesteld als resultaat van een ringtest die voor de Europese Commissie (EC) werd georganiseerd door het Deense Waterkwaliteitsinstituut (3).

2. Zoals bij de hier eveneens besproken gesloten-flesmethode moeten de resultaten van deze test niet worden beschouwd als indicatoren van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid, maar specifiek worden gebruikt om informatie te verkrijgen over de biologische afbreekbaarheid van stoffen in mariene omgevingen.

▼M6

PRINCIPE VAN DE METHODE

3. Een vooraf bepaalde hoeveelheid teststof wordt opgelost in het testmedium, totdat een concentratie van 5-40 mg opgeloste organische koolstof (DOC)/l wordt bereikt. Indien de gevoeligheidsgrenzen van analyses van organische koolstof verbeterd worden, zou het gebruik van lagere concentraties teststof voordelen kunnen opleveren, in het bijzonder voor stoffen met een remmend effect. De oplossing van de teststof in het testmedium wordt onder roeren en in het donker geïncubeerd of in diffuus licht onder aerobe omstandigheden bij een vaste temperatuur (constant gehouden met ± 2 °C), die normaal binnen het bereik 15-20 °C zal vallen. Ingeval het doel van het onderzoek is om milieuomstandigheden te simuleren, kunnen tests worden uitgevoerd buiten dit normale temperatuurbereik. De aanbevolen maximale duur van de test is ongeveer 60 dagen. Afbraak wordt gevolgd door DOC-metingen (uiteindelijke afbraak) en, in sommige gevallen, door specifieke analyse (primaire afbraak).

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

4. Om te weten of de test kan worden toegepast op een bepaalde stof, moeten enkele eigenschappen van die stof bekend zijn. Het gehalte organische koolstof van de stof moet worden bepaald, de vluchtigheid ervan moet zodanig zijn dat er geen aanzienlijke verliezen optreden tijdens het verloop van de test en de oplosbaarheid ervan in water moet groter zijn dan het equivalent van 25-40 mg C/l. Ook mag de stof geen aanzienlijke adsorptie op glazen oppervlakken vertonen. Informatie over de zuiverheid of de relatieve verhoudingen van belangrijke componenten van de teststof is nodig, opdat de verkregen resultaten kunnen worden geïnterpreteerd, in het bijzonder wanneer het resultaat dicht ligt bij het niveau waarop de test wordt doorstaan.

5. Informatie over de giftigheid van de teststof voor bacteriën, zoals die bijvoorbeeld wordt gemeten bij korte ademhalingssnelheidstests (4), kan nuttig zijn bij het selecteren van geschikte testconcentraties en kan essentieel zijn voor de correcte interpretatie van lage waarden voor biologische afbreekbaarheid. Dergelijke informatie is echter niet altijd toereikend voor de interpretatie van de in de biologische-afbreekbaarheidstest verkregen resultaten en de in punt 18 beschreven procedure is geschikter.

REFERENTIESTOFFEN

6. Geschikte referentiestoffen moeten worden gebruikt om de microbiële activiteit van het zeewatermonster te controleren. Natriumbenzoaat, natriumacetaat en aniline zijn voorbeelden van stoffen die voor dit doel kunnen worden gebruikt. De referentiestoffen moeten worden afgebroken binnen een redelijk korte tijd; anders wordt aanbevolen dat de test wordt herhaald met gebruikmaking van een ander zeewatermonster.

7. In de EC-ringtest, waarbij zeewatermonsters werden genomen op verschillende locaties en op verschillende momenten in het jaar (3), waren de aanloopfase (t_L) en de tijd die nodig was om 50 procent afbraak te bereiken (t_{50}), exclusief de aanloopfase, respectievelijk 1 tot 4 dagen en 1 tot 7 dagen voor natriumbenzoaat. Voor aniline varieerde t_L van 0 tot 10 dagen, terwijl t_{50} varieerde van 1 tot 10 dagen.

REPRODUCEERBAARHEID EN GEVOELIGHEID VAN DE METHODE

8. De reproduceerbaarheid van de methode is bepaald in de ringtest (3). De laagste concentratie teststof waarbij deze methode kan worden gebruikt met DOC-analyse, wordt grotendeels bepaald door de detectiegrenswaarde van de analyse van organische koolstof (op dit moment ongeveer 0,5 mg) en de concentratie opgeloste organische koolstof in het gebruikte zeewater (gewoonlijk in de orde van 3-5 mg/l voor water uit open zee). De achtergrondconcentratie DOC mag niet hoger zijn dan 20 % van de totale DOC-concentratie na toevoeging van de teststof. Als dit niet haalbaar is, kan de achtergrondconcentratie DOC in sommige gevallen worden verlaagd door

▼M6

het zeewater vóór het testen te laten verouderen. Indien de methode alleen met specifieke chemische analyse (waarmee primaire afbraak wordt gemeten) wordt gebruikt, moet de onderzoeker door het verstrekken van aanvullende informatie documenteren of uiteindelijke afbreekbaarheid te verwachten is. Deze aanvullende informatie kan bestaan uit de resultaten van andere tests voor gemakkelijke of inherente biologische afbreekbaarheid.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

9. Gewone laboratoriumapparatuur en:

a. schudmachine die geschikt is voor erlenmeyers van 0,5 tot 2 liter, hetzij met automatische temperatuurregeling, hetzij gebruikt in een kamer met constante temperatuur bij 15-20 °C, constant gehouden met ± 2 °C;

b. erlenmeyers van 0,5 tot 2 liter met nauwe hals;

c. membraanfiltratieapparaat of centrifuge;

d. membraanfilters, 0,2-0,45 μm;

e. koolstofanalyseapparaat;

f. apparatuur voor specifieke analyse (facultatief).

Zeewater

10. Neem een zeewatermonster en vervoer het in een zorgvuldig gereinigd vat naar het laboratorium, bij voorkeur binnen een of twee dagen na de monstername. Tijdens het vervoer moet worden voorkomen dat de temperatuur van het monster veel hoger wordt dan de in de test te gebruiken temperatuur. Identificeer de locatie van de monstername nauwkeurig en beschrijf daarbij de status van de locatie in termen van verontreiniging en nutriënten. Met name voor kustwateren moet deze karakterisering een telling omvatten van heterotrofe microbiële kolonies evenals de bepaling van de concentraties van opgeloste nitraat, ammonium en fosfaat.

11. Voor het zeewatermonster zelf wordt de volgende informatie gerapporteerd:

— datum van monstername;

— monsternemingsdiepte;

— voorkomen van het monster — troebel, enz.;

— temperatuur op het moment van de monstername;

— zoutgehalte;

— DOC;

— vertraging tussen de monstername en het gebruik ervan in de test.

12. Indien het DOC-gehalte van het zeewater hoog blijkt te zijn (punt 8), wordt aanbevolen om het zeewater voorafgaand aan gebruik ongeveer een week te laten verouderen. Laat het zeewater verouderen onder aerobe omstandigheden bij de testtemperatuur en in het donker of bij diffuus licht. Indien nodig

▼M6

wordt voorzichtige beluchting toegepast om aerobe omstandigheden te handhaven. Tijdens het verouderen wordt het gehalte gemakkelijk afbreekbaar organisch materiaal verminderd. In de ringtest (3) werd geen verschil aangetoond tussen het afbraakpotentieel van verouderde en vers genomen zeewatermonsters. Het zeewater moet, voordat het wordt gebruikt, worden voorbehandeld om er grove deeltjes uit te verwijderen, bijv. door filtratie met een nylon filter of een grof papieren filter (geen membraan- of GPC-filters) of door bezinken en decanteren. De gebruikte procedure moet worden gerapporteerd. Als veroudering wordt toegepast, moet daarna de voorbehandeling worden uitgevoerd.

Stamoplossingen voor minerale nutriënten

13. Bereid met analytisch zuivere reagentia de volgende stamoplossingen:

(a) kaliumdiwaterstoforthofosfaat, KH_2PO_4 8,50 g

dikaliumwaterstoforthofosfaat, K_2HPO4 21,75 g

dinatriumwaterstoforthofosfaatdihydraat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

ammoniumchloride, NH_4Cl 0,50 g

Oplossen en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

(b) calciumchloride, $CaCl_2$ 27,50 g

Oplossen en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

(c) magnesiumsulfaatheptahydraat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Oplossen en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

(d) ijzer(III)chloridehexahydraat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Oplossen en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

Neerslag in oplossing (d) kan worden voorkomen door één druppel geconcentreerd HCl of 0,4 g ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA, dinatriumzout) per liter toe te voegen. Als er zich neerslag vormt in een stamoplossing, moet deze worden vervangen door een vers bereide oplossing.

Bereiding van testmedium

14. Voeg 1 ml van elk van bovenstaande stamoplossingen toe per liter voorbehandeld zeewater.

Entmateriaal

15. Naast de reeds in het zeewater aanwezige micro-organismen wordt geen specifiek entmateriaal toegevoegd. Het aantal kolonievormende heterotrofen in het zeewatertestmedium (en bij voorkeur ook in de oorspronkelijke zeewatermonsters) wordt (facultatief) bepaald, bijv. door platen te tellen met gebruikmaking van zee-agar. Dit is in het bijzonder wenselijk voor monsters van kust- of verontreinigde locaties. De heterotrofe microbiële activiteit in het zeewater wordt gecontroleerd door een test met een referentiestof uit te voeren.

▼M6

Bereiding van de testoplossingen

16. Zorg ervoor dat alle glazen voorwerpen vóór gebruik grondig schoon zijn, niet noodzakelijk steriel, (bijv. met gebruikmaking van alcoholhoudend zoutzuur), en gespoeld en gedroogd zijn om verontreiniging met resten van voorgaande tests te voorkomen. De flessen moeten ook worden gereinigd voor het eerste gebruik.

17. Evalueer teststoffen tegelijkertijd in duploflessen, samen met één fles voor de referentiestof. Voor de bepaling van de analytische blanco's wordt een blancotest uitgevoerd, in duplo, met noch de rest- noch de referentiestof. De teststoffen worden opgelost in het testmedium; ze kunnen gemakkelijk worden toegevoegd via een geconcentreerde stamoplossing om de gewenste beginconcentraties van normaal gesproken 5-40 mg DOC/l te bereiken. De referentiestof wordt op de gewone wijze getest bij een beginconcentratie die overeenkomt met 20 mg DOC/l. Bij gebruik van stamoplossingen van test- en/of referentiestoffen moet ervoor worden gezorgd dat het zoutgehalte van het zeewatermedium niet al te zeer verandert.

18. Indien toxische effecten te verwachten zijn of niet kunnen worden uitgesloten, kan het raadzaam zijn om in de testopzet een remmingsexperiment, in duplo, op te nemen. De test- en referentiestoffen worden toegevoegd aan dezelfde fles, waarbij de concentratie van de referentiestof normaal gesproken dezelfde is als in de controletest (d.w.z. 20 mg DOC/l), zodat vergelijken mogelijk is.

19. Toereikende hoeveelheden testoplossing worden in de erlenmeyers gebracht (een toereikende hoeveelheid is ongeveer de helft van het flesvolume), waarna elke fles wordt voorzien van een losse afdekking (bijv. aluminiumfolie) die de uitwisseling van gas tussen de fles en de omringende lucht mogelijk maakt. (Katoenen stoppen zijn ongeschikt indien DOC-analyse wordt toegepast). Plaats de flessen op de schudmachine en laat ze continu schudden met een lage snelheid (bijv. 100 tpm) gedurende de gehele test. Regel de temperatuur (15-20 °C en tot op ± 2 °C) en bescherm de flessen tegen licht om de groei van algen te voorkomen. Zorg ervoor dat de lucht vrij is van toxische stoffen.

Fysisch-chemische controletest (facultatief)

20. Indien abiotische afbraak of verliesmechanismen vermoed worden, zoals hydrolyse (alleen een probleem bij specifieke analyse), verdamping of adsorptie, is het aan te bevelen om een fysisch-chemisch controle-experiment uit te voeren. Dit kan worden gedaan door kwik(II)chloride ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) toe te voegen aan flessen met teststof om microbiële activiteit tot stilstand te brengen. Een aanzienlijke verlaging van de concentratie DOC of de concentratie van een specifieke stof in de fysisch-chemische controletest wijst op abiotische verwijdermechanismen. (Als kwikchloride wordt gebruikt, moet worden gelet op interferenties of katalysatorvergiftiging in de DOC-analyse.)

Aantal flessen

21. In een doorsneeproef worden de volgende flessen gebruikt:

flessen 1 & 2 bevatten teststof (testsuspensie);

flessen 3 & 4 bevatten alleen zeewater (blanco);

fles 5 bevat referentiestof (procedurecontrole);

fles 6 bevat test- en referentiestof (toxiciteitscontrole) — facultatief;

fles 7 bevat teststof en steriliserend middel (abiotische steriele controle) — facultatief.

([1]) Kwik(II)chloride ($HgCl_2$) is een zeer toxische stof die met inachtneming van passende voorzorgsmaatregelen moet worden gehanteerd. Afvalwater dat deze stof bevat, moet op passende wijze worden afgevoerd en mag niet in het rioleringsstelsel worden geloosd.

▼M6

DOC-analyse

22. Haal tijdens het verloop van de test met passende tussenpozen monsters uit de test voor de DOC-analyse (aanhangsel 1). Neem altijd monsters aan het begin van de test (dag 0) en op dag 60. Minimaal vijf monsters in totaal zijn nodig om het tijdsverloop van de afbraak te beschrijven. Vanwege de uiteenlopende biologische afbraaksnelheden kan geen vast tijdsschema worden gegeven voor de monstername. Voer de DOC-bepaling in duplo uit voor elk monster.

Monstername

23. Het vereiste volume van de monsters is afhankelijk van de analysemethode (specifieke analyse), het gebruikte koolstofanalyseapparaat en de voor de voorbehandeling van het monster gebruikte procedure (membraanfiltratie of centrifugering) voorafgaande aan de koolstofbepaling (punten 25 en 26). Zorg er vóór de monstername voor dat het testmedium goed is gemengd en dat eventueel aan de fleswand plakkend materiaal wordt opgelost of gesuspendeerd.

24. Pas onmiddellijk membraanfiltratie toe of centrifugeer onmiddellijk na de monstername. Bewaar, indien nodig, de gefiltreerde of gecentrifugeerde monsters bij 2-4 °C gedurende maximaal 48 uur of bij minder dan 18 °C gedurende langere perioden (pas, indien bekend is dat de stof geen effecten ondervindt, de zuurtegraad van de monsters aan tot pH 2 alvorens ze op te slaan).

25. Membraanfilters (0,2-0,45 μm) zijn geschikt, indien gewaarborgd wordt dat ze noch koolstof afgeven, noch de stof in de filtratiestap absorberen, zoals membraanfilters van polycarbonaat. Sommige membraanfilters zijn geïmpregneerd met oppervlakteactieve stoffen voor hydrofilisering, waardoor er aanzienlijke hoeveelheden opgeloste koolstof uit vrij kunnen komen. Prepareer dergelijke filters door ze te koken in gedeïoniseerd water gedurende drie opeenvolgende perioden van één uur elk. Bewaar de filters na het koken in gedeïoniseerd water. Gooi de eerste 20 ml van het filtraat weg.

26. Als alternatief voor membraanfiltratie kan ervoor worden gekozen de monsters te centrifugeren. Centrifugeer bij 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) gedurende 15 minuten, bij voorkeur in een gekoelde centrifuge.

Opmerking: Differentiatie tussen het totale gehalte organische koolstof (total organic carbon, TOC) en DOC (TOC/DOC) door centrifugeren bij zeer lage concentraties lijkt niet te werken, aangezien niet alle bacteriën worden verwijderd of de koolstof die deel uitmaakt van het bacteriële plasma opnieuw wordt opgelost. Bij hogere testconcentraties (> 10 mg C per liter) lijkt de centrifugeringsfout relatief klein.

Bemonsteringsfrequentie

27. Indien analysen direct na monstername worden uitgevoerd, moet het daaropvolgende monsternamemoment worden bepaald aan de hand van het resultaat van de analytische bepaling.

28. Indien monsters worden geconserveerd (punt 24) voor analyse op een later moment, moeten meer monsters worden genomen dan het vereiste minimumaantal van vijf. Analyseer de laatst genomen monsters eerst, waarna door een stapsgewijze „achterwaartse” selectie van geschikte monsters voor analyse een goede beschrijving van de afbraakcurve kan worden verkregen met een relatief klein aantal analytische bepalingen. Indien aan het einde van de test geen biologische afbraak heeft plaatsgevonden, hoeven geen verdere monsters te worden geanalyseerd en in deze situatie kan de „achterwaartse” strategie zorgen voor een aanzienlijke besparing op analysekosten.

▼M6

29. Beëindig de test indien vóór dag 60 een plateau in de curve wordt vastgesteld. Indien afbraak duidelijk vóór dag 60 begonnen is, maar nog geen plateau heeft bereikt, zet u het experiment voort gedurende een verdere periode.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Bewerking van de resultaten

30. De analyseresultaten worden genoteerd op het bijgevoegde gegevensformulier (aanhangsel 2) en de afbraakwaarden voor beide tests en referentiestoffen worden berekend met onderstaande vergelijking:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

waarin:

D_t = procentuele afbraak van DOC of verwijdering van specifieke stof op moment t,

C_o = beginconcentratie van DOC of specifieke stof in het testmedium,

C_t = concentratie van DOC of specifieke stof in het testmedium op moment t,

$C_{bl(0)}$ = beginconcentratie van DOC of specifieke stof in de blanco,

$C_{bl(t)}$ = concentratie van DOC of specifieke stof in de blanco op moment t.

31. Afbraak wordt uitgedrukt als het percentage verwijderde DOC (uiteindelijke afbraak) of als het percentage verwijderde specifieke stof (primaire afbraak) op moment t. De DOC-concentraties worden berekend tot op 0,1 mg per liter en de gemiddelden van de D_t-waarden worden afgerond op het dichtstbijzijnde hele procent.

32. Het verloop van de afbraak wordt inzichtelijk gemaakt in een diagram zoals getoond in de figuur in „Geldigheid en interpretatie van de resultaten”. Als er voldoende gegevens zijn, worden op basis van de curve de aanloopfase (t_L) en de tijd die nodig is om 50 procent verwijdering te bereiken vanaf het einde van de aanloopfase (t_{50}) berekend.

Testverslag

33. Het testverslag moet de volgende informatie bevatten:

Teststof:

— fysische aard en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens.

Testomstandigheden:

— locatie en beschrijving van de monsternamelocatie; status in termen van verontreiniging en nutriënten (kolonietelling, nitraat, ammonium, fosfaat indien van toepassing);

— kenmerken van het monster (datum van monstername, diepte, voorkomen, temperatuur, zoutgehalte, DOC (facultatief), vertraging tussen monstername en gebruik in de test;

▼M6

— voor veroudering van het zeewater gebruikte methode (indien van toepassing);

— voor voorbehandeling van het zeewater gebruikte methode (filtratie/bezinking);

— voor DOC-bepaling gebruikte methode;

— voor specifieke analyse gebruikte methode (facultatief);

— voor de bepaling van het aantal heterotrofen in het zeewater gebruikte methode (tellen van plaatjes of andere procedure) (facultatief);

— andere methoden (facultatief) die zijn gebruikt om de kenmerken van het zeewater vast te leggen (ATP-metingen, enz.).

Resultaten:

— op een gegevensformulier gerapporteerde analytische gegevens (aanhangsel 2);

— het verloop van de afbraaktest wordt schematisch weergegeven in een diagram dat de aanloopfase (t_L) toont evenals de helling en tijd (beginnend vanaf het einde van de aanloopfase) benodigd om 50 procent verwijdering te bereiken (t_{50}). De aanloopfase kan grafisch worden geschat zoals getoond in de figuur in het onderdeel „Geldigheid en interpretatie van de resultaten" of kan gemakkelijk worden berekend als de tijd die nodig is om 10 procent afbraak te bereiken;

— procentuele afbraak gemeten na 60 dagen of aan het einde van de test.

Bespreking van de resultaten.

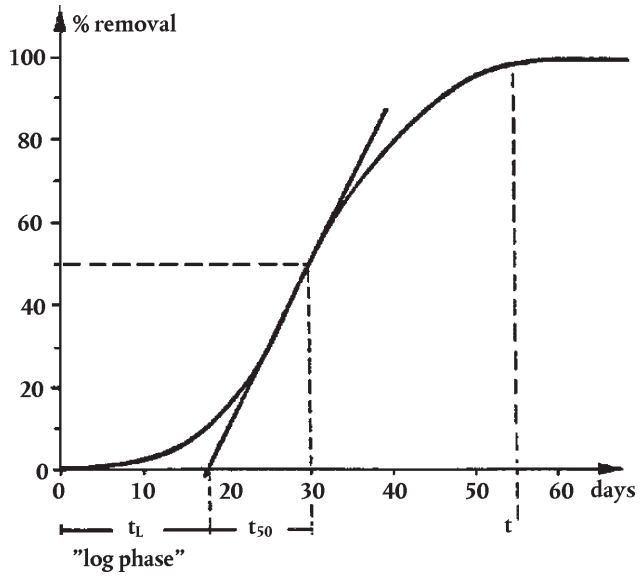
Geldigheid en interpretatie van de resultaten

34. De resultaten die zijn behaald met de referentiestoffen, bijv. natriumbenzoaat, natriumacetaat of aniline, moeten kunnen worden vergeleken met resultaten die zijn behaald in de ringtest (3) (zie het onderdeel over „Referentiestoffen", punt 7). Indien met referentiestoffen behaalde resultaten atypisch zijn, moet de test worden herhaald met gebruikmaking van een ander zeewatermonster. Hoewel de interpretatie van remmingstests mogelijk niet altijd direct voor de hand ligt vanwege de bijdrage aan het DOC-gehalte door de teststof, is een aanzienlijke vermindering van de totale procentuele verwijdering van DOC in vergelijking met die van de controle een positief teken van toxische effecten.

35. Gezien de relatief hoge testconcentraties die worden gebruikt in vergelijking met de meeste natuurlijke systemen (en daardoor de ongunstige verhouding tussen de concentraties teststoffen en andere koolstofbronnen) moet de methode worden beschouwd als een voorlopige test die kan worden gebruikt om aan te geven of een stof al dan niet gemakkelijk biologisch afbreekbaar is. Dienovereenkomstig hoeft een laag resultaat niet noodzakelijkerwijs te betekenen dat de teststof niet biologisch afbreekbaar is in mariene omgevingen, maar duidt het op de noodzaak om meer werk te verrichten teneinde dit vast te stellen.

Een voorbeeld van een theoretisch afbraakexperiment dat een haalbare manier toont om de waarden te schatten van t_L (duur van „aanloopfase") en t_{50} (tijdsinterval, beginnend bij t_L, dat nodig is om 50 procent verwijdering te bereiken), wordt gegeven in onderstaande figuur.

▼M6



GESLOTEN-FLESMETHODE

INLEIDING

1. Deze methode is een zeewatervariant van de gesloten-flesmethode (5) en is in zijn definitieve vorm opgesteld als resultaat van een ringtest die voor de Europese Commissie (EC) werd georganiseerd door het Deense Waterkwaliteitsinstituut (3).

2. Zoals bij de hier eveneens besproken schudflesmethode moeten de resultaten van deze test niet worden beschouwd als aanwijzingen van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid, maar specifiek worden gebruikt om informatie te verkrijgen over de biologische afbreekbaarheid van stoffen in mariene omgevingen.

PRINCIPE VAN DE METHODE

3. Een vooraf bepaalde hoeveelheid teststof wordt opgelost in het testmedium in een concentratie van doorgaans 2-10 mg teststof per liter (een of meer concentraties kunnen worden gebruikt). De oplossing wordt in het donker bewaard in een gevulde gesloten fles in een thermostatisch bad of vat bij een constant gehouden temperatuur (± 1 °C) binnen het bereik van 15-20 °C. Indien het doel van het onderzoek is om milieuomstandigheden te simuleren, kunnen tests worden uitgevoerd buiten dit normale temperatuurbereik, mits er geschikte aanpassingen worden doorgevoerd met het oog op de temperatuurbeheersing. De afbraak wordt gevolgd door zuurstofanalysen gedurende een periode van 28 dagen.

4. De ringtest toonde aan dat, als de test na 28 dagen werd verlengd, er in de meeste gevallen geen bruikbare informatie kon worden verzameld vanwege ernstige interferenties. De waarden voor het biologische zuurstofverbruik (BOD) in de blancotest waren buitensporig hoog, waarschijnlijk door groei op de wanden die wordt veroorzaakt door het gebrek aan beweging en nitrificatie. Derhalve is de aanbevolen duur 28 dagen, maar als de blanco-BOD-waarde binnen de grens van 30 procent blijft (punten 15 en 40), kan de test eventueel worden verlengd.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

5. Om te weten of de test kan worden toegepast op een bepaalde stof, moeten enkele eigenschappen van die stof bekend zijn. De empirische formule is vereist, zodat het theoretische zuurstofverbruik (ThOD) kan worden berekend (zie aanhangsel 3); anders moet het chemische zuurstofverbruik (COD) van de stof worden bepaald om te dienen als referentiewaarde. Het gebruik van COD is minder gewenst, omdat bepaalde stoffen niet volledig worden geoxideerd in de COD-test.

▼M6

6. De oplosbaarheid van de stof moet ten minste 2 mg/l zijn, hoewel minder goed oplosbare stoffen in principe kunnen worden getest (bijv. met gebruik van ultrasone celafbraak) evenals vluchtige stoffen. Informatie over de zuiverheid of de relatieve verhoudingen van belangrijke componenten van de teststof is nodig, opdat de verkregen resultaten kunnen worden geïnterpreteerd, in het bijzonder wanneer het resultaat dicht ligt bij het niveau waarop de test wordt doorstaan.

7. Informatie over de giftigheid van de stof voor bacteriën, zoals die bijvoorbeeld wordt gemeten bij korte ademhalingssnelheidstests (4), kan zeer nuttig zijn bij het selecteren van geschikte testconcentraties en kan cruciaal zijn voor de correcte interpretatie van lage waarden voor biologische afbreekbaarheid. Dergelijke informatie is echter niet altijd toereikend voor de interpretatie van de in de biologische-afbraaktest verkregen resultaten en de in punt 27 beschreven procedure is geschikter.

REFERENTIESTOFFEN

8. Geschikte referentiestoffen moeten worden gebruikt om de microbiële activiteit van het zeewatermonster te controleren. Bijvoorbeeld aniline, natriumacetaat en natriumbenzoaat kunnen voor dit doel worden gebruikt. Ten minste 60 procent (van het ThOD) van deze stoffen moet worden afgebroken binnen een redelijk korte tijd; anders wordt aanbevolen dat de test wordt herhaald met gebruikmaking van een ander zeewatermonster.

9. In de EC-ringtest, waarbij zeewatermonsters werden genomen op verschillende locaties en op verschillende momenten in het jaar, waren de aanloopfase (t_L) en de tijd die nodig was om 50 procent afbraak te bereiken (t_{50}), de aanloopfase niet inbegrepen, respectievelijk 0 tot 2 dagen en 1 tot 4 dagen voor natriumbenzoaat. Voor aniline waren de waarden van t_L en t_{50} respectievelijk 0 tot 7 en 2 tot 12 dagen.

REPRODUCEERBAARHEID

10. De reproduceerbaarheid van de methoden is bepaald in de ringtest (3).

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

11. Gewone laboratoriumuitrusting en:

(a) BOD-flessen van 250-300 ml met glazen stoppen of flessen van 250 ml met een nauwe hals en glazen stoppen kunnen worden gebruikt;

(b) enkele flessen van 2-, 3- en 4- liter met litermarkeringen om het experiment voor te bereiden en om de BOD-flessen te vullen;

(c) waterbad of kamer met constante temperatuur om de temperatuur van de flessen constant te houden (± 1 °C) zonder blootstelling aan licht.

(d) apparatuur voor de analyse van opgeloste zuurstof;

(e) membraanfilters, 0,2-0,45 μm (facultatief);

(f) apparatuur voor specifieke analyse (facultatief).

Zeewater

12. Neem een zeewatermonster en vervoer het in een zorgvuldig gereinigd vat naar het laboratorium, bij voorkeur binnen een of twee dagen na de monstername. Tijdens het vervoer moet worden voorkomen dat de temperatuur van het monster veel hoger wordt dan de in de test te gebruiken temperatuur.

▼M6

13. Identificeer de locatie van de monstername nauwkeurig en beschrijf daarbij de status van de locatie in termen van verontreiniging en nutriënten. Met name voor kustwateren of verontreinigde wateren moet deze karakterisering een telling omvatten van heterotrofe microbiële kolonies evenals de bepaling van concentraties van opgeloste nitraat, ammonium en fosfaat.

14. Voor het zeewatermonster zelf wordt de volgende informatie gerapporteerd:

— datum van monstername;

— monsternemingsdiepte;

— voorkomen van het monster — troebel, enz.;

— temperatuur op het moment van de monstername;

— zoutgehalte;

— opgeloste organische koolstof (DOC)

— vertraging tussen de monstername en het gebruik ervan in de test.

15. Als het DOC-gehalte van het monster hoog blijkt te zijn of als wordt vermoed dat het biologische zuurstofverbruik in de blancotest na 28 dagen meer zou zijn dan 30 procent van dat van de referentiestoffen, wordt aanbevolen om het zeewater voorafgaande aan het gebruik gedurende ongeveer een week te laten verouderen.

16. Laat het monster verouderen onder aerobe omstandigheden bij de testtemperatuur en in het donker of bij diffuus licht. Indien nodig wordt voorzichtige beluchting toegepast om aerobe omstandigheden te handhaven. Tijdens het verouderen wordt het gehalte gemakkelijk afbreekbaar organisch materiaal verminderd. In de ring-test (3) is geen verschil aangetoond tussen het afbraakpotentieel van verouderde en vers verzamelde zeewatermonsters.

17. Vóór gebruik moet het zeewater worden voorbehandeld om er grove deeltjes uit te verwijderen, bijvoorbeeld door filtratie met behulp van een nylon filter of een grof papieren filter (geen membraan- of GF-C-filters) of door bezinken en decanteren. De toegepaste methode moet worden gerapporteerd. Als veroudering wordt toegepast, moet daarna de voorbehandeling worden uitgevoerd.

Stamoplossingen voor minerale nutriënten

18. De onderstaande stamoplossingen worden bereid met gebruikmaking van reagentia van analytische kwaliteit:

(a) kaliumdiwaterstoforthofosfaat, KH_2PO_4 8,50 g

dikaliumwaterstoforthofosfaat K_2HPO_4 21,75 g

dinatriumwaterstoforthofosfaatdihydraat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

ammoniumchloride, NH_4Cl 0,50 g

Oplossen in water en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

(b) calciumchloride, $CaCl_2$ 27,50 g

Oplossen in water en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

(c) magnesiumsulfaatheptahydraat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Oplossen in water en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

(d) ijzer(III)chloridehexahydraat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Oplossen en aanvullen met gedistilleerd water tot 1 liter.

▼M6

Neerslag in oplossing (d) kan worden voorkomen door één druppel geconcentreerd HCl of 0,4 g ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA, dinatriumzout) per liter toe te voegen. Als er zich neerslag vormt in een stamoplossing, moet deze worden vervangen door een vers bereide oplossing.

Bereiding van testmedium

19. Per liter voorbehandeld zeewater wordt 1 ml van elk van bovenstaande stamoplossingen toegevoegd. Het testmedium wordt bij de testtemperatuur met lucht verzadigd door te beluchten met schone perslucht gedurende ongeveer 20 minuten. Ter controle wordt de concentratie opgeloste zuurstof bepaald. De verzadigde concentratie van opgeloste zuurstof als een functie van het zoutgehalte en de temperatuur kan worden afgelezen in het monogram dat bij deze methode is gevoegd (aanhangsel 4).

Entmateriaal

20. Naast de reeds in het zeewater aanwezige micro-organismen wordt geen specifiek entmateriaal toegevoegd. Het aantal kolonievormende heterotrofen in het zeewatertestmedium (en bij voorkeur ook in het oorspronkelijke zeewatermonster) wordt (facultatief) bepaald, bijv. door platen te tellen met gebruikmaking van zee-agar. Dit is in het bijzonder wenselijk voor monsters van kust- of verontreinigde locaties. De heterotrofe microbiële activiteit in het zeewater wordt gecontroleerd door een test met een referentiestof uit te voeren.

Bereiding van testoplossingen

21. Alle nodige manipulaties met inbegrip van veroudering en voorbehandeling van het zeewater worden verricht bij de gekozen testtemperatuur tussen 15 en 20 °C, waarbij er zorg voor moet worden gedragen dat alle glazen voorwerpen schoon zijn, maar niet steriel.

22. Voor de bepaling van het biologische zuurstofgebruik (BOD) van de teststof en referentiestoffen in gelijktijdige proefseries worden groepen van BOD-flessen bereid. Alle analysen worden verricht op duploflessen (blanco's, referentiestoffen en teststoffen), d.w.z. per bepaling worden twee flessen bereid. Op de dagen 0, 5, 15 and 28 (vier bepalingen) worden analysen uitgevoerd. Voor zuurstofanalysen zijn voor vier bepalingen in totaal $3 \times 2 \times 4 = 24$ flessen nodig (blanco, referentie- en teststof) en derhalve is ongeveer 8 liter testmedium (voor één concentratie van de teststof) nodig.

23. Afzonderlijke oplossingen van test- en referentiestoffen worden bereid in grote flessen met een toereikend volume (punt 11) door eerst de test- en referentiestoffen hetzij direct toe te voegen, hetzij door gebruik te maken van een geconcentreerde stamoplossing voor de gedeeltelijk gevulde grote flessen. De gewenste totale concentraties worden bereikt door meer testmedium toe te voegen. Bij gebruik van stamoplossingen van test- en/of referentiestoffen moet ervoor worden gezorgd dat het zoutgehalte van het zeewatermedium niet al te zeer verandert.

24. De concentraties van de test- en referentiestoffen worden geselecteerd met inachtneming van:

a) de oplosbaarheid van opgeloste zuurstof in zeewater bij de gekozen testtemperatuur en het zoutgehalte (zie bijgevoegd nomogram in aanhangsel 4);

b) het biologische zuurstofverbruik van het zeewater in de blancotest; en

c) de verwachte biologische afbreekbaarheid van de teststof.

▼M6

25. Bij 15 °C en 20 °C en een zoutgehalte van 32 deeltjes per duizend (zeewater) is de oplosbaarheid van opgeloste zuurstof respectievelijk ongeveer 8,1 en 7,4 mg/l. Het zuurstofverbruik van het zeewater zelf (ademhaling in blancotest) kan 2 mg O_2/l of meer zijn, als het zeewater niet is verouderd. Derhalve moet, om te waarborgen dat een significante zuurstofconcentratie overblijft na oxidatie van de teststof, een beginconcentratie van de teststof worden gebruikt van ongeveer 2-3 mg/l (afhankelijk van het ThOD) voor de stoffen die naar verwachting volledig worden afgebroken onder de omstandigheden van de test (zoals referentiestoffen). Minder goed afbreekbare stoffen moeten worden getest bij hogere concentraties, tot ongeveer 10 mg/l, mits er geen toxische effecten optreden. Het kan gunstig zijn om parallelle tests te verrichten met een lage (ongeveer 2 mg/l) en een hoge (ongeveer 10 mg/l) concentratie van de teststof.

26. In een blancotest moet het zuurstofgehalte parallel worden bepaald in flessen die noch de teststof noch een referentiestof bevatten.

27. Als de test remmende effecten moet aantonen, worden de volgende reeks oplossingen bereid in afzonderlijke grote flessen (punt 13):

(a) 2 mg per liter van een gemakkelijk afbreekbare stof, bijv. een van de voornoemde referentiestoffen;

(b) x mg per liter teststof (x is doorgaans 2);

(c) 2 mg per liter gemakkelijk afbreekbare stof plus x mg per liter teststof.

Fysisch-chemische controletest (facultatief)

28. Als ervoor wordt gekozen om specifieke analysen te gebruiken, kan een fysisch-chemisch experiment worden uitgevoerd om te controleren of de teststof is verwijderd door abiotische mechanismen, zoals hydrolyse of adsorptie. Een fysisch-chemische controletest kan worden uitgevoerd door kwik(II)chloride ($HgCl_2$) [1] (50-100 mg/l) toe te voegen aan duploflessen met de teststof om microbiële activiteit tot stilstand te brengen. Een aanzienlijke verlaging van de concentratie van een specifieke stof tijdens het verloop van de test wijst op abiotische verwijdermechanismen.

Aantal BOD-flessen in een doorsneebepaling

29. In een doorsneebepaling worden de volgende flessen gebruikt:

— ten minste 8 die de teststof bevatten;

— ten minste 8 die alleen met nutriënten verrijkt zeewater bevatten;

— ten minste 8 die de referentiestof bevatten; en indien nodig

— 6 flessen die de test- en referentiestoffen bevatten (toxiciteitscontrole).

PROCEDURE

30. Na de bereiding moet elke oplossing onmiddellijk worden overgeheveld uit het onderste deel (niet van de bodem) in de overeenkomstige grote fles, om de respectieve groep BOD-flessen te vullen. Vervolgens worden onmiddellijk de tijdstip-nulmonsters geanalyseerd voor opgeloste zuurstof (punt 33) of deze worden geconserveerd voor chemische analyse op een later tijdstip door precipitatie met $MnCl_2$ (mangaan(II)chloride) en NaOH (natriumhydroxide).

[1] Kwik(II)chloride ($HgCl_2$) is een zeer toxische stof die met inachtneming van passende voorzorgsmaatregelen moet worden gehanteerd. Afvalwater dat deze stof bevat, moet op passende wijze worden afgevoerd en mag niet rechtstreeks in het rioleringsstelsel worden geloosd.

▼M6

31. De resterende parallelle BOD-flessen worden bij de testtemperatuur (15-20 °C) geïncubeerd, in het donker bewaard en met passende tussenpozen uit de incubatieruimte verwijderd (bijv. ten minste na 5, 15 en 28 dagen) en geanalyseerd op de aanwezigheid van opgeloste zuurstof (punt 33).

32. De monsters voor specifieke analyses worden met een membraanfilter (0,2–0,45 μm) gefiltreerd of gecentrifugeerd, gedurende 15 minuten (facultatief). De monsters worden gedurende maximaal 48 uren bij 2-4 °C of gedurende een langere periode bij -18 °C bewaard, als ze niet onmiddellijk worden geanalyseerd (indien bekend is dat de teststof hiervan geen effecten ondervindt, moet de zuurtegraad ervan worden aangepast tot pH 2, voordat de stof wordt opgeslagen).

Bepaling van het gehalte opgelost zuurstof

33. De concentratie opgeloste zuurstof wordt bepaald met behulp van een chemische of elektrochemische methode die nationaal of internationaal wordt erkend.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Bewerking van de resultaten

34. De analytische resultaten worden op de bijgevoegde gegevensformulieren (aanhangsel 5) genoteerd.

35. Het biologische zuurstofverbruik (BOD) wordt berekend als het verschil tussen de zuurstofdepletie tussen een blancomonster en een oplossing van de teststof onder de omstandigheden van de test. De nettozuurstofdepletie wordt gedeeld door de concentratie (w/v) van de stof om het BOD uit te drukken als mg BOD/mg teststof. De afbraak wordt gedefinieerd als de verhouding van het biochemische zuurstofverbruik tot hetzij, bij voorkeur, het theoretische zuurstofverbruik (ThOD), hetzij het chemische zuurstofverbruik (COD) en wordt uitgedrukt als een percentage (zie punt 36).

36. De biologische-afbraakwaarden voor ieder monsternametijdstip worden berekend voor zowel de test- als de referentiestof met behulp van een van onderstaande vergelijkingen:

$$\%\ biologische\ afbraak = \frac{mg\ O_2/mg\ geteste\ stof}{mg\ ThOD/mg\ geteste\ stof} \times 100$$

$$\%\ biologische\ afbraak = \frac{mg\ O_2/mg\ geteste\ stof}{mg\ COD/mg\ geteste\ stof} \times 100$$

waarin:

ThOD = theoretisch zuurstofverbruik (berekening, aanhangsel 3)

COD = chemisch zuurstofverbruik, experimenteel bepaald.

Opmerking: In sommige gevallen leiden de twee berekeningswijzen (percentage van het ThOD of percentage van het COD) niet tot dezelfde resultaten; ThOD moet bij voorkeur worden gebruikt, omdat bepaalde stoffen in de COD-test niet volledig worden geoxideerd.

37. Het verloop van de afbraak wordt inzichtelijk gemaakt in een diagram (zie voorbeeld in het onderdeel „Geldigheid en interpretatie van de resultaten"). Als er voldoende gegevens zijn, worden op basis van de curve voor biologische afbraak de aanloopfase (t_L) en de tijd die nodig is om 50 procent verwijdering te bereiken vanaf het einde van de aanloopfase (t_{50}) berekend.

38. Indien specifieke analyse wordt toegepast (facultatief), wordt het percentage voor primaire afbraak uitgedrukt als de procentuele verwijdering van de specifieke stof binnen de testperiode (gecorrigeerd voor analytische blanco's).

▼M6

Testverslag

39. Het testverslag moet de volgende informatie bevatten:

Teststof:

— fysische aard en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;

— identificatiegegevens.

Testomstandigheden:

— locatie en beschrijving van de monsternamelocatie; status in termen van verontreiniging en nutriënten (kolonietelling, nitraat, ammonium, fosfaat indien van toepassing);

— kenmerken van het monster (datum van monstername, diepte, voorkomen, temperatuur, zoutgehalte, DOC (facultatief), vertraging tussen monstername en gebruik in de test);

— voor veroudering van het zeewater gebruikte methode (indien van toepassing);

— voor voorbehandeling van het zeewater gebruikte (filtratie/bezinking);

— voor de COD-bepaling gebruikte methode (indien uitgevoerd);

— voor de zuurstofmetingen gebruikte methoden;

— dispersieprocedure voor stoffen die moeilijk oplosbaar zijn onder de testomstandigheden;

— voor de bepaling van het aantal heterotrofen in het zeewater gebruikte methode (tellen van plaatjes of andere procedure);

— voor de bepaling van DOC in zeewater gebruikte methode (facultatief);

— voor specifieke analyse gebruikte methode (facultatief);

— andere facultatieve methoden die zijn gebruikt om de kenmerken van het zeewater vast te leggen (ATP-metingen, enz.).

Resultaten:

— op een gegevensformulier (bijgevoegd, aanhangsel 5) gerapporteerde analytische gegevens;

— het verloop van de afbraaktest, schematisch weergegeven in een diagram dat de aanloopfase (t_L) toont evenals de helling en tijd (beginnend vanaf het einde van de aanloopfase) benodigd om 50 procent van de door oxidatie van de teststof veroorzaakte uiteindelijke zuurstofopname te bereiken (t_{50}). De aanloopfase kan grafisch worden geschat zoals getoond in de bijgevoegde figuur of kan gemakkelijk worden berekend als de tijd die nodig is om 10 procent afbraak te bereiken;

— na 28 dagen gemeten procentuele afbraak.

Bespreking van de resultaten.

Geldigheid en interpretatie van de resultaten

40. De ademhaling in de blancotest mag niet hoger zijn dan 30 procent van de zuurstof in de testfles. Ingeval het niet mogelijk is om aan dit criterium te voldoen met vers verzameld zeewater, moet het zeewater verouderen (stabiliseren) alvorens het gebruikt kan worden.

41. Er moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid dat stikstofhoudende stoffen de resultaten beïnvloeden.

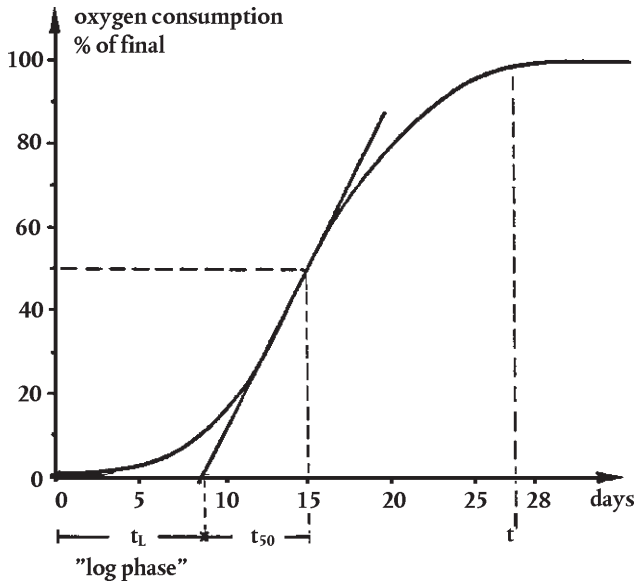
▼M6

42. Resultaten die met de referentiestoffen natriumbenzoaat en aniline zijn verkregen, moeten kunnen worden vergeleken met de in de ringtest (3) verkregen resultaten (punt 9). Indien met referentiestoffen behaalde resultaten atypisch zijn, moet de test worden herhaald met gebruikmaking van een ander zeewatermonster.

43. De teststof kan worden geacht remmend te werken op bacteriën (bij de gebruikte concentratie), indien het BOD van het mengsel van referentiestoffen lager is dan de som van het BOD van de afzonderlijke oplossingen van de twee stoffen.

44. Gezien de relatief hoge testconcentraties in vergelijking met de meeste natuurlijke systemen en daardoor de ongunstige verhouding tussen de concentraties teststof en andere koolstofbronnen, moet de methode worden beschouwd als een voorlopige test die kan worden gebruikt om aan te geven of een stof al dan niet gemakkelijk biologisch afbreekbaar is. Dienovereenkomstig hoeft een laag resultaat niet noodzakelijkerwijs te betekenen dat de teststof niet biologisch afbreekbaar is in mariene omgevingen, maar duidt het op de noodzaak om meer werk te verrichten teneinde dit vast te stellen.

Een voorbeeld van een theoretisch afbraakexperiment dat een haalbare manier toont om de waarden te schatten van tL (duur van „aanloopfase") en t_{50}, het tijdsinterval (beginnend bij tL) dat nodig is om 50 procent van de door oxidatie van de teststof veroorzaakte uiteindelijke zuurstofopname te bereiken, wordt gegeven in onderstaande figuur:



LITERATUUR

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Hoofdstuk C.4-B van deze bijlage: Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid, deel III van de gewijzigde OESO-screeningtest.

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Eindverslag van het ringtestprogramma 1984–1985, maart 1987, Commissie van de Europese Gemeenschappen.

(4) Hoofdstuk C.11 van deze bijlage: Biologische afbraak — Actief slib: ademhalingsremmingstest.

(5) Hoofdstuk C.4-E van deze bijlage: Bepaling van de „gemakkelijke" biologische afbreekbaarheid, deel VI Gesloten-flestest.

▼M6

Aanhangsel 1

Bepaling van organische koolstof in zeewater

SCHUDFLESMETHODE

Voor de bepaling van het gehalte organische koolstof van een watermonster worden de organische verbindingen in het monster geoxideerd tot koolstofdioxide, waarbij over het algemeen een van onderstaande drie technieken wordt gebruikt:

— natte oxidatie door middel van persulfaat/UV-bestraling;

— natte oxidatie door middel van persulfaat/hogere temperatuur (116-130 °C);

— verbranding.

De CO_2-ontwikkeling wordt gekwantificeerd door gebruik te maken van infraroodspectrometrie of titratie. Een andere mogelijkheid is CO_2 te reduceren tot methaan, dat vervolgens wordt gekwantificeerd op een vlamionisatiedetector (flame ionization detector, FID).

De persulfaat/UV-methode wordt gewoonlijk gebruikt voor de analyse van „schoon” water met een lage concentratie vaste deeltjes. De twee laatstgenoemde methoden kunnen worden toegepast op de meeste soorten watermonsters, waarbij de oxidatiemethode met persulfaat/hogere temperatuur het geschiktst is voor monsters met lage concentraties en de verbrandingstechniek toegepast kan worden op monsters met een gehalte niet-vluchtige organische koolstof (non-volatile organic carbon, NVOC) van ruim meer dan 1 mg C/l.

Interferenties

De drie methoden zijn alle gebaseerd op de verwijdering of compensatie van anorganische koolstof (inorganic carbon, IC) die in het monster aanwezig is. Het onttrekken van CO_2 aan het aangezuurde monster is de vaakst gebruikte methode voor het verwijderen van de IC, hoewel dit ook leidt tot een verlies van vluchtige organische verbindingen (1). De volledige verwijdering of compensatie van IC moet worden gewaarborgd voor iedere monstermatrix en het gehalte vluchtige organische koolstof (volatile organic carbon, VOC) moet worden bepaald in aanvulling op het gehalte NVOC, afhankelijk van het type monster.

Hoge chlorideconcentraties leiden tot verminderde oxidatie-efficiëntie wanneer de persulfaat/UV-methode wordt gebruikt (2). Echter, door een oxidatiereagens te gebruiken dat is aangepast door de toevoeging van kwik(II)nitraat, kan deze interferentie worden uitgesloten. Aanbevolen wordt dat het maximaal toegestane monstervolume wordt gebruikt om ieder type chloridehoudend monster te evalueren. Hoge zoutconcentraties in monsters die worden geanalyseerd met de verbrandingsmethode kunnen een zoutafzetting op de katalysator en buitensporige corrosie van de verbrandingsbuis veroorzaken. Voorzorgsmaatregelen moeten worden getroffen overeenkomstig de handleiding van de fabrikant.

Bij zeer troebele monsters en bij monsters die deeltjes bevatten, kan onvolledige oxidatie plaatsvinden wanneer de persulfaat/UV-methode wordt gebruikt.

Een voorbeeld van een geschikte methode

Niet-vluchtige organische koolstof wordt bepaald door oxidatie met persulfaat/UV-bestraling en vervolgens de kwantificering van de CO_2-ontwikkeling met behulp van niet-dispergerende infraroodspectrometrie.

Het oxidatiereagens wordt aangepast overeenkomstig de in (2) gegeven aanwijzingen, als beschreven in de handleiding van de fabrikant:

a) 8,2 g $HgCl_2$ en 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ wordt opgelost in enkele honderden milliliters reagenswater met een laag koolstofgehalte.

b) 20 g $K_2S_2O_8$ wordt opgelost in de kwikzoutoplossing.

▼M6

c) 5 ml HNO_3 (geconc.) wordt aan het mengsel toegevoegd.

d) het reagens wordt verdund tot 1 000 ml.

De interferentie door chloride wordt uitgesloten door een monstervolume van 40 µl voor 10 procent chloride te gebruiken en een monstervolume van 200 µl voor 1,9 procent chloride. Monsters met hoge chlorideconcentraties en/of grotere monstervolumes kunnen met deze methode worden geanalyseerd, mits voorkomen wordt dat chloride wordt gevormd in het oxidatievat. De bepaling van vluchtige organische koolstof kan vervolgens worden uitgevoerd, indien relevant, voor het type monster in kwestie.

LITERATUUR

(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, 16th edition, 1985.

Tevens van belang (geeft een beschrijving van een autoanalysesysteem):

(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

Aanhangsel 2

Biologische afbraak in zeewater

SCHUDFLESMETHODE

GEGEVENSFORMULIER

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST:**

3. **TESTSTOF:**

Naam:

Concentratie stamoplossing: mg/l als vaste stof

Initiële concentratie in medium, t_o: mg/l als vaste stof

: mg DOC/l

4. **ZEEWATER:**

Bron:

Datum van monstername:

Monsternemingsdiepte:

Voorkomen op moment van monstername (bijv. troebel, enz.):

Zoutgehalte bij monstername: ‰

Temperatuur bij monstername: °C

DOC „x” uren na de monstername mg/l

Voorbehandeling voorafgaand aan test (bijv. filtratie, bezinken, veroudering, enz.):

Telling microbiële kolonies — oorspronkelijk monster: kolonies/ml

— bij het begin van de test: kolonies/ml

Overige kenmerken

5. **KOOLSTOFBEPALINGEN:**

Koolstofanalyseapparaat:

	Flesnr.		DOC na dagen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: met nutriënten verrijkt zeewater met de teststof	1	a_1					
		a_2					
		gemiddelde, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		gemiddelde, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Flesnr.		DOC na dagen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Blanco: met nutriënten verrijkt zeewater zonder de teststof	1	c_1					
		c_2					
		gemiddelde, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		gemiddelde, $C_{d(t)}$					
	gemiddelde, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUATIE VAN VERKREGEN GEGEVENS:**

Flesnr.	Berekening van de resultaten	% afbraak na n dagen				
		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				
Gemiddelde (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Van D_1 en D_2 mag geen gemiddelde worden berekend als er een groot verschil is.

Opmerking: Een soortgelijk schema kan worden gebruikt wanneer de afbraak wordt gevolgd met behulp van specifieke analyse en voor de referentiestof en toxiciteitscontroles.

7. **NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK (facultatief)**

	Tijd (dagen)	
	0	t
DOC-conc. (mg/l) in steriele controle	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ niet - biologische\ afbraak = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼M6

Aanhangsel 3

Berekening van het theoretische biochemische zuurstofverbruik

GESLOTEN-FLESMETHODE

Het ThOD van de stof $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ met molecuulgewicht MW wordt als volgt berekend:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Deze berekening impliceert dat C wordt gemineraliseerd tot CO_2 en H tot H_2O, P tot P_2O_5 en Na tot Na_2O. Halogeen wordt verwijderd als waterstofhalogenide en stikstof als ammoniak.

Voorbeeld:

Glucose $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \ \ mg\ O_2/mg\ glucose$$

Het molecuulgewicht van andere zouten dan die van de alkalimetalen wordt berekend op basis van de aanname dat de zouten gehydrolyseerd zijn.

Zwavel wordt verondersteld zeswaardig te zijn geoxideerd.

Voorbeeld:

Natrium n-dodecylbenzeensulfonaat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \ \ mg\ O_2/mg\ stof$$

Bij stikstofhoudende verbindingen kan de stikstof worden verwijderd als ammoniak, nitriet of nitraat afhankelijk van de waarde van het theoretische biochemische zuurstofverbruik.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

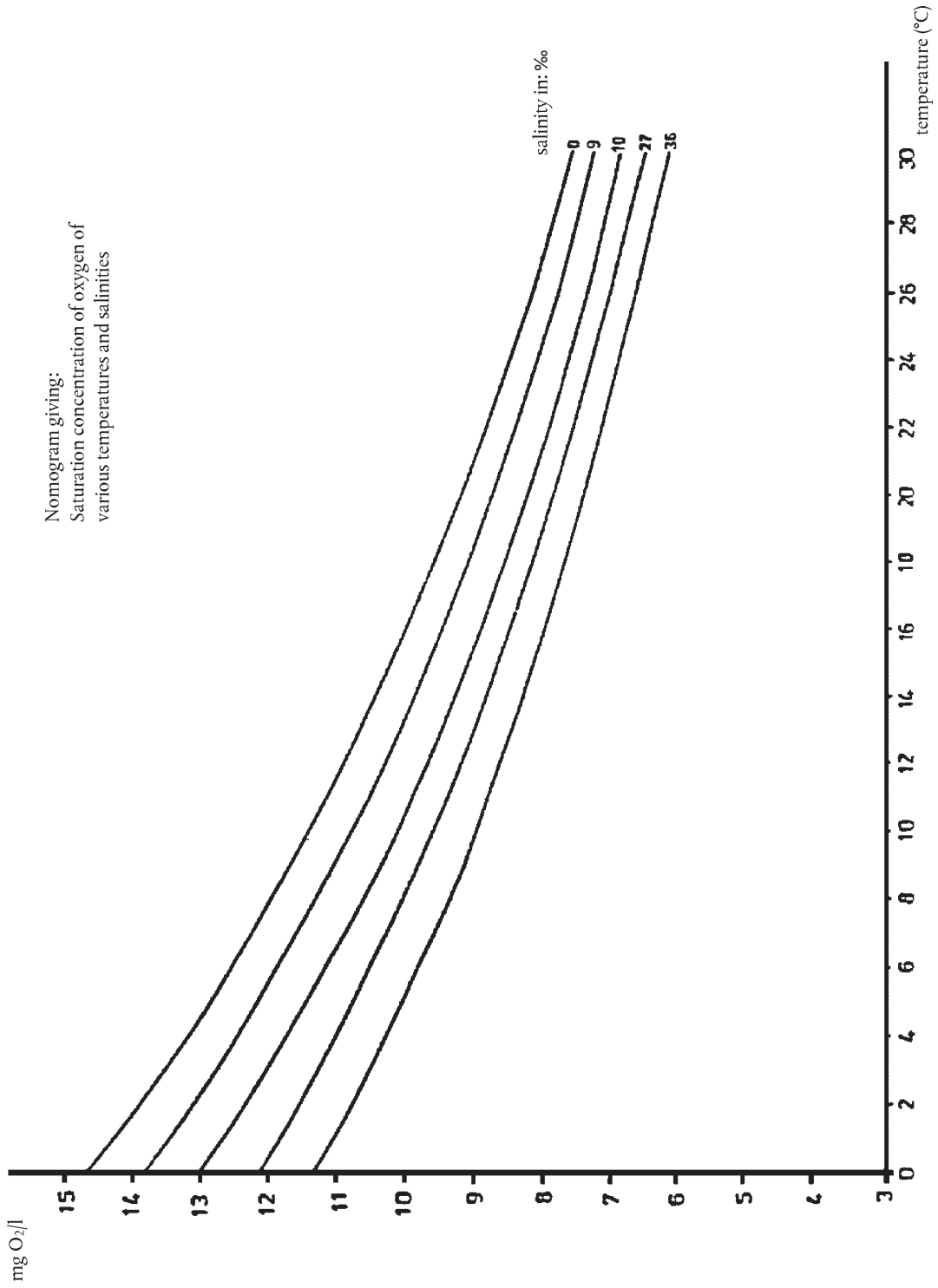
Stel dat tijdens een analyse volledige nitraatvorming zou zijn waargenomen in geval van een secundair amine:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \ \ mg\ O_2/mg\ stof$$

▼**M6**

Aanhangsel 4



▼M6

Aanhangsel 5

Biologische afbraak in zeewater

GESLOTEN-FLESMETHODE

GEGEVENSFORMULIER

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST:**

3. **TESTSTOF:**

Naam:

Concentratie stamoplossing:	mg/l
Initiële conc. in zeewatermedium:	mg/l
ThOD of COD:	mg O_2/mg teststof

4. **ZEEWATER:**

Bron:

Datum van winning:

Monsternemingsdiepte:

Voorkomen op moment van monstername (bijv. troebel, enz.):

Zoutgehalte bij monstername:	‰
Temperatuur bij monstername:	°C
DOC „x” uren na de monstername	mg/l

Voorbehandeling voorafgaand aan test (bijv. filtratie, bezinken, veroudering, enz.):

Telling microbiële kolonies	— oorspronkelijk monster:	kolonies/ml
	— bij het begin van de test:	kolonies/ml

Overige kenmerken:

5. **TESTMEDIUM:**

Temperatuur na beluchting:	°C
O_2-concentratie na beluchting en status voor het begin van de test:	mg O_2/l

6. **DO-BEPALING:**

Methode: Winkler/elektrode

	Flesnr.		mg O_2/l na n dagen			
			0	5	15	28
Test: met nutriënten verrijkt zeewater met de teststof	1	a_1				
	2	a_2				
	Gemiddelde test	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Flesnr.		mg O_2/l na n dagen			
			0	5	15	28
Blanco: met nutriënten verrijkt zeewater, maar zonder de teststof	1	c_1				
	2	c_2				
	Gemiddelde blanco	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Opmerking: Een soortgelijk schema kan worden gebruikt voor de referentiestof en de toxiciteitscontroles.

7. **DO-AFNAME: % AFBRAAK (% D):**

	DO-afname na n dagen		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{teststof\,(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Hierbij wordt verondersteld dat $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, waarbij
$m_{b(o)}$ = blancowaarde op dag 0,
$m_{t(o)}$ = teststofwaarde op dag 0.
Indien $m_{b(o)}$ niet gelijk is aan $m_{t(o)}$, moet worden gebruikt: $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, waarbij
$m_{b(x)}$ = blancowaarde op dag x,
$m_{t(x)}$ = teststofwaarde op dag x.

▼M6

C.43. ANAEROBE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN ORGANISCHE STOFFEN IN UITGEGIST SLIB: DOOR METING VAN DE GASPRODUCTIE

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan OESO-testrichtsnoer (TG) 311 (2006). Er is een aantal screeningtests voor de beoordeling van de aerobe biologische afbreekbaarheid van organische stoffen (testmethoden C.4, C.9, C.10 en C.11 (1) alsmede OESO TG 302C (2)) en de resultaten van de toepassing van deze tests zijn met succes gebruikt om het lot van stoffen in het aerobe milieu te voorspellen, in het bijzonder in de aerobe fasen van rioolwaterzuivering. Diverse gehalten niet in water oplosbare stoffen en stoffen die adsorberen op vaste afvalstoffen, worden tevens op aerobe wijze behandeld, aangezien ze in gezuiverd afvalwater voorkomen. Echter, deze stoffen worden voor het grootste deel gebonden aan het primaire gezuiverde afvalwater, dat van het onbehandelde afvalwater wordt gescheiden in bezinkingstanks, voordat het gezuiverde, of bovenliggende, afvalwater aeroob wordt gezuiverd. Het slib, dat enkele van de oplosbare stoffen in het poriewater heeft, wordt vervolgens naar verwarmde gistingstanks overgeheveld voor anaerobe zuivering. Vooralsnog zijn er geen tests in deze serie voor de beoordeling van de anaerobe biologische afbreekbaarheid in anaerobe gistingstanks en deze test is bedoeld om dit hiaat te vullen; de test is niet noodzakelijkerwijs toepasbaar op andere anoxische milieucompartimenten.

2. Respirometrische technieken die de geproduceerde hoeveelheden gas, hoofdzakelijk methaan (CH_4) en koolstofdioxide (CO_2), meten onder anaerobe omstandigheden zijn met succes gebruikt voor de beoordeling van de anaerobe biologische afbreekbaarheid. Birch et al (3) hebben deze procedures geëvalueerd en kwamen tot de conclusie dat het werk van Shelton en Tiedje (4), dat is gebaseerd op eerdere onderzoeken (5)(6)(7), het meest uitgebreid was. De methode (4), die verder is ontwikkeld door anderen (8) en die de Amerikaanse normen (9)(10) is geworden, loste niet de problemen op met betrekking tot de verschillende oplosbaarheid van CO_2 en CH_4 in het testmedium en de berekening van de theoretische gasproductie van een teststof. Het ECETOC-rapport (3) bevatte als aanbeveling de aanvullende meting van het gehalte opgeloste anorganische koolstof (DIC) van de bovenliggende vloeistof, waardoor de techniek breder toepasbaar werd. De ECETOC-methode werd onderworpen aan een internationale kalibratieexercitie (of ringtest) en is de ISO-norm ISO 11734 (11) geworden.

3. De onderhavige testmethode, die is gebaseerd op ISO 11734 (11), beschrijft een screeningmethode voor de beoordeling van de mogelijke anaerobe biologische afbreekbaarheid van organische stoffen onder specifieke omstandigheden (d.w.z. in een anaerobe gistingstank op een bepaald moment en binnen een bepaald concentratiebereik van micro-organismen). Omdat verdund slib met een relatief hoge concentratie teststof wordt gebruikt en de duur van de test gewoonlijk langer is dan de retentietijd in anaerobe gistingstanks, komen de omstandigheden van de test niet noodzakelijkerwijs overeen met de omstandigheden in anaerobe gistingstanks, noch is de test toepasbaar voor de beoordeling van anaerobe biologische afbreekbaarheid onder andere milieuomstandigheden. Slib wordt aan de teststof blootgesteld gedurende maximaal 60 dagen, wat langer is dan de normale slibretentietijd (25 tot 30 dagen) in anaerobe gistingstanks, hoewel de retentietijd op industriële locaties veel langer kan zijn. Op basis van de resultaten van deze test kunnen niet zo overtuigend als in het geval van aerobe biologische afbraak voorspellingen worden gedaan, aangezien het bewijs dat wordt verzameld over het gedrag van de teststof in „uitontwikkelde” aerobe tests alsmede in simulatietests en het aerobe milieu voldoende is om met overtuiging een verband vast te kunnen stellen; voor het anaerobe milieu bestaat er weinig soortgelijk bewijs. Volledige anaerobe biologische afbraak kan

▼M6

geacht worden te hebben plaatsgevonden, indien een theoretische gasproductie van 75 %-80 % bereikt wordt De hoge verhoudingen van stof ten opzichte van biomassa die in deze tests worden toegepast, betekenen dat de stof die de test doorstaat meer kans heeft om in een anaerobe gistingstank te worden afgebroken. Daarnaast is het mogelijk dat stoffen die in de test niet in gas worden omgezet, bij meer milieurealistische stof-biomassaverhoudingen alsnog worden verwijderd. Ook treden er andere anaerobe reacties op waardoor stoffen in elk geval gedeeltelijk worden afgebroken, bijv. door dechlorinatie, maar deze test detecteert dergelijke reacties niet. Echter, door de toepassing van specifieke analysemethoden voor de bepaling van de teststof, kan het verdwijnen ervan worden gevolgd (zie punt 6, 30, 44 en 53).

PRINCIPE VAN DE TEST

4. Gewassen uitgegist slib ([1]), dat lage (< 10 mg/l) concentraties anorganische koolstof (IC) bevat, wordt met ongeveer een factor tien verdund tot een totale concentratie vaste stof van 1 g/l tot 3 g/l en geïncubeerd bij 35 °C ± 2 °C in luchtdicht afgesloten vaten met de teststof in een concentratie van 20 tot 100 mg C/l gedurende maximaal 60 dagen. De activiteit van het slib wordt hierbij gemeten door parallelle blancocontroles uit te voeren met slibentmateriaal in het medium, maar zonder de teststof.

5. De stijging van de gasruimtedruk in de vaten die het gevolg is van de productie van koolstofdioxide en methaan wordt gemeten. Veel van de geproduceerde CO_2 zal onder de testomstandigheden in de vloeibare fase worden omgezet in carbonaat of waterstofcarbonaat. Deze anorganische koolstof wordt gemeten aan het einde van de test.

6. De hoeveelheid koolstof (anorganisch plus methaan) die het resultaat is van de biologische afbraak van de teststof, wordt berekend aan de hand van de overmaat van de nettogasproductie en netto-IC-vorming in de vloeibare fase ten opzichte van de bij de blancocontroles gemeten waarden. De mate van biologische afbraak wordt berekend aan de hand van de totale IC- en methaanproductie als percentage van de gemeten of berekende hoeveelheid koolstof die als teststof is toegevoegd. Het verloop van de biologische afbraak kan worden gevolgd door tussentijdse metingen uit te voeren voor alleen de gasproductie. Daarnaast kan de primaire biologische afbraak worden bepaald door specifieke analysen aan het begin en einde van de test.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

7. De zuiverheid, oplosbaarheid in water, vluchtigheid en adsorptie-eigenschappen van de teststof moeten bekend zijn om de resultaten goed te kunnen interpreteren. Het gehalte aan organische koolstof (gewichtspercent) van de teststof moet bekend zijn, hetzij op basis van de chemische structuur ervan, hetzij door het te meten. Voor vluchtige teststoffen is een gemeten of berekende constante van de wet van Henry nuttig om te bepalen of de test toepasbaar is. Informatie over de toxiciteit van de teststof voor anaerobe bacteriën is nuttig voor het kiezen van de juiste testconcentratie en voor het interpreteren van resultaten die op slechte biologische afbreekbaarheid duiden. Aanbevolen wordt om de remmingscontrole uit te voeren, tenzij bekend is dat de teststof geen remmend effect heeft op microbiële activiteiten (zie punt 21 en ISO 13641-1 (12)).

([1]) Uitgegist slib is een mengsel van de gezuiverde fasen van afvalwater en actief slib, die geïncubeerd zijn in een anaerobe gistingstank bij ongeveer 35 °C om biomassa en geurproblemen te reduceren en om het ontwaterende vermogen van het slib te verbeteren. Het bestaat uit een verbinding van anaerobe fermentatieve bacteriën en methaanbacteriën die koolstofdioxide en methaan produceren (11).

▼M6

TOEPASBAARHEID VAN DE TESTMETHODE

8. De testmethode kan worden toegepast op in water oplosbare stoffen en kan tevens worden toegepast op slecht oplosbare en onoplosbare stoffen, mits een methode voor exacte dosering wordt toegepast, zie bijv. ISO 10634 (13). Over het algemeen moet voor vluchtige stoffen per geval een beslissing worden genomen. Mogelijk moeten speciale maatregelen worden getroffen om, bijvoorbeeld, tijdens de test geen gas te laten ontsnappen.

REFERENTIESTOFFEN

9. Ter controle van de procedure wordt een referentiestof getest door parallelle geschikte vaten op te stellen als onderdeel van de gewone proeven. Voorbeelden van referentiestoffen zijn fenol, natriumbenzoaat en polyethyleenglycol 400, die naar verwachting worden afgebroken met een theoretische gasproductie van meer dan 60 % (d.w.z. methaan en anorganische koolstof) binnen 60 dagen (3)(14).

REPRODUCEERBAARHEID VAN TESTRESULTATEN

10. In een internationale ringtest (14) was er tussen triplovaten een goede reproduceerbaarheid van de gasdrukmetingen. De relatieve standaardafwijking (variatiecoëfficiënt, COV) bleef voornamelijk onder 20 %, hoewel deze waarde vaak steeg tot > 20 % in de aanwezigheid van toxische stoffen of aan het einde van de incubatieperiode van 60 dagen. Hogere afwijkingen werden ook aangetroffen in vaten met een volume < 150 ml. De uiteindelijke pH-waarden van de testmedia lagen binnen het bereik 6,5-7,0.

11. De volgende resultaten werden verkregen in de ringtest.

Teststof	Totale gegevens n_1	Gemiddelde afbraak (van totale gegevens) (%)	Relatieve standaardafwijking (van totale gegevens) (%)	Geldige gegevens n_2	Gemiddelde afbraak (van geldige gegevens) (%)	Relatieve standaardafwijking (van geldige gegevens) (%)	Gegevens >60 % afbraak in geldige tests n_3
Palmitinezuur	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyetheen Glycol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Gehalte van n_2

12. De variatiecoëfficiënten (COV's) van het gemiddelde voor alle waarden die werden verkregen met palmitinezuur en polyethyleenglycol 400 waren niet minder dan respectievelijk 45 % (n = 36) en 35 % (n = 38). Wanneer waarden van < 40 % en > 100 % werden weggelaten (eerstgenoemde waarden werden verondersteld verband te houden met minder dan optimale omstandigheden, laatstgenoemde waarden hadden een onbekende oorzaak), werden de COV's verlaagd tot respectievelijk 26 % en 23 %. Het aandeel van „geldige” waarden die ten minste 60 % afbraak vertegenwoordigden, was 70 % voor palmitinezuur en 83 % voor polyethyleenglycol 400. Het aandeel van de procentuele biologische afbraak dat werd verkregen met DIC-metingen was relatief laag, maar variabel. Voor palmitinezuur was het bereik 0-35 %, het gemiddelde 12 %, met een COV van 92 %, en voor polyethyleenglycol 400 was het bereik 0-40 %, het gemiddelde 24 %, met een COV van 54 %.

BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Apparatuur

13. Vereist zijn een standaard-laboratoriumuitrusting en het volgende:

a) incubator — vonkvrij en met een constant gehouden temperatuur van 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b) drukbestendige glazen testvaten van een geschikte nominale grootte ([1]), elk voorzien van een gasdicht septum, bestand tegen ongeveer 2 bar. Het gasruimtevolume moet ongeveer 10 % tot 30 % van het totale volume uitmaken. Indien biogas regelmatig wordt afgelaten, is een gasruimtevolume van ongeveer 10 % geschikt, maar als het gas alleen aan het einde van de test wordt afgelaten, wordt 30 % aanbevolen. Glazen serumflessen met een nominale inhoud van 125 ml, met een totale inhoud van ongeveer 160 ml, verzegeld met serumsepta ([2]) en aluminium krimpringen worden aanbevolen, indien de druk bij ieder monsternamemoment wordt afgelaten.

c) drukmeetapparaat ([3]) dat is aangepast om het meten en laten wegstromen van geproduceerd gas mogelijk te maken, bijvoorbeeld een met de hand bediende precisiedrukmeter verbonden met een geschikte injectienaald; een gasdicht driewegventiel vergemakkelijkt het laten ontsnappen van overdruk (aanhangsel 1). De interne inhoud van de druktransductorslang en het ventiel moet zo laag mogelijk worden gehouden, zodat fouten die worden ingevoerd door het volume van de apparatuur, insignificant zijn;

Opmerking — De standen van de drukmeter worden rechtstreeks gebruikt om de hoeveelheid in de gasruimte geproduceerde koolstof te berekenen (punten 42 tot en met 44). Een andere mogelijkheid is de standen van de drukmeter om te rekenen naar volumes (bij 35 °C, atmosferische druk) met behulp van een omrekeningsgrafiek. Deze grafiek wordt opgebouwd met gegevens die worden verkregen door bekende volumes stikstofgas te injecteren in een reeks testvaten (bijv. serumflessen) bij 35° +/- 2 °C en de resulterende gestabiliseerde drukmeterstanden te rapporteren (zie aanhangsel 2). De berekening wordt getoond in punt 44.

Waarschuwing — Micro-injectiespuiten moeten zorgvuldig worden gehanteerd om prikletsel te voorkomen.

d) koolstofanalyseapparaat dat geschikt is voor de directe bepaling van het gehalte anorganische koolstof in het bereik van 1 mg/l tot 200 mg/l;

e) hoogprecisie-injectienaalden voor gasvormige en vloeibare monsters;

f) magneetroerders en roerbonen (facultatief);

g) handschoenkast (aanbevolen).

Reagentia

14. Er moet steeds gebruik worden gemaakt van analytisch zuivere reagentia.

([1]) De aanbevolen grootte is 0,1 tot 1 liter.

([2]) Het gebruik van gasdichte siliconen septa wordt aanbevolen. Voorts wordt aanbevolen dat de gasdichtheid van doppen, vooral septa van butylrubber, wordt getest, want verschillende commercieel verkrijgbare septa zijn onvoldoende gasdicht voor methaan en sommige septa blijven niet gasdicht wanneer ze onder de testomstandigheden met een naald worden doorstoken;

([3]) Het apparaat moet worden gebruikt en regelmatig worden gekalibreerd, overeenkomstig de aanwijzingen van de fabrikant. Als een drukmeter van de voorgeschreven kwaliteit wordt gebruikt, bijv. met een stalen membraan omhuld, hoeft in het laboratorium geen kalibratie plaats te vinden. De nauwkeurigheid van de kalibratie kan in het laboratorium worden gecontroleerd met een eenpuntsmeting bij 1×10^5 Pa op een drukmeter met een mechanisch display. Wanneer dit punt correct wordt gemeten, zal ook de lineariteit niet gewijzigd zijn. Als andere meetapparaten worden gebruikt (zonder gecertificeerde kalibratie door de fabrikant), wordt kalibratie over het gehele bereik met regelmatige intervallen aanbevolen (aanhangsel 2).

▼M6

Water

15. Gedistilleerd of gedeïoniseerd water (waaraan de zuurstof is onttrokken door uitwassen met stikstofgas dat minder dan 5 µl/l zuurstof bevat), met daarin minder dan 2 mg/l opgeloste organische koolstof (DOC).

Testmedium

16. Bereid het verdunde medium op zodanige manier dat het de volgende bestanddelen in de aangegeven hoeveelheden bevat:

Watervrij kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatriumwaterstoffosfaatdodecahydraat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Ammoniumchloride (NH_4Cl)	0,53 g
Calciumchloridedihydraat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Magnesiumchloridehexahydraat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
IJzer(II)chloridetetrahydraat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurine (zuurstofindicator)	0,001 g
Natriumsulfidenonahydraat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Stamoplossing van sporenelementen (facultatief, punt 18)	10 ml
Voeg gedeoxygeneerd water toe (punt 15)	tot 1 liter

Opmerking: Vers geleverd natriumsulfide moet worden gebruikt of natriumsulfide dat is gewassen en gedroogd voor het gebruik, om te waarborgen dat het voldoende reductiecapaciteit heeft. De test kan worden uitgevoerd zonder gebruik te maken van een handschoenkast (zie punt 26). In dat geval moet de uiteindelijke concentratie natriumsulfide in het medium worden verhoogd tot 0,20 g $Na_2S \times 9H_2O$ per liter. Natriumsulfide kan ook worden toegevoegd uit een geschikte anaerobe stamoplossing door het septum van de gesloten testvaten, omdat deze procedure het risico van oxidatie verkleint. Natriumsulfide kan worden vervangen door titanium(III)citraat, dat wordt toegevoegd door het septum van gesloten testvaten tot een uiteindelijke concentratie van 0,8 tot 1,0 mmol/l is bereikt. Titanium(III)citraat is een zeer effectief, laagtoxisch reductiemiddel, dat als volgt wordt bereid: Los 2,94 g trinatriumcitraatdihydraat op in 50 ml gedeoxygeneerd water (wat resulteert in een oplossing van 200 mmol/l) en voeg 5 ml titanium(III)chloride-oplossing (15 %, gewichtspercent) toe. Neutraliseer tot een pH 7 ± 0,2 met mineraal alkali en breng over in een geschikt vat onder een stroom stikstofgas. De concentratie van het titanium(III)citraat in deze stamoplossing is 164 mmol/l.

17. De componenten van het testmedium met uitzondering van het reductiemiddel (natriumsulfide of titanium(III)citraat) worden gemengd en de oplossing wordt net vóór het gebruik gedurende ongeveer 20 min uitgewassen met stikstofgas om zuurstof te verwijderen. Vervolgens wordt het juiste volume vers bereide oplossing van het reductiemiddel (bereid in gedeoxygeneerd water) net voor het gebruik van medium toegevoegd. De pH-waarde van het medium moet, indien nodig, worden aangepast met verdund anorganisch zuur of alkali tot 7 ± 0,2.

▼M6

Stamoplossing van sporenelementen (facultatief)

18. Aanbevolen wordt dat het testmedium de volgende sporenelementen bevat om anaerobe afbraakprocessen te verbeteren, met name indien lage concentraties (bijv. 1 g/l) entmateriaal worden gebruikt (11).

Mangaanchloridetetrahydraat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Boorzuur (H_3BO_3)	5 mg
Zinkchloride ($ZnCl_2$)	5 mg
Koper(II)chloride ($CuCl_2$)	3 mg
Natriummolybdaatdihydraat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kobaltchloridehexahydraat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikkelchloridehexahydraat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Natriumseleniet (Na_2SeO_3)	5 mg
Voeg gedeoxygeneerd water toe (punt 15)	tot 1 liter

Teststof

19. De teststof wordt toegevoegd als een stamoplossing, suspensie, emulsie, of rechtstreeks als vaste stof of vloeistof, of geabsorbeerd op een glasvezelfilter, totdat een concentratie van niet meer dan 100 mg/l organische koolstof is bereikt. Indien stamoplossingen worden gebruikt, wordt een geschikte oplossing bereid met water (punt 15) (waaraan eerder de zuurstof is onttrokken door uitwassen met stikstofgas) in een dusdanige concentratie dat het toegevoegde volume minder is dan 5 % van het totale volume van het reactiemengsel. De pH-waarde van de stamoplossing moet, indien nodig, worden aangepast tot 7 ± 0,2. Raadpleeg ISO 10634 (13) voor teststoffen die onvoldoende in water oplosbaar zijn. Indien een oplosmiddel wordt gebruikt, moet een aanvullende controleproef worden uitgevoerd, waarbij het oplosmiddel alleen wordt toegevoegd aan het geënte medium. Organische oplosmiddelen waarvan bekend is dat ze de methaanproductie remmen, zoals chloroform en koolstoftetrachloride, moeten worden vermeden.

Waarschuwing — Toxische stoffen en stoffen waarvan de eigenschappen niet bekend zijn, moeten met voorzichtigheid worden gehanteerd.

Referentiestoffen

20. Referentiestoffen zoals natriumbenzoaat, fenol en polyethyleenglycol 400 zijn met succes gebruikt om de procedure te controleren, waarbij ze binnen 60 dagen voor meer dan 60 % biologisch werden afgebroken. Een stamoplossing van de gekozen referentiestof wordt bereid (in water waaraan de zuurstof is onttrokken) op dezelfde wijze als bij de teststof en de pH-waarde wordt, indien nodig, aangepast tot 7 ± 0,2.

Remmingscontrole (conditioneel)

21. Om informatie te verkrijgen over de toxiciteit van de teststof voor anaerobe micro-organismen teneinde de geschiktste testconcentratie te vinden, wordt de teststof en referentiestof toegevoegd aan een vat met daarin het testmedium (zie punt 16), elk in dezelfde respectieve concentraties als de toegevoegde concentraties (zie de punten 19 en 20 en zie tevens ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Uitgegist slib

22. Verzamel uitgegist slib uit een gistingstank bij een rioolwaterzuiveringsinstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater zuivert. Het slib moet volledig worden gekarakteriseerd en de achtergrondinformatie ervan moet worden gerapporteerd (zie punt 54). Als het de bedoeling is om aangepast entmateriaal te gebruiken, kan uitgegist slib van een industriële waterzuiveringsinstallatie worden overwogen. Gebruik voor het verzamelen van het uitgegiste slib flessen met een brede hals, gemaakt van polyethyleen met een hoge dichtheid of een vergelijkbaar materiaal, dat kan uitzetten. Vul de flessen met slib tot ongeveer 1 cm onder de bovenrand van de flessen, sluit de flessen goed af, bij voorkeur met een veiligheidsafsluiter. Na vervoer naar het laboratorium kan het verzamelde slib direct worden gebruikt of in een gistingstank op laboratoriumschaal worden gebracht. Laat het overtallige biogas ontsnappen door de flessen met slib voorzichtig te openen. In plaats daarvan kan in het laboratorium bereid slib worden gebruikt als een bron van entmateriaal, maar daarvan kan het activiteitsspectrum negatief zijn beïnvloed.

Waarschuwing — Uitgegist slib produceert ontvlambare gassen die brand- en ontploffingsgevaar opleveren, en het bevat ook potentieel pathogene organismen. Neem dus passende voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van slib. Gebruik om veiligheidsredenen géén glazen vaten voor het verzamelen van slib.

23. Teneinde de achtergrondgasproductie en de invloed van de blancocontroles te verminderen kan worden overwogen om het slib vooraf te laten uitgisten. Laat, indien uitgisting vooraf nodig is, het slib uitgisten zonder toevoeging van nutriënten of substraten bij 35 °C ± 2 °C gedurende maximaal 7 dagen. Gebleken is dat uitgisting vooraf gedurende ongeveer 5 dagen doorgaans zorgt voor een optimale vermindering van de gasproductie van de blanco zonder onaanvaardbare stijgingen van de aanloop- of incubatieperioden tijdens de testfase of verlies van activiteit voor een klein aantal geteste stoffen.

24. Voor teststoffen die (naar verwachting) slecht biologisch afbreekbaar zijn, moet worden overwogen het slib vooraf bloot te stellen aan de teststof om entmateriaal te verkrijgen dat geschikter is. In een dergelijk geval wordt de teststof in een concentratie organische koolstof van 5 mg/l tot 20 mg/l toegevoegd aan het uitgegiste slib en gedurende maximaal twee weken geïncubeerd. Was het vooraf aan de teststof blootgestelde slib zorgvuldig uit vóór gebruik (zie punt 25) en rapporteer in het testverslag de omstandigheden van de blootstelling vooraf.

Entmateriaal

25. Het slib wordt kort vóór het gebruik uitgewassen (zie de punten 22 tot en met 24) om de IC-concentratie te verlagen tot minder dan 10 mg/l in de uiteindelijke testsuspensie. Het slib wordt gecentrifugeerd in luchtdicht afgesloten buizen (bijv. 3 000 g gedurende 5 min) en de bovenliggende vloeistof wordt afgetapt. De resulterende pellet wordt gesuspendeerd in medium waaraan de zuurstof is onttrokken (punten 16 en 17), centrifugeer de suspensie opnieuw en tap de bovenliggende vloeistof af. Als de IC-concentratie niet voldoende is verlaagd, kan de procedure voor het uitwassen van het slib maximaal twee keer worden herhaald. De micro-organismen lijken hiervan geen negatieve effecten te ondervinden. Tot slot wordt de pellet gesuspendeerd in het vereiste volume testmedium en wordt de concentratie van het totaal aan vaste stoffen bepaald [bijv. ISO 11923 (15)]. De uiteindelijke concentratie van het totaal aan vaste stoffen moet in het bereik van 1 g/l tot 3 g/l liggen (of ongeveer 10 % daarvan in onverdund uitgegist slib). Bovenstaande bewerkingen moeten op een dusdanige wijze worden uitgevoerd dat contact tussen het slib en zuurstof tot een minimum wordt beperkt (gebruik bijvoorbeeld een omgeving met stikstof).

▼M6

TESTPROCEDURE

26. De volgende initiële procedures moeten worden uitgevoerd om het contact tussen uitgegist slib en zuurstof zo minimaal als praktisch haalbaar is te houden. Hiertoe kan het bijvoorbeeld nodig zijn om te werken binnen een handschoenkast in een stikstofomgeving en/of om de flessen te spoelen met stikstof (4).

Voorbereiding van de test en de controlebepalingen

27. Prepareer ten minste triplotestvaten (zie punt 13-b) voor de teststof, blancocontroles, de referentiestof, remmingscontroles (facultatief) en drukregelkamers (facultatieve procedure) (zie de punten 7, 19 tot en met 21). Aanvullende vaten voor de beoordeling van de primaire biologische afbraak kunnen tevens worden geprepareerd. Dezelfde reeks blancocontroles kan worden gebruikt in dezelfde test, mits de gasruimtevolumes overeenkomen.

28. Bereid het verdunde entmateriaal alvorens het aan de vaten toe te voegen, bijvoorbeeld met behulp van een pipet met brede opening. Voeg aliquots van goed gemengd entmateriaal (punt 25) toe, zodat de concentratie van het totaal aan vaste stoffen dezelfde is in alle vaten (tussen 1 g/l en 3 g/l). Stamoplossingen van de test- en referentiestof worden toegevoegd na aanpassing van de pH-waarde tot 7 ± 0,2, indien nodig. De teststof en de referentiestof moeten worden toegevoegd met gebruikmaking van de geschiktste toedieningsweg (punt 19).

29. De testconcentratie van organische koolstof moet gewoonlijk tussen 20 en 100 mg/l liggen (punt 4). Indien de teststof toxisch is, moet de testconcentratie worden verlaagd tot 20 mg C/l of zelfs lager als alleen primaire biologische afbraak met specifieke analyses moet worden gemeten. Opgemerkt zij dat de variatie tussen de testresultaten toeneemt bij lagere testconcentraties.

30. Voor blancovaten wordt een gelijkwaardige hoeveelheid van de gebruikte draagstof toegevoegd om de teststof t doseren in plaats van een stamoplossing, suspensie of emulsie. Indien de teststof werd toegediend met gebruikmaking van glasvezelfilters of organische oplosmiddelen, moet voor de blanco's een filter worden toegevoegd of een hoeveelheid oplosmiddel die gelijkwaardig is aan de verdampte hoeveelheid. De teststof wordt in een extra duplovat gebracht voor de meting van de pH-waarde. De pH-waarde moet, indien nodig, tot 7 ± 0,2 worden aangepast met kleine hoeveelheden verdund anorganisch zuur of alkali. Dezelfde hoeveelheden neutraliserende middelen moeten aan alle testvaten worden toegevoegd. Deze toevoegingen zouden niet nodig moeten zijn, omdat de pH-waarde van de stamoplossingen van de teststof en de referentiestof reeds is aangepast (zie de punten 19 en 20). Als het de bedoeling is om de primaire biologische afbraak te meten, moet een geschikt monster worden genomen uit het pH-controlevat of uit een aanvullend testvat en moet de teststofconcentratie worden gemeten met behulp van specifieke analyses. Bedekte magneten kunnen worden toegevoegd aan alle vaten, als de reactiemengsels moeten worden geroerd (facultatief).

31. Gewaarborgd moet worden dat het totale volume van vloeistof V_l en het volume van gasruimte V_h gelijk zijn in alle vaten; noteer en rapporteer de waarden van V_l en V_h. Ieder vat moet luchtdicht worden afgesloten met een gasseptum en vanuit de handschoenkast (zie punt 26) worden overgebracht naar de incubator (zie punt 13-a).

▼M6

Onoplosbare teststoffen

32. Gewogen hoeveelheden slecht in water oplosbare stoffen worden rechtstreeks aan de geprepareerde vaten toegevoegd. Indien het gebruik van een oplosmiddel nodig is (zie punt 19), wordt de teststofoplossing of -suspensie overgebracht naar lege vaten. Laat, indien mogelijk, het oplosmiddel verdampen door stikstofgas door de vaten te laten stromen en voeg vervolgens de andere ingrediënten toe, namelijk verdund slib (punt 25) en zoveel van zuurstof ontdaan water als nodig is. Een aanvullend controlemonster voor het oplosmiddel moet tevens worden bereid (zie punt 19). Raadpleeg ISO 10634 (13) voor andere methoden om onoplosbare stoffen toe te voegen. Vloeibare teststoffen kunnen met een injectienaald worden toegevoegd aan de volledig geprepareerde en luchtdicht afgesloten vaten, indien verwacht wordt dat de initiële pH-waarde niet hoger zal zijn dan 7 ± 1; doseer anders zoals in het bovenstaande (zie punt 19) wordt omschreven.

Incubatie en gasdrukmetingen

33. De geprepareerde vaten worden gedurende 1 uur geïncubeerd bij 35 °C ± 2 °C voor equilibratie en om overtollig gas te laten ontsnappen naar de atmosfeer, door bijvoorbeeld elk vat afzonderlijk te schudden en de naald van de drukmeter (punt 13-c) door de afdichting te steken en de afsluiter te openen totdat de drukmeter de stand nul bereikt. Indien op dat moment, of bij het verrichten van tussentijdse metingen, de druk in de gasruimte lager is dan atmosferisch, moet stikstofgas worden toegevoegd om de atmosferische druk te herstellen. Sluit de afsluiter (zie punt 13-c) en zet de incubatie voort in het donker, waarbij gewaarborgd moet worden dat de temperatuur van alle onderdelen van de vaten constant wordt gehouden op het niveau van de gistingstemperatuur. Observeer de vaten na incubatie gedurende 24 to 48 uur. Vaten moeten worden afgekeurd, als de inhoud van de vaten een duidelijk roze verkleuring in de bovenliggende vloeistof vertoont, d.w.z. als resazurine (zie punt 16) heeft gezorgd voor een kleurverandering die duidt op de aanwezigheid van zuurstof (zie punt 50). Hoewel het systeem bestand is tegen kleine hoeveelheden zuurstof, kunnen hogere concentraties een ernstig remmend effect hebben op het verloop van anaerobe biologische afbraak. Het afkeuren van een enkel vat of van een reeks triplo's kan aanvaardbaar zijn, maar als meer bepalingen mislukken, moeten de experimentele procedures worden onderzocht en moet de test worden herhaald.

34. De inhoud van elk vat moet ten minste 2 of drie maal per week en kort voor iedere drukmeting zorgvuldig worden gemengd door enkele minuten te roeren of te schudden. Door schudden wordt het entmateriaal opnieuw gesuspendeerd en wordt gewaarborgd dat het gas zich in een staat van evenwicht bevindt. Alle drukmetingen moeten snel worden uitgevoerd, aangezien de temperatuur van de testvaten kan dalen, wat leidt tot onjuiste drukmeterstanden. Tijdens het meten van de druk moet de temperatuur van het gehele testvat met inbegrip van de gasruimte constant worden gehouden op het niveau van de gistingstemperatuur. De gasdruk kan bijvoorbeeld worden gemeten door de injectienaald die op de drukmeter is aangesloten door het septum te steken (punt 13-c). Voorkom dat water in de injectiespuit komt; als dit gebeurt, moeten de natte onderdelen worden afgedroogd en moet een nieuwe naald worden gemonteerd. De druk moet worden gemeten in millibar (zie punt 42). De gasdruk in de vaten kan periodiek, bijv. wekelijks, worden gemeten en facultatief kan het overtollige gas worden afgelaten naar de atmosfeer. Een andere mogelijkheid is de druk alleen aan het einde van de test te meten om de hoeveelheid geproduceerd biogas te bepalen.

35. Aanbevolen wordt dat tussentijdse drukmetingen worden uitgevoerd, omdat de stijging van de druk een richtsnoer vormt ten aanzien van de vraag wanneer de test kan worden beëindigd en omdat daardoor de kinetiek kan worden gevolgd (zie punt 6).

▼M6

36. Normaal gesproken wordt de test na een incubatieperiode van 60 dagen beëindigd, tenzij de curve voor biologische afbraak die wordt verkregen op basis van de drukmetingen voordien de plateaufase heeft bereikt. De plateaufase is de fase waarin de maximale afbraak is bereikt en de curve voor biologische afbraak afgevlakt is. Als de plateaufasewaarde minder dan 60 % is, is de interpretatie problematisch, omdat dit erop wijst dat slechts een deel van de molecuul gemineraliseerd is of dat er een fout is gemaakt. Indien aan het einde van de normale incubatieperiode gas wordt geproduceerd, maar een plateaufase duidelijk nog niet is bereikt, moet worden overwogen om de test te verlengen teneinde te controleren of de plateaufasewaarde (> 60 %) alsnog wordt bereikt.

Meting van anorganische koolstof

37. Laat het slib aan het einde van de test na de laatste gasdrukmeting bezinken. Open elk vat en neem onmiddellijk een monster voor de bepaling van de concentratie (mg/l) van de anorganische koolstof (IC) in de bovenliggende vloeistof. De bovenliggende vloeistof mag noch worden gecentrifugeerd noch gefiltreerd, aangezien dit zou leiden tot een onaanvaardbaar verlies van opgelost koolstofdioxide. Indien de vloeistof na bemonstering niet kan worden geanalyseerd, moet deze in een gesloten fles zonder gasruimte opgeslagen en gedurende 2 dagen gekoeld worden bij ongeveer 4 °C. Na de IC-meting wordt de pH-waarde gemeten en gerapporteerd.

38. In plaats daarvan kan de IC in de bovenliggende vloeistof indirect worden bepaald door de opgeloste IC af te laten als koolstofdioxide dat in de gasruimte kan worden gemeten. Na de laatste meting van de gasdruk wordt de gasdruk in elk testvat aangepast tot de atmosferische druk. De inhoud van elk testvat wordt aangezuurd tot ongeveer pH 1 door geconcentreerd anorganisch zuur (bijv. H_2SO_4) toe te voegen door het septum van de gesloten vaten. De geschudde vaten worden bij 35 °C ± 2 °C gedurende ongeveer 24 uur geïncubeerd en de gasdruk die het gevolg is van de koolstofdioxideontwikkeling wordt met de drukmeter gemeten.

39. Voer soortgelijke metingen uit voor de bijbehorende blanco, referentiestof en, indien van toepassing, remmingscontrolevaten (zie punt 21).

40. In sommige gevallen, met name indien dezelfde controlevaten worden gebruikt voor verschillende teststoffen, moeten tussentijdse metingen van de IC-concentraties in de test- en controlevaten worden overwogen, voor zover van toepassing. In dat geval moet een voldoende aantal vaten worden geprepareerd voor alle tussentijdse metingen. Deze procedure verdient de voorkeur boven monstername uit slechts één vat. Laatstgenoemde methode mag alleen worden toegepast, indien het voor DIC-analyse vereiste volume niet te hoog wordt geacht. De DIC-meting moet na het meten van de gasdruk zonder aflaten van overtollig gas als volgt worden uitgevoerd:

— een zo klein mogelijk volume van een monster van de bovenliggende vloeistof wordt met een injectiespuit door het septum in de vaten gebracht zonder deze te openen, waarna het IC-gehalte in het monster wordt bepaald;

— na het inbrengen van het monster wordt het overtollige gas al dan niet afgelaten;

— hierbij moet rekening worden gehouden met het feit dat zelfs een kleine vermindering van het volume van de bovenliggende vloeistof (bijv. ongeveer 1 %) kan leiden tot een significante toename van het gasruimtevolume (V_h);

— de vergelijkingen (zie punt 44) worden gecorrigeerd door V_h in vergelijking 3 zo nodig te verhogen.

▼M6

Specifieke analysen

41. Indien het de bedoeling is om primaire anaerobe afbraak te (zie punt 30) te bepalen, wordt een monster van voldoende volume genomen voor specifieke analysen aan het begin en aan het einde van de test uit de vaten die de teststof bevatten. Als dit wordt gedaan, moeten de volumes van de gasruimte (V_h) en van de vloeistof (V_l) worden veranderd en moet hiermee rekening worden gehouden bij de berekening van de gasproductieresultaten. Een andere mogelijkheid is monsters voor specifieke analysen te nemen uit aanvullende mengsels die eerder voor dit doel zijn bereid (punt 30).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Bewerking van de resultaten

42. Om praktische redenen moet de druk van het gas worden gemeten in millibar (1 mbar = 1 hPa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), het volume in liter en de temperatuur in graden Celsius.

Koolstof in de gasruimte

43. Aangezien 1 mol methaan en 1 mol koolstofdioxide elk 12 g koolstof bevatten, kan de massa van de koolstof per volume-eenheid geproduceerd gas worden uitgedrukt als:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Vergelijking [1]}$$

waarin:

m = massa van de koolstof (mg) in een volume-eenheid geproduceerd gas;

12 = relatieve atoommassa van koolstof;

n = aantal molen gas in de volume-eenheid.

Als een ander gas dan methaan of koolstofdioxide (bijv. N_2O) in aanzienlijke hoeveelheden wordt gevormd, moet de formule [1] worden aangepast om de mogelijkheid van effecten door de geproduceerde gassen te beschrijven.

44. Op grond van de gaswetten kan n worden uitgedrukt als

$$n = \frac{pV}{RT} \qquad \text{Vergelijking [2]}$$

waarin:

p = druk van het gas (pascal);

V = volume van het gas (m^3);

R = molaire gasconstante [8,314 J/(mol K)];

T = incubatietemperatuur (kelvin).

Door combinatie van de vergelijkingen [1] en [2] en rationalisering voor de productie van gas in de blancocontrole:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Vergelijking [3]}$$

waarin:

m_h = massa van de nettohoeveelheid in de gasruimte geproduceerde koolstof (mg);

Dp = gemiddelde van het verschil tussen de begin- en einddruk in de testvaten minus het overeenkomstige gemiddelde in de blancovaten (millibar);

▼M6

V_h = volume van de gasruimte in het vat (l);

0,1 = herleidingsfactor voor de omrekening van newton/m^2 naar millibar en van m^3 naar liter.

Vergelijking [4] moet worden gebruikt voor de normale incubatietemperatuur van 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Vergelijking [4]}$$

Opmerking: Alternatieve volumeberekening. Drukmeterstanden worden omgerekend naar ml geproduceerd gas met behulp van de standaardcurve die wordt gevormd door het geïnjecteerde volume (ml) uit te zetten tegen de drukmeterstanden (aanhangsel 2). Het aantal molen (n) gas in de gasruimte van elk vat wordt berekend door de cumulatieve gasproductie (ml) te delen door 25 286 ml/mol, hetgeen het volume is dat wordt ingenomen door één mol gas bij 35 °C en de atmosferische standaarddruk. Aangezien 1 mol CH_4 en 1 mol CO_2 elk 12 g koolstof bevatten, wordt de hoeveelheid koolstof (mg) in de gasruimte (m_h) gegeven door vergelijking [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Vergelijking [5]}$$

Rationalisering voor de productie van gas in de blancocontrole:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \qquad \text{Vergelijking [6]}$$

waarin:

m_h = massa van de nettohoeveelheid in de gasruimte geproduceerde koolstof (mg);

ΔV = gemiddelde van het verschil in het in de gasruimte geproduceerde gasvolume tussen de testvatenm en de blancocontrolevaten;

25286 = volume dat wordt ingenomen door 1 mol gas bij 35 °C, 1 atmosfeer.

45. Het verloop van de biologische afbraak kan worden gevolgd door de stijging van de gecumuleerde druk D*p* (millibar) uit te zetten tegen de tijd, indien van toepassing. Identificeer en rapporteer op basis van deze curve de aanloopfase (dagen). De aanloopfase is de tijd vanaf het begin van de test totdat significante afbraak aanvangt (zie bijvoorbeeld aanhangsel 3). Indien tussentijds monsters van de bovenliggende vloeistof zijn genomen en geanalyseerd (zie de punten 40, 46 en 47), kan de totale hoeveelheid geproduceerde C (in gas en in vloeistof) worden uitgezet in plaats van alleen de cumulatieve druk.

Koolstof in de vloeistof

46. De hoeveelheid methaan in de vloeistof wordt genegeerd, aangezien bekend is dat de oplosbaarheid ervan in water zeer slecht is. De massa van de anorganische koolstof in de vloeistof van de testvaten wordt berekend met vergelijking [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Vergelijking [7]}$$

waarin:

m_l = massa van de anorganische koolstof in de vloeistof (mg);

C_{netto} = concentratie van de anorganische koolstof in de testvaten minus de concentratie daarvan in de controlevaten aan het einde van de test (mg/l);

V_l = volume van de vloeistof in het vat (l).

▼M6

Totale hoeveelheid in gas omgezette koolstof

47. Bereken de totale massa van de in gas omgezette koolstof in het vat met vergelijking [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Vergelijking [8]}$$

waarin:

m_t = totale massa van in gas omgezette koolstof (mg);

voor m_h en m_l gelden bovenstaande definities.

Koolstofgehalte van de teststof

48. Bereken de totale massa koolstof in de testvaten die afkomstig is van de toegevoegde teststof met vergelijking [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Vergelijking [9]}$$

waarin:

m_v = massa van de teststofkoolstof (mg);

C_c = concentratie van de teststofkoolstof in het testvat (mg/l)

V_l = volume van de vloeistof in het testvat (l).

Mate van biologische afbraak

49. Bereken de procentuele biologische afbraak aan de hand van het gas in de gasruimte met vergelijking [10] en de totale biologische afbraak met vergelijking [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Vergelijking [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Vergelijking [11]}$$

waarin:

D_h = biologische afbraak op basis van het gas in de gasruimte (%);

D_t = totale biologische afbraak (%);

voor m_h, m_v en m_t gelden bovenstaande definities.

De mate van primaire biologische afbraak wordt berekend aan de hand van de (facultatieve) metingen van de concentratie van de teststof aan het begin en einde van de incubatie, met vergelijking [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Vergelijking [12]}$$

waarin:

D_p = primaire afbraak van de teststof (%);

S_i = beginconcentratie van de teststof (mg/l);

S_e = concentratie van de teststof aan het einde (mg/l).

Indien de analysemethode wijst op significante concentraties van de teststof in het ongewijzigde anaerobe slibentmateriaal, moet vergelijking [13] worden gebruikt:

▼M6

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_t - S_{ib})] \times 100 \qquad \text{Vergelijking [13]}$$

waarin:

D_p^1 = gecorrigeerde primaire afbraak van de teststof (%);

S_{ib} = „schijnbare” beginconcentratie van de teststof in de blancocontroles (mg/l);

S_{eb} = „schijnbare” concentratie van de teststof in de blancocontroles aan het einde (mg/l).

Geldigheid van de resultaten

50. Drukmeterstanden moeten alleen worden gebruikt van vaten die geen roze verkleuring vertonen (zie punt 33). Verontreiniging door zuurstof wordt tot een minimum beperkt door de toepassing van geschikte anaerobe behandelingstechnieken.

51. De test moet als geldig worden beschouwd wanneer de referentiestof een plateau bereikt dat meer dan 60 % biologische afbraak vertegenwoordigt. ([1])

52. Indien de pH-waarde aan het einde van de test meer dan 7 ± 1 is en er onvoldoende biologische afbraak heeft plaatsgevonden, moet de test worden herhaald met een grotere buffercapaciteit van het medium.

Remming van de afbraak

53. De gasproductie in vaten die zowel de teststof als de referentiestof bevatten, moet ten minste gelijkwaardig zijn aan de gasproductie in de vaten die alleen de referentiestof bevatten; zo niet, dan wijst dit op remming van de gasproductie. In sommige gevallen zal de gasproductie in vaten die de teststof bevatten zonder de referentiestof lager zijn dan die in de blancocontroles, wat erop wijst dat de teststof remmend is.

Testverslag

54. In het testverslag worden de volgende gegevens opgenomen:

Teststof:

— de triviale naam, de chemische naam, het CAS-nummer, de structuurformule en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof.

Testomstandigheden:

— volumes van de verdunde gistingstankvloeistof (V_l) en van de gasruimte (V_h) in het vat;

— beschrijving van de testvaten, de belangrijkste kenmerken van de biogasmeting (bijv. type drukmeter) en van het IC-analyseapparaat;

— de manier waarop de teststof en de referentiestof aan het testsysteem zijn toegevoegd: de gebruikte testconcentratie en eventueel gebruik van oplosmiddelen;

— gedetailleerde gegevens over het gebruikte entmateriaal: naam van de waterzuiveringsinstallatie, beschrijving van de oorsprong van het behandelde afvalwater (bijv. werktemperatuur, slibretentietijd, hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater, enz.), concentratie, eventuele informatie ter onderbouwing hiervan en informatie over eventuele voorbehandeling van het entmateriaal (bijv. voorafgaande uitgisting, voorafgaande blootstelling);

— incubatietemperatuur;

— het aantal duplo's.

([1]) Dit moet opnieuw worden beoordeeld, als ook adsorptieve en onoplosbare referentiestoffen worden gebruikt.

▼M6

Resultaten:

— pH- en IC-waarden aan het einde van de test;

— concentratie van de teststof aan het begin en aan het einde van de test, indien een specifieke meting is uitgevoerd;

— alle meetgegevens die zijn verzameld in de test-, blanco-, referentiestof- en remmingscontrolevaten, al naar gelang het geval (bijv. druk in millibar, concentratie van anorganische koolstof (mg/l)) in tabelvorm (meetgegevens voor de gasruimte en de vloeistof moeten afzonderlijk worden gerapporteerd);

— statistische behandeling van gegevens, testduur en een diagram van de biologische afbraak van de teststof, referentiestof en inhibitiecontrole;

— procentuele biologische afbraak van de teststof en referentiestof;

— eventuele redenen om de testresultaten te verwerpen;

— een bespreking van de resultaten.

LITERATUUR

(1) De volgende hoofdstukken van deze bijlage:

C.4, Bepaling van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid;

C.9, Biologische afbraak — Zahn-Wellens test;

C.10, Simulatietest — aerobe rioolwaterzuivering:

A: Actiefslibinstallaties, B: Biofilms

C.11, Biologische afbraak — Actief slib: ademhalingsremmingstest

(2) OESO (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OESO, Parijs

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Ook gepubliceerd als ECE-TOC Technical Report No. 28, juni 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. en McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. en 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. and 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) Internationale Organisatie voor Normalisatie (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.

(12) Internationale Organisatie voor Normalisatie (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.

(13) Internationale Organisatie voor Normalisatie (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

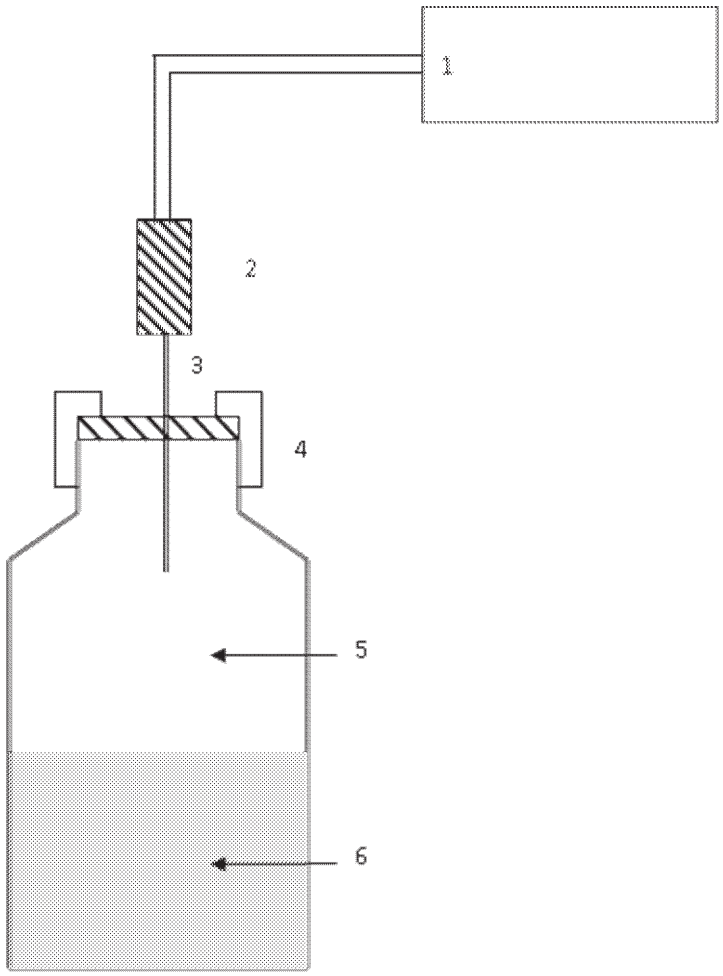
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) Internationale Organisatie voor Normalisatie (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Aanhangsel 1

Voorbeeld van een apparaat om de biogasproductie te meten door de gasdruk



Legenda:

1 — Drukmeter

2 — Gasdicht driewegventiel

3 — Injectienaald

4 — Gasdichte afsluiter (krimpsluiting en septum)

5 — Gasruimte (V_h)

6 — Uitgegist slibentmateriaal (V_l)

Testvaten in een omgeving van 35 °C ± 2 °C

▼M6

Aanhangsel 2

Conversie van de drukmeter

De standen van de drukmeter kunnen aan gasvolumes worden gerelateerd door middel van een standaardcurve die wordt opgesteld door bekende volumes lucht bij 35 °C ± 2 °C te injecteren in serumflessen met daarin een volume aan water dat gelijk is aan dat van het reactiemengsel, V_R:

— Breng porties van V_R ml water, bewaard bij 35 °C ± 2 °C, in vijf serumflessen. Sluit de flessen af en plaats ze gedurende 1 uur in een waterbad bij 35 °C om een evenwichtstoestand te bereiken;

— Zet de drukmeter aan, laat hem stabiliseren en stel hem in op nul;

— Steek de injectienaald door de afsluiter van een van de flessen, open het ventiel tot de drukmeter nul aangeeft, en sluit het ventiel;

— Herhaal de procedure voor de overige flessen;

— Injecteer in elke fles 1 ml lucht van 35 °C ± 2 °C. Steek de naald (op de meter) door de afsluiter van een van de flessen en wacht tot de stand van de drukmeter is gestabiliseerd; Noteer de druk, open het ventiel tot de drukmeter nul aangeeft, en sluit het ventiel;

— Herhaal de procedure voor de overige flessen;

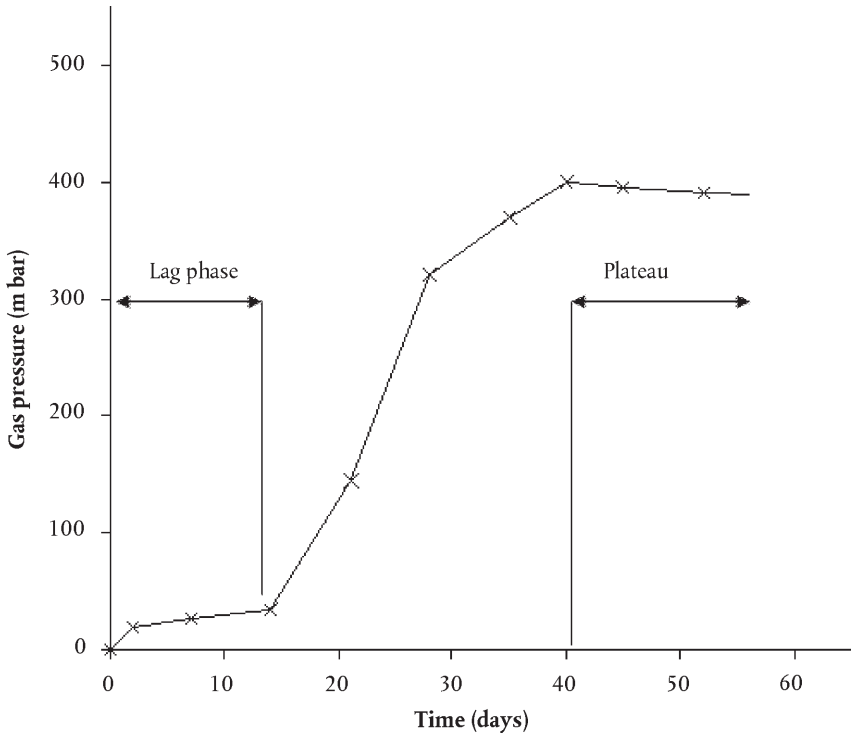
— Herhaal de totale, hierboven beschreven procedure met 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml en 50 ml lucht;

— Zet een conversiecurve van de druk (Pa) uit tegen het geïnjecteerde gasvolume Vb (ml). De respons van het instrument is lineair in het bereik van 0 Pa tot 70 000 Pa, en van 0 ml tot 50 ml gasproductie.

▼M6

Aanhangsel 3

Voorbeeld van een afbraakcurve (cumulatieve nettodrukstijging)



▼M6

Aanhangsel 4

Voorbeeld van gegevensformulieren voor de anaerobe biologische-afbraaktest — Gegevensformulier voor de teststof

Laboratorium..... Teststof: ..... Testnr.: .....

Testtemperatuur:(°C):..... Volume van gasruimte (V_h): .....(1) Volume van vloeistof (V_l): .....(l)

Koolstof in teststof $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Dag	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) gemiddelde (mbar)	p_4 (blanco) (mbar)	p_5 (blanco) (mbar)	p_6 (blanco) (mbar)	p (blanco) gemiddelde (mbar)	p (netto) test — blanco gemiddelde (mbar)	Δp (netto) Cumulatief (mbar)	m_h gasruimte C ([2]) (mg)	D_h Biologische afbraak ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ test (mg)	$C_{IC,\ 2}$ test (mg)	$C_{IC,\ 3}$ test (mg)	C_{IC} test gemiddelde (mg)	$C_{IC,\ 4}$ blanco (mg)	$C_{IC,\ 5}$ blanco (mg)	$C_{IC,\ 6}$ blanco (mg)	C_{IC} blanco gemiddelde (mg)	$C_{IC,\ netto}$ test -blanco gemiddelde (mg)	m_l vloeistof C ([4]) (mg)	m_t totaal C ([5]) (mg)	D_t Biologische afbraak ([6]) (%)
IC (totaal)												
pH (totaal)												

([1]) Koolstof in testvat, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Koolstof in gasruimte, m_h (mg) bij normale incubatietemperatuur (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

([3]) Biologische afbraak berekend aan de hand van gas in gasruimte, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

([4]) Koolstof in vloeistof, m_l (mg): $m_l = C_{ic,netto} \times V_l$

([5]) Totale in gas omgezette koolstof, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Totale biologische afbraak, D_t (%): $Dt = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 1991

▼M6

Laboratorium ..... Referentiestof: ..... Testnr.: .....

Testtemperatuur:(°C): ..... Volume van gasruimte (V_h): .....(l) Volume van vloeistof (V_l) (liter): .....

Koolstof in referentiestof $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v (1) (mg):

Dag	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) gemiddelde (mbar)	p_4 (remming) (mbar)	p_5 (remming) (mbar)	p_6(remming) (mbar)	p (remming) gemiddelde (mbar)	p (ref.) ref. — blanco (mbar)	Δp (ref.) cumulatief (mbar)	m_h gasruimte C (2) (mg)	D_h Biologische afbraak (3) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} ref. gemiddelde (mg)	$C_{IC,\ 4}$ remming (mg)	$C_{IC,\ 5}$ remming (mg)	$C_{IC,\ 6}$ remming (mg)	C_{IC} remming gemiddelde (mg)	$C_{IC,\ netto}$ ref. — remming (mg)	m_l vloeistof C (4) (mg)	m_t totaal C (5) (mg)	D_t Biologische afbraak (6) (%)
IC (totaal)												
pH (totaal)												

(1) Koolstof in testvat, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
(2) Koolstof in gasruimte, m_h (mg) bij normale incubatietemperatuur (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$
(3) Biologische afbraak berekend aan de hand van gas in gasruimte, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
(4) Totale in gas omgezette koolstof, m_t (mg): $m_t + m_l$
(5) Koolstof in vloeistof, m_l (mg): $m_l = C_{IC,netto} \times V_l$
(6) Totale biologische afbraak, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 1992

▼M6

C.44. UITLOGING IN BODEMKOLOMMEN

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan OESO-testrichtsnoer (TG) 312 (2004). Synthetische chemische stoffen kunnen de bodem rechtstreeks bereiken via doelbewust gebruik (bijv. in de landbouw gebruikte chemische stoffen) of via indirecte routes (bijv. via afvalwater → zuiveringsslib → bodem of lucht → natte/droge afzetting). Voor de beoordeling van de risico's van deze chemische stoffen is het belangrijk om een schatting te maken van hun potentieel voor transformatie in de bodem en voor beweging (uitloging) in de richting van diepere bodemlagen en uiteindelijk het grondwater.

2. Er bestaan meerdere methoden om het uitlogingspotentieel van chemische stoffen in de bodem onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden te meten, namelijk dunnebodemlaagchromatografie, dikkebodemlaagchromatografie, bodemkolomchromatografie en adsorptie-/desorptiemetingen (1)(2). Voor niet-geïoniseerde chemische stoffen kan met de n-octanol/water-verdelingscoëfficiënt (P_{ow}) een vroege schatting worden gemaakt van hun adsorptie- en uitlogingspotentieel (3)(4)(5).

3. De in deze testmethode beschreven methode is gebaseerd op bodemkolomchromatografie in verstoorde bodems (zie aanhangsel 1 voor een definitie). Er worden twee typen experimenten uitgevoerd om het volgende te bepalen: (i) het uitlogingspotentieel van de teststof en (ii) het uitlogingspotentieel van de omzettingsproducten (te onderzoeken met verouderde residuen) in bodems onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden ([1]). Deze testmethode is gebaseerd op bestaande methoden (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. Bij een OESO-workshop over bodem-/sedimentselectie die in 1995 in Belgirate, Italië, werd gehouden (12) werden het aantal bodemmonsters en de bodemtypes die in deze testmethode moeten worden gebruikt vastgesteld. De workshop leverde tevens aanbevelingen op met betrekking tot het verzamelen, behandelen en bewaren van bodemmonsters voor uitlogingsexperimenten.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

5. Kolommen gemaakt van geschikt inert materiaal (bijv. glas, roestvrij staal, aluminium, teflon, PVC, enz.) worden gevuld met grond en nadien verzadigd en geëquilibreerd met een „kunstmatige-regenoplossing” (zie aanhangsel 1 voor een definitie). Laat de kolommen vervolgens uitlekken. Het oppervlak van iedere bodemkolom wordt vervolgens behandeld met de teststof en/of verouderde residuen van de teststof. Daarop worden de bodemkolommen blootgesteld aan kunstmatige regen en wordt de uitloogvloeistof verzameld. Na het uitloogproces wordt de grond uit de kolommen verwijderd en opgedeeld in een geschikt aantal segmenten, afhankelijk van de informatie die het onderzoek beoogt te achterhalen. Ieder bodemsegment en de uitloogvloeistof worden vervolgens geanalyseerd om het gehalte teststof te bepalen en, indien van toepassing, omzettingsproducten of andere chemische stoffen van belang.

TOEPASBAARHEID VAN DE TESTMETHODE

6. De testmethode kan worden gebruikt voor chemische stoffen (die al dan niet radioactief gemerkt zijn, bijv. met ^{14}C) waarvoor een analysemethode met een afdoende nauwkeurigheid en gevoeligheid beschikbaar is. De testmethode mag niet worden gebruikt voor chemische stoffen die vluchtig zijn in de bodem en in het water en die derhalve niet in de bodem en/of de uitloogvloeistof blijven onder de experimentele omstandigheden van deze testmethode.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

7. Ongemerkte of radioactief gemerkte teststoffen kunnen worden gebruikt om het uitlooggedrag in bodemkolommen te meten. Radioactief gemerkt materiaal is vereist om de uitloging van omzettingsproducten (verouderde residuen van de teststof) te onderzoeken en voor bepaling van de massabalans.

([1]) Onderzoeken naar kolomuitloging met gewasbeschermingsmiddelen kunnen mobiliteitsinformatie over een teststof en de omzettingsproducten van die stof opleveren en kunnen een aanvulling vormen op sorptiestudies.

▼**M6**

Merking met ^{14}C wordt aanbevolen, maar ook het gebruik van andere isotopen zoals ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P kan nuttig zijn. De merkstof moet zo veel mogelijk in het meest stabiele gedeelte of de meest stabiele gedeelten van het molecuul worden aangebracht. De zuiverheid van de teststof moet ten minste 95 % zijn.

8. De meeste chemische stoffen moeten als één stof worden gebruikt. Echter, voor actieve stoffen in gewasbeschermingsmiddelen kunnen geformuleerde producten worden gebruikt om het uitlogen van de oorspronkelijke teststof te onderzoeken, maar deze stoffen moeten in het bijzonder worden getest indien er een grote kans bestaat dat het mengsel de afgiftesnelheid negatief beïnvloedt (bijv. korrelige formules of formules met gereguleerde afgifte). Wat betreft voor het mengsel specifieke vereisten voor de opzet van de test kan het nuttig zijn om voor het uitvoeren van de test eerst met de regelgevingsinstantie te overleggen. Voor uitloogonderzoeken met verouderde residuen moet de oorspronkelijke teststof in zuivere vorm worden gebruikt.

9. Vóór de uitvoering van uitloogtests in bodemkolommen moet bij voorkeur de volgende informatie over de teststof bekend zijn:

(1) de oplosbaarheid in water [testmethode A.6] (13);

(2) de oplosbaarheid in organische oplosmiddelen;

(3) de dampspanning [testmethode A.4] (13) en de constante van de wet van Henry;

(4) de n-octanol/water partitiecoëfficiënt [testmethoden A.8 en A.24] (13);

(5) de adsorptiecoëfficiënt (K_d, K_f of K_{OC}) [testmethoden C.18 en/of C.19] (13);

(6) de hydrolyse [testmethode C.7] (13);

(7) de dissociatieconstante (pK_a) [OESO-TG 112] (25);

(8) de aerobe en anaerobe omzetting in de bodem [testmethode C.23] (13)

Opmerking: De temperatuur waarbij deze metingen zijn verricht, moeten in de respectieve testverslagen worden gerapporteerd.

10. De hoeveelheid teststof waaraan de bodemkolommen worden blootgesteld, moet voldoende zijn om ten minste 0,5 % van de toegepaste dosis te kunnen detecteren in één segment. Voor actieve chemische stoffen in gewasbeschermingsmiddelen mag de hoeveelheid gebruikte teststof overeenkomen met de maximale aanbevolen gebruikshoeveelheid (één voorgeschreven dosis).

11. Er moet een geschikte analysemethode met een bekende juistheid, precisie en gevoeligheid voor de kwantitatieve bepaling van de chemische stof en, indien relevant, van de omzettingsproducten ervan in de bodem en in de uitloogvloeistof, beschikbaar zijn. De analytische detectiegrenswaarde voor de teststof en de belangrijkste omzettingsproducten ervan (normaal gesproken ten minste alle omzettingsproducten ≥ 10 % van de toegepaste dosis die zijn waargenomen in onderzoeken naar omzettingsroutes, maar bij voorkeur alle relevante omzettingsproducten) moet tevens bekend zijn (zie punt 17).

▼M6

REFERENTIESTOFFEN

12. Referentiestoffen met bekend uitlooggedrag zoals atrazine of monuron, die kunnen worden beschouwd als gemiddelde uitlogers, moeten worden gebruikt om de relatieve mobiliteit van de teststof in de bodem te beoordelen (1)(8)(11). Het gebruik van een niet-afbreekbare polaire chemische stof die geen sorptie vertoont (bijv. tritium, bromide, fluoresceïne, eosine) om de beweging van water in de kolom te volgen kan ook nuttig zijn om de hydrodynamische eigenschappen van de bodemkolom te bevestigen.

13. Ook kunnen chemische stoffen van pro-analysekwaliteit worden gebruikt voor de karakterisering en/of identificatie van omzettingsproducten die worden aangetroffen in bodemsegmenten en in de uitloogvloeistoffen door middel van chromatografie, spectroscopie of andere toepasselijke methoden.

DEFINITIES EN EENHEDEN

14. Zie aanhangsel 1.

KWALITEITSCRITERIA

Recovery

15. Bij uitloogexperimenten wordt de recovery gevormd door de som van de percentages van de teststof die zijn aangetroffen in de bodemsegmenten en de uitloogvloeistof van de kolommen na het uitlogen. De recovery moet in het bereik van 90 % tot 110 % liggen voor radioactief gemerkte chemische stoffen (11) en in het bereik van 70 % tot 110 % voor ongemerkte chemische stoffen (8).

Herhaalbaarheid en gevoeligheid van de analysemethode

16. De herhaalbaarheid van de analysemethode voor de kwantitatieve bepaling van de teststof en omzettingsproducten kan worden gecontroleerd aan de hand van een duploanalyse van dezelfde extractie van een bodemsegment of van een uitloogvloeistof (zie punt 11).

17. De detectiegrens (limit of detection, LOD) van de analysemethode voor de teststof en voor de omzettingsproducten moet ten minste 0,01 mg · kg^{-1} zijn in elk bodemsegment of elke uitloogvloeistof (als teststof) of 0,5 % van de gebruikte dosis in elk afzonderlijk segment, als dit lager is. Ook de bepaalbaarheidsgrens (limit of quantification, LOQ) moet worden gespecificeerd.

BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Testsysteem

18. Voor de test worden uitloogkolommen (al dan niet opdeelbaar in compartimenten) gebruikt die gemaakt zijn van geschikt inert materiaal (bijv. glas, roestvrij staal, aluminium, teflon, PVC, enz.) met een binnendiameter van ten minste 4 cm en een minimumhoogte van 35 cm. De kolommaterialen moeten worden getest op potentiële interactie met de teststof en/of de omzettingsproducten van de teststof. Voorbeelden van geschikte, in compartimenten opdeelbare en niet-opdeelbare kolommen worden getoond in aanhangsel 2.

19. Een lepel, stamper en trilapparaat worden gebruikt voor de vulling en pakking van de bodemkolommen.

20. Voor de blootstelling van de bodemkolommen aan kunstmatige regen kunnen zuiger- of peristaltische pompen, douchekoppen, mariotteflessen of eenvoudige druppeltrechters worden gebruikt.

▼M6

Laboratoriumuitrusting en chemische stoffen

21. Een standaard-laboratoriumuitrusting is vereist, in het bijzonder:

(1) analyse-apparatuur zoals GLC-, HPLC- en TLC-apparatuur, met inbegrip van de nodige detectiesystemen voor de analyse van al dan niet radioactief gemerkte chemische stoffen of de inverse isotoopverdunningsmethode;

(2) instrumenten voor kwalitatieve analyse (MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, enz.);

(3) vloeistof-scintillatieteller voor radioactief gemerkte teststof;

(4) oxidans voor de verbranding van gemerkt materiaal;

(5) extractieapparaat (bijvoorbeeld centrifugebuizen voor koude extractie en een Soxhlet-apparaat voor continue extractie onder terugvloeiing);

(6) instrumenten voor de concentratie van oplossingen en extracten (bijvoorbeeld een rotatieverdamper);

22. De gebruikte chemische stoffen zijn: organische oplosmiddelen, analytisch zuiver, zoals aceton, methanol, enz.; scintillatievloeistof; oplossing van 0,01 M $CaCl_2$ in gedistilleerd of gedeïoniseerd water (= kunstmatige regen).

Teststof

23. De teststof moet worden opgelost in water (gedeïoniseerd of gedistilleerd) om te kunnen worden gebruikt in de test. Als de teststof slecht oplosbaar is in water, kan de stof worden gebruikt als hetzij een geformuleerd product (na suspenderen of emulgeren in water, indien nodig) hetzij in een willekeurig organisch oplosmiddel. Bij gebruik van een organisch oplosmiddel moet het oplosmiddel tot een minimum worden beperkt en moet het zijn verdampt van het oppervlak van de bodemkolom, voordat met de uitloogprocedure wordt begonnen. Vaste geformuleerde stoffen, zoals granulaten, moeten in de vaste toestand worden gebruikt zonder water. Om te zorgen voor een betere verdeling over het oppervlak van de bodemkolom kan het geformuleerde product vóór gebruik worden gemengd met een kleine hoeveelheid kwartszand (bijv. 1 g).

24. De hoeveelheid teststof waaraan de bodemkolommen worden blootgesteld, moet voldoende zijn om ten minste 0,5 % van de toegepaste dosis te kunnen detecteren in één segment. Voor actieve chemische stoffen in gewasbeschermingsproducten kan deze hoeveelheid worden gebaseerd op de aanbevolen maximale gebruikshoeveelheid (één voorgeschreven dosis), waarbij de hoeveelheid voor de uitloging van zowel de oorspronkelijke teststof als de verouderde residuen verband moet houden met de grootte van het oppervlak van de gebruikte bodemkolom ([1]).

Referentiestof

25. In de uitloogexperimenten moet een referentiestof worden gebruikt (zie punt 12). De referentiestof moet op soortgelijke wijze als de teststof in het oppervlak van de bodemkolom worden gebracht en in een passende

([1]) De hoeveelheid die voor cilindrische bodemkolommen moet worden gebruikt, kan worden berekend aan de hand van de volgende formule:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

waarin:

M = per kolom gebruikte hoeveelheid [µg]

A = voorgeschreven dosis [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = diameter van bodemkolom [cm]

π = 3,14

▼M6

hoeveelheid die toereikende detectie mogelijk maakt, hetzij als interne standaard samen met de teststof in dezelfde bodemkolom, hetzij alleen in een aparte bodemkolom. De referentie- en teststof moeten bij voorkeur aan dezelfde kolom worden toegevoegd, behalve wanneer ze beide een soortgelijke merking hebben.

Grond

Bodemselectie

26. Voor uitloogonderzoeken met de oorspronkelijke teststof moeten drie tot vier bodemtypes worden gebruikt met een variërende pH, organisch-koolstofgehalte en textuur (12). Een richtsnoer voor de selectie van bodemtypes voor uitloogexperimenten wordt gegeven in onderstaande tabel 1. Voor ioniseerbare teststoffen moeten de geselecteerde bodemtypes een breed pH-bereik beslaan om de mobiliteit van de teststof in zijn geïoniseerde en niet-geïoniseerde vorm te kunnen bepalen; ten minste drie bodemtypes moeten een pH hebben waarbij de teststof in zijn mobiele vorm is.

Tabel 1

Richtsnoer voor de selectie van bodemtypes voor uitloogonderzoeken

Bodemnr.	pH-waarde	Organische koolstof %	Kleigehalte %	Textuur (*)
1	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	kleileem
2	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	siltleem
3	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	leem
4	< 4,0 - 6,0 §	< 0,5 - 1,5 § ‡	< 10 - 15 §	lemig zand
5	< 4,5	> 10 #	< 10	lemig zand/zand

(*) Volgens het systeem van de FAO en de USDA (14).

§ De waarde van deze variabelen moet bij voorkeur binnen het vermelde bereik vallen. Als het echter moeilijk is geschikt bodemmateriaal te vinden, is ook een waarde beneden het vermelde minimum aanvaardbaar.

‡ bodem met minder dan 0,3 % organische koolstof kan de correlatie tussen het gehalte aan organisch materiaal en de adsorptie verstoren. Het verdient dan ook aanbeveling bodem met minimaal 0,3 % organische koolstof te gebruiken.

Bodem met een zeer hoog koolstofgehalte (bijv. > 10 %) is mogelijk niet aanvaardbaar in juridisch opzicht, bijv. met het oog op de registratie van gewasbeschermingsmiddelen.

27. Andere bodemtypes kunnen in sommige gevallen nodig zijn om regio's met een koeler, gematigd of tropisch klimaat te vertegenwoordigen. Dit betekent dat, indien de voorkeur wordt gegeven aan andere bodemtypes, ze gekarakteriseerd moeten worden door dezelfde parameters en vergelijkbare variaties in eigenschappen moeten hebben als de variaties die worden beschreven in het richtsnoer voor de selectie van de bodem voor uitloogonderzoeken (zie bovenstaande tabel 1), zelfs als ze niet exact aan de criteria voldoen.

28. Voor uitloogonderzoeken met „verouderde residuen” moet één bodemtype worden gebruikt (12). Dit type moet een zandgehalte van > 70 % hebben en een organisch-koolstofgehalte tussen 0,5 — 1,5 % (bijv. bodem nr. 4 in tabel 1). Meer bodemtypes moeten mogelijk worden gebruikt, indien informatie over de omzettingsproducten belangrijk is.

29. Alle bodemtypes moeten worden gekarakteriseerd voor textuur [% zand, % silt, % klei overeenkomstig de classificatiesystemen van de FAO en USDA (14)], pH, kationenuitwisselingsvermogen, gehalte organische koolstof, dichtheid van de droge grond (voor verstoorde bodems) en het waterhoudend vermogen. De microbiële biomassa hoeft alleen te worden gemeten

▼M6

voor het bodemtype dat is gebruikt in de verouderings-/incubatieperiode die plaatsvindt voor het uitloogexperiment met verouderde residuen. Informatie over aanvullende bodemeigenschappen (bijv. bodemclassificatie, kleimineralogie, specifiek deel van het oppervlak) kan nuttig zijn voor de interpretatie van de resultaten van dit onderzoek. Voor de bepaling van de bodemkenmerken kunnen de in de referenties (15)(16)(17)(18)(19) aanbevolen methoden worden gebruikt.

Verzameling en opslag van grond

30. Grond moet uit de bovenste laag (A-horizon) worden verzameld met een maximale diepte van 20 cm. Resten van vegetatie, macrofauna en stenen moeten worden verwijderd. De grond (met uitzondering van de grond die wordt gebruikt voor de veroudering van de teststof) wordt aan de lucht gedroogd bij kamertemperatuur (bij voorkeur tussen 20-25 C). Bij het losmaken moet zo weinig mogelijk kracht worden gebruikt om de oorspronkelijke textuur van de bodem zo veel mogelijk intact te houden. De grond wordt gezeefd met een zeef van ≤ 2 mm. Een zorgvuldige homogenisering wordt aanbevolen, aangezien de reproduceerbaarheid van de resultaten daardoor wordt bevorderd. Vóór gebruik kan de grond worden opgeslagen bij omgevingstemperatuur en luchtgedroogd worden bewaard (12). Er is geen aanbevolen houdbaarheidstermijn, maar grond die meer dan drie jaar is bewaard moet vóór gebruik opnieuw worden geanalyseerd op zijn gehalte aan organische koolstof en pH.

31. Er moet gedetailleerde achtergrondinformatie over de veldlocaties zijn waar de gebruikte bodem is verzameld. Daarbij gaat het bijvoorbeeld om de exacte ligging [exact vastgesteld door middel van UTM (Universal Transversal Mercator-projectie/European Horizontal Datum) of geografische coördinaten], vegetatie, behandelingen met gewasbeschermingsmiddelen, behandeling met organische en anorganische meststoffen, biologische toevoegingen of onopzettelijke verontreiniging (12). Indien de grond in de voorgaande vier jaar is behandeld met de teststof of zijn qua structuur analoge verbindingen, mag van deze grond geen gebruik worden gemaakt voor uitloogonderzoeken.

Testomstandigheden

32. Tijdens de testperiode moeten de bodemuitloogkolommen zich in het donker bevinden bij omgevingstemperatuur, mits deze temperatuur constant wordt gehouden met ± 2 °C. De aanbevolen temperatuur ligt in het bereik van 18 tot 25 °C.

33. Het oppervlak van de bodemkolommen moet continu worden blootgesteld aan kunstmatige regen (0,01 M $CaCl_2$) met een neerslaghoeveelheid van 200 mm gedurende een periode van 48 uur ([1]); deze hoeveelheid komt overeen met het gebruik van 251 ml voor een kolom met een binnendiameter van 4 cm. Indien nodig voor de doeleinden van de test kunnen andere hoeveelheden kunstmatige regen en een langere duur aanvullend worden toegepast.

Uitvoering van de test

Uitlogen met de oorspronkelijke teststof

34. Uitloogkolommen, in minimaal duplo, worden gevuld met onbehandelde, aan de lucht gedroogde en gezeefde grond (< 2 mm) tot een hoogte van ongeveer 30 cm. Om een gelijkvormig aangedrukt monster te verkrijgen wordt de grond met een lepel in kleine hoeveelheden toegevoegd en met een stamper aangedrukt onder gelijktijdig voorzichtig trillen van de kolom,

([1]) Hiermee wordt extreem hevige neerslag gesimuleerd. De gemiddelde jaarlijkse neerslag in Midden-Europa ligt bijvoorbeeld binnen het bereik van 800-1 000 mm.

▼M6

totdat de bovenkant van de bodemkolom niet verder inzakt. Een uniforme vulling is nodig om reproduceerbare resultaten met de uitloogkolommen te verkrijgen. Zie de referenties (20), (21) en (22) voor nadere informatie over technieken voor het vullen van de kolommen. Om de reproduceerbaarheid van de vulprocedure te controleren wordt het totale gewicht van de grond in de kolommen bepaald ([1]); het gewicht van de duplokolommen moet ongeveer gelijk zijn.

35. Na het vullen worden de bodemkolommen vooraf bevochtigd met kunstmatige regen (0,01 M $CaCl_2$) van de bodem naar de bovenkant om de lucht in de poriën te vervangen door water. Vervolgens worden de bodemkolommen met rust gelaten om te equilibreren en lekt de overmaat aan water weg door de zwaartekracht. Methoden voor de verzadiging van de kolommen worden besproken in referentie (23).

36. Vervolgens worden de teststof en/of de referentiestof aangebracht op de bodemkolommen (zie ook de punten 23-25). Om een homogene verdeling te bereiken moeten de oplossingen, suspensies of emulsies van de test- en/of referentiestof gelijkmatig worden verdeeld over het oppervlak van de bodemkolommen. Indien opname in grond wordt aanbevolen voor het toedienen van de teststof, moet de teststof worden gemengd met een kleine hoeveelheid (bijv. 20 g) grond en toegevoegd aan het oppervlak van de bodemkolom.

37. De oppervlakken van de bodemkolommen worden vervolgens afgedekt met een glazen sinterschijf, glazen parels, glasvezelfilters of een rond stuk filterpapier om de kunstmatige regen gelijkmatig over het gehele oppervlak te verspreiden en om verstoring van het bodemoppervlak door de regendruppels te voorkomen. Hoe groter de diameter van de kolom, des te meer zorg moet worden besteed aan de blootstelling van de bodemkolommen aan de kunstmatige regen om een gelijkmatige verspreiding van de kunstmatige regen over het bodemoppervlak te waarborgen. Vervolgens wordt de kunstmatige regen druppelsgewijs aan de bodemkolommen toegevoegd met behulp van een zuiger of een peristaltische pomp of druppeltrechter. De uitloogvloeistoffen moeten bij voorkeur worden verzameld in fracties en hun respectieve volumes worden gerapporteerd ([2]).

38. Na het uitlogen en uitlekken van de kolommen worden de bodemkolommen opgedeeld in een geschikt aantal segmenten afhankelijk van de informatie die het onderzoek beoogt te achterhalen, de segmenten worden geëxtraheerd met geschikte oplosmiddelen of mengsels van oplosmiddelen en worden geanalyseerd op de teststof en, indien van toepassing, op omzettingsproducten, totale radioactiviteit en de referentiestof. De uitloogvloeistoffen of fracties van uitloogvloeistoffen worden onmiddellijk of na extractie geanalyseerd op dezelfde stoffen. Wordt een radioactief gemerkte teststof gebruikt, dan moeten alle fracties die $\geq$ 10 % van de toegepaste radioactiviteit bevatten, worden geïdentificeerd.

Uitlogen met verouderde residuen

39. Verse grond (die niet eerder aan de lucht is gedroogd) wordt behandeld met een hoeveelheid die overeenkomt met het oppervlak van de bodemkolommen (zie punt 24) met de radioactief gemerkte teststof en geïncubeerd onder aerobe omstandigheden overeenkomstig testmethode C.23 (13). De incubatie- (verouderings-)periode moet lang genoeg zijn om aanzienlijke hoeveelheden omzettingsproducten te produceren; een verouderingsperiode van één

([1]) Voorbeelden van de dichtheid van droge grond voor verstoorde bodems zijn:voor een bodem bestaande uit zand 1,66 $g \cdot ml^{-1}$
voor een bodem bestaande uit lemig zand 1,58 $g \cdot ml^{-1}$
voor een bodem bestaande uit leem 1,17 $g \cdot ml^{-1}$
voor een bodem bestaande uit silt 1,11 $\cdot$ g ml^{-1}

([2]) Typische uitloogvloeistofvolumes liggen in het bereik van 230-260 ml, overeenkomend met ongeveer 92-104 % van de toegepaste totale hoeveelheid kunstmatige regen (251 ml) bij het gebruik van bodemkolommen met een diameter van 4 cm en een lengte van 30 cm.

▼M6

halveringsperiode van de teststof wordt aanbevolen ([1]), maar deze mag niet langer dan 120 dagen duren. Vóór het uitlogen wordt de verouderde grond geanalyseerd op aanwezigheid van de teststof en de omzettingsproducten ervan.

40. De uitloogkolommen worden gevuld tot een hoogte van 28 cm met dezelfde (maar aan de lucht gedroogde) grond als die gebruikt is in het in punt 24 beschreven verouderingsexperiment en het totale gewicht van de gevulde bodemkolommen wordt eveneens bepaald. De bodemkolommen worden daarop vooraf bevochtigd zoals beschreven in punt 35.

41. Vervolgens worden de teststof en de omzettingsproducten ervan toegevoegd aan het oppervlak van de bodemkolommen in de vorm van verouderde bodemresiduen (zie punt 39) als een bodemsegment van 2 cm. De totale hoogte van de bodemkolommen (onbehandelde grond + verouderde grond) mag bij voorkeur niet meer zijn dan 30 cm (zie punt 34).

42. Het uitlogen wordt uitgevoerd zoals beschreven in punt 37.

43. Na het uitlogen worden de bodemsegmenten en uitloogvloeistoffen geanalyseerd zoals aangegeven in punt 38 voor de teststof, de omzettingsproducten van de teststof en de niet-geëxtraheerde radioactiviteit. Om te bepalen hoeveel van het verouderde residu overblijft in de bovenste laag van 2 cm na het uitlogen, moet dit segment apart worden geanalyseerd.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Bewerking van de resultaten

44. De hoeveelheden teststof, omzettingsproducten, niet-extraheerbare stoffen en, indien van toepassing, referentiestof moeten worden aangeduid in % van de toegediende begindosis voor elk bodemsegment en elke fractie van de uitloogvloeistof. Elke kolom moet in een grafiek worden weergegeven door de gevonden percentages uit te zetten als een functie van de bodemdiepte.

45. Indien in deze kolomuitloogonderzoeken een referentiestof wordt gebruikt, kan het uitlogen van een stof worden beoordeeld op een relatieve schaal met behulp van relatieve mobiliteitsfactoren (RMF; zie aanhangsel 3 voor een definitie) (1) (11) die het mogelijk maken om de uitlooggegevens te vergelijken van diverse chemische stoffen die met verschillende bodemsoorten zijn verkregen. Voorbeelden van RMF-waarden voor een aantal verschillende gewasbeschermingsmiddelen worden gegeven in aanhangsel 3.

46. Schattingen van K_{oc} (genormaliseerde adsorptiecoëfficiënt van organische koolstof) en K_{om} (genormaliseerde verdelingscoëfficiënt van organisch materiaal) kunnen ook worden verkregen op basis van kolomuitloogresultaten door gebruik te maken van de gemiddelde uitloogafstand of vastgestelde correlaties tussen RMF en respectievelijk K_{om} en K_{oc} (4) of door de toepassing van elementaire chromatografische theorie (24). De laatstgenoemde methode moet echter met enige terughoudendheid worden gebruikt, in het bijzonder gezien het feit dat het uitloogproces niet uitsluitend betrekking heeft op verzadigde stromingsomstandigheden, maar eerder op onverzadigde systemen.

([1]) Het is mogelijk dat er meer dan één belangrijk omzettingsproduct in de bodem wordt gevormd en omzettingsproducten kunnen ook op verschillende tijdstippen gedurende een omzettingsonderzoek ontstaan. In dergelijke gevallen kan het nodig zijn om uitloogonderzoeken met verouderde residuen van verschillende ouderdom te verrichten.

▼M6

Interpretatie van de resultaten

47. De kolomuitloogonderzoeken die in deze methode worden beschreven, maken het mogelijk om het uitlogings- of mobiliteitspotentieel van de teststof in de bodem (in het uitloogonderzoek met de oorspronkelijke teststof) en/of de omzettingsproducten van de teststof (in het uitloogonderzoek met verouderde residuen) te bepalen. Deze tests leiden niet tot een kwantitatieve voorspelling van uitlooggedrag onder veldomstandigheden, maar kunnen worden gebruikt om de 'uitloogbaarheid' van één chemische stof te vergelijken met andere stoffen waarvan het uitlooggedrag mogelijk bekend is (24). Deze tests omvatten ook geen kwantitatieve meting van het percentage teststof dat het grondwater zou kunnen bereiken (11). De resultaten van kolomuitloogonderzoeken kunnen echter behulpzaam zijn bij het nemen van een besluit over de vraag of aanvullende proeven moeten worden uitgevoerd, geheel of gedeeltelijk onder veldomstandigheden, voor stoffen die een hoog mobiliteitspotentieel vertonen in laboratoriumtests.

Testverslag

48. In het verslag moeten zijn opgenomen:

Teststof en referentiestof (indien gebruikt):

— de triviale naam, de chemische naam (IUPAC- en CAS-nomenclatuur), het CAS-nummer, de chemische structuur (waarin de plaats van de merkstof wordt aangegeven bij gebruik van een radioactief gemerkte stof) en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— de zuiverheid (verontreinigingen) van de teststof;

— de zuiverheid van het label van gemerkte chemicaliën en molaire activiteit (indien van toepassing).

De gebruikte bodem:

— gegevens over de plaats waar de monsters zijn verzameld;

— eigenschappen van de bodem zoals de pH, het gehalte aan organische koolstof en het kleigehalte, de textuur en de dichtheid van de droge bodem (voor een verstoorde bodem);

— de microbiële activiteit in de bodem (alleen indien de bodem is gebruikt voor veroudering van de teststof);

— de periode gedurende welke en de omstandigheden waaronder de monsters zijn opgeslagen.

De testomstandigheden:

— de data waarop het onderzoek is uitgevoerd;

— de lengte en diameter van de uitloogkolommen;

— het totale gewicht van de grond in de bodemkolommen;

— de aangebrachte hoeveelheid teststof en, indien van toepassing, referentiestof;

— het aantal, de frequentie en de duur van de blootstellingen aan kunstmatige regen;

— de temperatuur van de proefopstelling;

— het aantal duplobepalingen (ten minste twee);

— analysemethoden voor de teststof, omzettingsproducten en, indien van toepassing, de referentiestof in de diverse bodemsegmenten en uitloogvloeistoffen;

— methoden voor de karakterisering en identificatie van omzettingsproducten in de bodemsegmenten en uitloogvloeistoffen.

▼M6

De testresultaten:

— tabellen met resultaten uitgedrukt als % van de gebruikte dosis voor bodemsegmenten en uitloogvloeistoffen;

— de massabalans, indien van toepassing;

— de volumes van de uitloogvloeistoffen;

— de uitloogafstanden en, indien van toepassing, de relatieve mobiliteitsfactoren;

— grafische weergave waarin het in de bodemsegmenten aangetroffen percentage wordt uitgezet tegen de diepte van het bodemsegment;

— een bespreking en interpretatie van de resultaten.

LITERATUUR

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and 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. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). 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. and 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) Bijlage I bij Richtlijn 95/36/EG van de Commissie van 14 juli 1995 tot wijziging van Richtlijn 91/414/EEG van de Raad betreffende het op de markt brengen van gewasbeschermingsmiddelen, PB L 172 van 22.7.1995, blz. 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, Ed.

(12) OESO (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italië, 18-20 januari 1995.

(13) De volgende hoofdstukken van deze bijlage:

Hoofdstuk A.4, Dampspanning

Hoofdstuk A.6, Oplosbaarheid in water

▼**M6**

Hoofdstuk A.8, Verdelingscoëfficiënt, schudflesmethode

Hoofdstuk A.24, Verdelingscoëfficiënt, HPLC-methode

Hoofdstuk C.7, Afbraak — niet-biologische afbraak: hydrolyse in afhankelijkheid van de pH

Hoofdstuk C.18, Bepaling van de adsorptie/desorptie met behulp van een batch-evenwichtsmethode

Hoofdstuk C.23, Aerobe en anaerobe omzetting in de bodem

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) 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. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OESO (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OESO, Parijs

▼M6

Aanhangsel 1

Definities en eenheden

Verouderd bodemresidu: teststof en omzettingsproducten daarvan die in de bodem aanwezig zijn na aanbrenging en na een periode die zo lang is dat transport-, adsorptie-, metabolisme- en verspreidingsprocessen de verdeling en chemische aard van de aangebrachte teststof kunnen wijzigen (1).

Kunstmatige regen: een oplossing van 0,01 M $CaCl_2$ in gedistilleerd of gedeïoniseerd water.

Gemiddelde uitloogafstand: onderzijde van het bodemdeel waar de cumulatieve recovery van de teststof = 50 % van de totale recovery van de teststof [gewoon uitloogexperiment], of; (onderzijde van bodemdeel waar de cumulatieve recovery van de teststof = 50 % van de totale recovery van de teststof) — ((dikte van laag verouderd residu)/2) [uitloogonderzoek met verouderd residu].

Stof: een stof of een mengsel.

Uitloogvloeistof: waterfase die door een bodemprofiel of een bodemkolom is gesijpeld (1).

Uitloging: proces waarin een stof neerwaarts door het bodemprofiel of een bodemkolom beweegt (1).

Uitloogafstand: diepste bodemsegment waarin ≥ 0,5 % van de gebruikte teststof of verouderd residu na het uitloogproces werd aangetroffen (gelijkwaardig aan de penetratiediepte).

Aantoonbaarheidsgrens en **bepaalbaarheidsgrens**: de aantoonbaarheidsgrens is de laagste concentratie van een stof waarbij de identiteit van de stof nog kan worden onderscheiden van analytische artefacten. De bepaalbaarheidsgrens is de laagste concentratie van een stof waarbij de concentratie nog met aanvaardbare nauwkeurigheid kan worden bepaald.

Relatieve mobiliteitsfactor (RMF): (uitloogafstand van teststof (cm)) / (uitloogafstand van referentiestof (cm))

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

Omzettingsproduct: alle stoffen die ontstaan bij biotische of abiotische omzettingsreacties van de teststof, met inbegrip van CO_2 en in residuen gebonden producten.

Bodem: een mengsel van minerale en organische chemische bestanddelen, waarbij de chemische bestanddelen verbindingen bevatten met een hoog koolstof- en stikstofgehalte en een hoog molecuulgewicht, waarin kleine (voornamelijk micro-)organismen leven. De conditie van de te behandelen bodem kan twee variaties vertonen:

— onverstoord, zoals de bodem zich mettertijd heeft ontwikkeld, in karakteristieke lagen bestaande uit een aantal diverse grondsoorten;

— verstoord, zoals de bodem gewoonlijk wordt aangetroffen in akkerlanden of als het gevolg van graven bij de monstername, d.w.z. de methode die in deze testmethode wordt toegepast (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

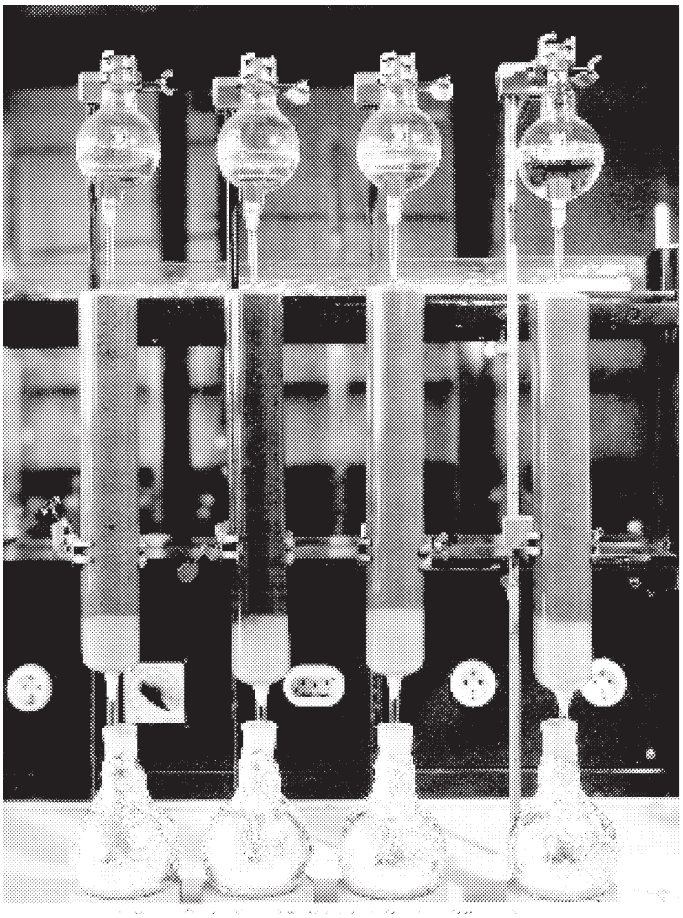
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (goedgekeurd op 12 mei 1981).

▼M6

Aanhangsel 2

Figuur 1

Voorbeeld van niet in compartimenten opdeelbare glazen uitloogkolommen met een lengte van 35 cm en een binnendiameter van 5 cm (1)



← Druppeltrechters voor het toedienen van kunstmatige regen

← Glazen sinterschijf ter voorkoming van verstoring van het bodemoppervlak en ter bevordering van een gelijkmatige verdeling van de kunstmatige regen

← Glazen kolom gevuld met testgrond (bij tests met lichtgevoelige producten moeten de kolommen worden ingepakt in aluminiumfolie)

← Laag kwartszand

← Stop van glaswol om de grond in de kolom te houden

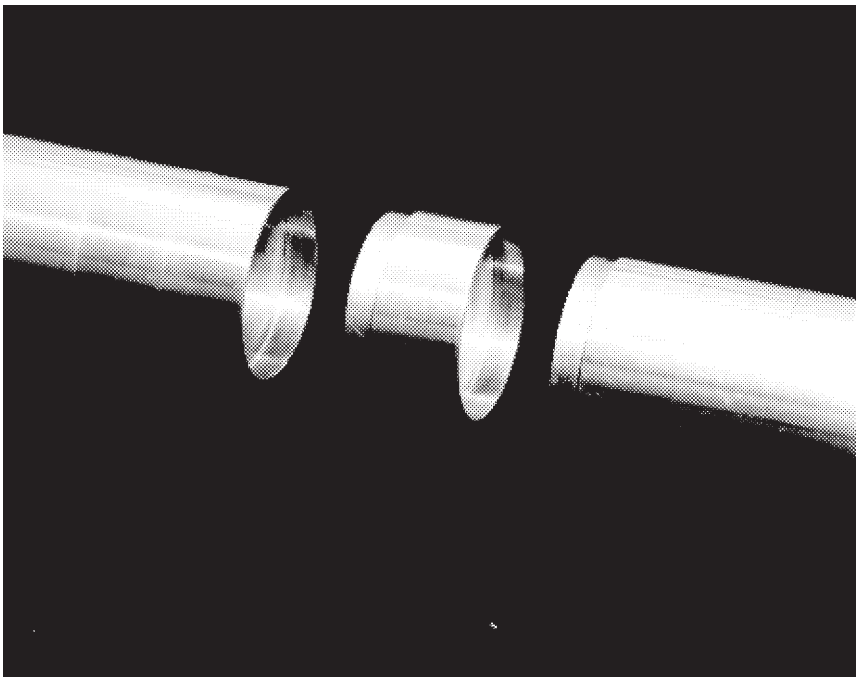
← Fles met ronde bodem voor de verzameling van de uitloogvloeistof, in aluminium ingepakt om fotolyse te voorkomen

(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, Keulen.

▼M6

Figuur 2

Voorbeeld van een in compartimenten opdeelbare metalen kolom met een binnendiameter van 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼M6

Aanhangsel 3

Voorbeelden van relatieve mobiliteitsfactoren (**) (RMF) voor diverse gewasbeschermingsmiddelen (1)(2) en overeenkomstige mobiliteitsklassen (+)

RMF-bereik	Stof (RMF)	Mobiliteitsklasse
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), fluorodifen (0,15)	I immobiel
0,15 - 0,8	Profenofos (0,18), propiconazool (0,23), diazinon (0,28), diuron (0,38), terbutylazine (0,52), methidathion (0,56), prometryn (0,59), propazine (0,64), alachloor (0,66), metolachloor (0,68)	II enigszins mobiel
0,8 - 1,3	Monuron (**) (1,00), atrazine (1,03), simazine (1,04), fluometuron (1,18)	III matig mobiel
1,3 - 2,5	Prometon (1,67), cyanazine (1,85), bromacil (1,91), karbutilaat (1,98)	IV redelijk mobiel
2,5 - 5,0	Carbofuraan (3,00), dioxacarb (4,33)	V mobiel
> 5,0	Monocrotofos (> 5,0), dicrotofos (> 5,0)	VI zeer mobiel

(*) De relatieve mobiliteitsfactor wordt als volgt berekend (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{uitloogafstand van teststof (cm)}}{\text{uitloogafstand van referentiestof (cm)}}$$

(**) Referentiestof

\+ Andere systemen voor de classificatie van de mobiliteit van een stof in de bodem zijn gebaseerd op met dunnelaagchromatografie (4) verkregen R_f -waarden en op K_{oc}-waarden (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment" Canterbury, VK, 1-3 juli 1985.

(2) Guth, J.A. and 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. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) 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. RAMING VAN EMISSIES NAAR HET MILIEU VAN MET CONSERVERINGSMIDDEL BEHANDELD HOUT: LABORATORIUMMETHODE VOOR HOUTEN PRODUCTEN DIE NIET ZIJN BEKLEED EN DIE CONTACT MAKEN MET ZOET WATER OF ZEEWATER

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan OESO-testrichtsnoer (TG) 313 (2007). De emissies naar het milieu van met conserveringsmiddel behandeld hout moeten worden gekwantificeerd om een milieurisicobeoordeling van het behandelde hout mogelijk te maken. Deze testmethode beschrijft een laboratoriummethode voor de raming van emissies van met conserveringsmiddel behandeld hout in twee situaties waarin de emissies in het milieu terecht kunnen komen:

   — emissies van behandeld hout dat in contact staat met zoet water. Emissies kunnen uit het oppervlak van het behandelde hout in het water terechtkomen;

   — emissies van behandeld hout dat in contact staat met zeewater. Emissies kunnen uit het oppervlak van het behandelde hout in het zeewater terechtkomen.

2. Deze testmethode is bedoeld voor het testen van de emissies uit hout en houten producten die niet bekleed zijn en die contact maken met zoet water of zeewater. Gebruiksklassen worden internationaal gebruikt als indeling voor het biologische risico waaraan de behandelde producten zullen worden blootgesteld. Gebruiksklassen definiëren tevens de situatie waarin het behandelde product wordt gebruikt en omvatten een bepaling van de milieucompartimenten (lucht, water, bodem) waarvoor het met conserveringsmiddel behandelde hout mogelijk een risico vormt.

3. De testmethode is een laboratoriumprocedure voor het verzamelen van monsters (uitgeloogde emissies) uit water waarin behandeld hout is ondergedompeld, met steeds langer durende tussenpozen na de blootstelling. De hoeveelheid emissies in de uitgeloogde emissies wordt gekoppeld aan het oppervlak van het hout en de duur van de blootstelling om een stroom in mg/m^2/dag te berekenen. De stroom (uitlogingsgraad) na steeds langer durende blootstellingsperioden kan aldus worden geraamd.

4. De hoeveelheid emissies kan worden gebruikt in een milieurisicobeoordeling van het behandelde hout.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

5. Het mechanisme van uitloging aan het houtoppervlak door zoet water wordt niet verondersteld identiek van aard en intensiteit te zijn aan uitloging aan een houtoppervlak door zeewater. Derhalve is voor houtconserveringsmiddelen of mengsels die worden gebruikt om hout te behandelen en die in zeewateromgevingen worden gebruikt, een uitloogonderzoek voor zeewater nodig.

6. Ingeval met een houtconserveringsmiddel behandeld hout wordt gebruikt, moet dit hout representatief zijn voor in de handel verkrijgbaar hout. Het moet worden behandeld overeenkomstig de instructies van de fabrikant van het conserveringsmiddel en conform de toepasselijke normen en specificaties. De parameters voor het conditioneren van behandeld hout voorafgaand aan de test moeten worden gerapporteerd.

7. De gebruikte houtmonsters moeten representatief zijn voor de gebruikte producten (bijv. met betrekking tot de soort, dichtheid en andere kenmerken).

▼M6

8. De test kan worden toegepast op hout met gebruikmaking van een penetratieproces of oppervlakkige aanbrenging of op behandeld hout dat een aanvullende verplichte oppervlaktebehandeling heeft gehad (bijv. de toepassing van lak als een vereiste voor commercieel gebruik).

9. De samenstelling, hoeveelheid, pH en de fysieke vorm van water is belangrijk voor het bepalen van de hoeveelheid, het gehalte aan en de aard van emissies uit hout.

PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

10. Testmonsters van met conserveringsmiddel behandeld hout worden ondergedompeld in water. Het water (uitgeloogde emissies) wordt gedurende de blootstellingsperiode voldoende vaak bemonsterd en geanalyseerd om statistische berekeningen mogelijk te maken. Emissiewaarden uitgedrukt in mg/m^2/dag worden berekend aan de hand van de analyseresultaten. De bemonsteringsperioden moeten worden genoteerd. Tests met monsters van onbehandeld hout kunnen worden stopgezet, indien er geen achtergrondconcentratie wordt gedetecteerd in de eerste drie datapunten.

11. Het testen van monsters van onbehandeld hout maakt het mogelijk om de achtergrondconcentraties voor andere uitgeloogde emissies uit hout dan het gebruikte conserveringsmiddel te bepalen.

KWALITEITSCRITERIA

Nauwkeurigheid

12. De nauwkeurigheid van de ramingen van emissies in deze testmethode is afhankelijk van de vraag of de testmonsters representatief zijn voor in de handel verkrijgbaar behandeld hout, hoe representatief het water is voor echt water en in hoeverre het blootstellingsregime representatief is voor natuurlijke omstandigheden.

13. De nauwkeurigheid, precisie en herhaalbaarheid van de analysemethode moeten worden bepaald vóór uitvoering van de test.

Reproduceerbaarheid

14. Drie watermonsters worden verzameld en geanalyseerd, waarbij de gemiddelde waarde als emissiewaarde geldt. De reproduceerbaarheid van de resultaten in één laboratorium en tussen verschillende laboratoria is afhankelijk van het onderdompelingsregime en van het als testmonsters gebruikte hout.

Aanvaardbaar resultatenbereik

15. Een bereik van met deze test verkregen resultaten is aanvaardbaar, indien de boven- en ondergrenswaarden een afwijking van minder dan één orde van grootte vertonen.

TESTVOORWAARDEN

Water

16. Uitloogscenario's met zoet water: gedeïoniseerd water (bijv. ASTM D 1193 type II) wordt aanbevolen voor gebruik in de uitloogtest die bedoeld is om hout dat is blootgesteld aan zoet water te beoordelen. De watertemperatuur moet 20 °C +/- 2 °C zijn en de gemeten pH en watertemperatuur moeten in het verslag worden gerapporteerd. Door analyse van monsters van het gebruikte water die worden genomen voordat de behandelde testmonsters worden ondergedompeld, kunnen de geanalyseerde stoffen in het water worden geschat. Dit is een controletest om de achtergrondconcentraties van stoffen te bepalen, die vervolgens chemisch worden geanalyseerd.

▼M6

17. Uitloogscenario's met zeewater: synthetisch zeewater (bijv. ASTM D 1141 surrogaatzeewater, zonder zware metalen) wordt aanbevolen voor gebruik in de uitloogtest die bedoeld is om hout dat is blootgesteld aan zeewater te beoordelen. De watertemperatuur moet 20 °C +/- 2 °C zijn en de gemeten pH en watertemperatuur moeten in het verslag worden gerapporteerd. Door analyse van monsters van het gebruikte water die worden genomen voordat de behandelde testmonsters worden ondergedompeld, kunnen de geanalyseerde stoffen in het water worden geschat. Dit is een controletest om de achtergrondconcentraties van belangrijke stoffen te bepalen.

Houttestmonsters

18. De houtsoort moet overeenkomen met de houtsoort die wordt gebruikt voor tests op de doeltreffendheid van houtconserveringsmiddelen. De aanbevolen soorten zijn *Pinus sylvestris L.* (grove den), *Pinus resinosa Ait*. (harsige den) of *Pinus spp* (den). Aanvullende tests kunnen met andere houtsoorten worden uitgevoerd.

19. Er moet gebruik worden gemaakt van hout met rechte nerven zonder knoesten. Materiaal met een harsachtig voorkomen moet worden vermeden. Het hout moet representatief zijn voor in de handel verkrijgbaar hout. De bron en de dichtheid van en het aantal jaarringen per 10 mm moeten worden gerapporteerd.

20. De aanbevolen houttestmonsters zijn sets van vijf blokken met een omvang conform EN 113 (afmetingen: 25 mm × 50 mm × 15 mm) waarbij de longitudinale oppervlakken parallel lopen aan de draad van het hout, hoewel andere afmetingen zoals 50 mm bij 150 mm bij 10 mm ook kunnen worden gebruikt. Het testmonster moet volledig in water worden ondergedompeld. Testmonsters moeten voor 100 % uit spinthout bestaan. Elk monster wordt van een unieke markering voorzien, zodat het gedurende de gehele test kan worden geïdentificeerd.

21. Alle testmonsters moeten afgeschaafde of afgezaagde oppervlakken hebben, die niet mogen worden gezandstraald.

22. Er moeten ten minste vijf sets houttestmonsters worden gebruikt: drie sets monsters worden met conserveringsmiddel behandeld, één set monsters wordt niet behandeld en één set monsters word gebruikt voor de raming van het ovendroge vochtgehalte van de testmonsters vóór behandeling. Voldoende testmonsters worden bereid om drie sets monsters te kunnen selecteren die binnen 5 % van de gemiddelde waarde van de conserveringsmiddelretenties van het totale aantal testmonsters blijven.

23. Alle testmonsters worden afgedicht met een chemische stof die verhindert dat het conserveringsmiddel tot in het kopshout van de monsters doordringt of die uitloging uit de monsters via het kopshout verhindert. Er moet onderscheid worden gemaakt tussen monsters die worden gebruikt voor oppervlakkige aanbrenging en penetratieprocessen voor het aanbrengen van de afdichtende stof. De afdichtende stof moet enkel in geval van oppervlakkige aanbrenging worden aangebracht vóór de behandeling.

24. Het kopshout moet open zijn voor behandeling door penetratieprocessen. De monsters moeten daarom aan het einde van de conditioneringsperiode worden afgedicht. De emissie hoeft alleen voor het longitudinale oppervlak te worden geraamd. Afdichtingsmiddelen moeten worden geïnspecteerd en opnieuw aangebracht alvorens met het uitlogen te beginnen en mogen niet opnieuw worden aangebracht, nadat het uitlogen is begonnen.

▼M6

Onderdompelingsvat

25. Het vat is gemaakt van een inert materiaal en is groot genoeg om vijf houten monsters conform EN113 te bevatten in 500 ml water, resulterend in een verhouding tussen oppervlakte en watervolume van 0,4 cm^2/ml.

Testinrichting voor de monsters

26. De testmonsters worden gedragen door een inrichting die ervoor zorgt dat alle blootgestelde oppervlakken in aanraking komen met het water.

PROCEDURE VOOR DE BEHANDELING MET CONSERVERINGSMIDDEL

Bereiding van de behandelde testmonsters

27. Het met conserveringsmiddel te behandelen houttestmonster wordt behandeld met behulp van de methode die voor het conserveringsmiddel wordt voorgeschreven; dit kan zijn een penetrerende behandelingsmethode of een proces van oppervlakkige aanbrenging, bijvoorbeeld door onderdompelen, spuiten of aanbrengen met een kwast.

Conserveringsmiddelen die met behulp van een penetratieproces worden aangebracht

28. Er moet een oplossing van het conserveringsmiddel worden bereid die de gespecificeerde opname of retentie tot stand brengt, wanneer het wordt aangebracht met gebruikmaking van het penetrerende behandelingsproces. Het houttestmonster wordt gewogen en de afmetingen ervan worden gemeten. Het penetrerende behandelingsproces moet worden uitgevoerd als gespecificeerd voor de aanbrenging van conserveringsmiddel op hout van gebruiksklasse 4 of 5. Het monster wordt na de behandeling opnieuw gewogen en de retentie van het conserveringsmiddel (kg/m^3) wordt berekend met de vergelijking:

$$\frac{\text{Massa na behandeling(kg)} - \text{Massa vóór behandeling(kg)}}{\text{Volume testmonster}(m^3)} \times \frac{\text{Concentratie oplossing(\% massa/massa)}}{100}$$

29. Opgemerkt zij dat hout dat is behandeld in een industriële installatie voor de bewerking van hout (bijv. door middel van impregnering onder vacuüm) ook in deze test kan worden gebruikt. De gebruikte procedures moeten worden gerapporteerd en de retentie van materiaal op deze manier moet worden geanalyseerd en gerapporteerd.

Conserveringsmiddelen die door middel van oppervlakkige aanbrenging worden aangebracht

30. Bij het proces van oppervlakkige aanbrenging kan het gaan om onderdompelen, spuiten of met een kwast bewerken van de testmonsters. Het proces en de dosering (bijv. liter/m^2) moeten worden uitgevoerd als gespecificeerd voor de oppervlakkige aanbrenging van het conserveringsmiddel.

31. Ook in dit geval kan hout dat is behandeld in een industriële installatie voor de bewerking van hout in de test worden gebruikt. De gebruikte procedures moeten worden gerapporteerd en de retentie van materiaal op deze manier moet worden geanalyseerd en gerapporteerd.

Conditionering van de testmonsters na behandeling

32. Nadat ze zijn behandeld, moeten de testmonsters worden geconditioneerd overeenkomstig de aanbevelingen van de fabrikant van het conserveringsmiddel conform de vereisten op het etiket van het conserveringsmiddel of conform in de handel gangbare behandelingspraktijken of conform de norm EN 252.

▼M6

Bereiding en selectie van testmonsters

33. Na de op de behandeling volgende conditionering wordt de gemiddelde retentie van de groep testmonsters berekend en worden drie representatieve sets monsters met een retentie binnen 5 % van het gemiddelde voor de groep volgens steekproef gekozen voor uitloogmetingen.

PROCEDURE VOOR METINGEN VAN CONSERVERINGSMIDDEL-EMISSIES

Onderdompelingsmethode

34. De testmonsters worden gewogen en vervolgens volledig ondergedompeld in het water, waarbij de datum en het tijdstip worden genoteerd. Het vat wordt afgedekt om verdamping te verminderen.

35. Het water wordt op de volgende momenten ververst: na 6 uur, 1 dag, 2 dagen, 4 dagen, 8 dagen, 15 dagen, 22 dagen, 29 dagen (opmerking: het gaat steeds om de totale duur, niet de duur van een interval). Het tijdstip en de datum van de waterverversingen alsmede de massa van het uit het vat verwijderde water moeten worden gerapporteerd.

36. Na iedere waterverversing wordt een monster van het water waarin een set testmonsters is ondergedompeld apart gehouden om chemisch te worden geanalyseerd.

37. Deze bemonsteringsprocedure maakt het mogelijk om het profiel van de hoeveelheid emissies uitgezet tegen de tijd te berekenen. Monsters moeten worden opgeslagen onder omstandigheden waardoor de te analyseren stof behouden blijft, bijv. in een koeler in het donker om microbiële groei in het monster vóór de analyse te verminderen.

EMISSIEMETINGEN

Behandelde monsters

38. Het bemonsterde water wordt chemisch geanalyseerd op de actieve stof en/of relevante afbraak-/omzettingsproducten, indien van toepassing.

Onbehandelde monsters

39. Door het bemonsterde water (uitgeloogde emissies) in dit systeem te analyseren op stoffen die uit de onbehandelde houtmonsters zijn geloogd, kan de mogelijke emissiewaarde van het conserveringsmiddel uit onbehandeld hout worden geraamd. Door de uitgeloogde emissies te bemonsteren en analyseren na steeds langer durende blootstellingsperioden, kan de verandering in de emissiewaarde na verloop van tijd worden geraamd. Deze analyse is een controleprocedure om de achtergrondconcentraties van de teststof in onbehandeld hout te bepalen teneinde te bevestigen dat het hout dat als een bron van testmonsters wordt gebruikt, niet eerder reeds met het conserveringsmiddel is behandeld.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Chemische analysen

40. Het bemonsterde water wordt chemisch geanalyseerd en het resultaat van de wateranalyse wordt uitgedrukt in passende eenheden, bijv. µg/l.

Rapportage van gegevens

41. Alle resultaten worden gerapporteerd. Het aanhangsel bevat een voorbeeld van een voorgesteld rapportageformulier voor één set behandelde testmonsters alsmede de samenvattende tabel voor het berekenen van de gemiddelde emissiewaarden voor elk monsternemingsinterval.

42. De dagelijkse emissiestroom in $mg/m^2/dag$ wordt berekend door het gemiddelde van de drie metingen van de drie duplo's te nemen en dit te delen door het aantal dagen gedurende welke de monsters ondergedompeld waren.

▼M6

Testverslag

43. Het testverslag moet ten minste de volgende informatie bevatten:

— de naam van de leverancier van het geteste conserveringsmiddel;

— de specifieke en unieke naam of code van het geteste conserveringsmiddel;

— de in de handel gebruikte of triviale naam van het actieve bestanddeel/de actieve bestanddelen met een generieke beschrijving van de formuleringshulpstoffen (bijv. oplosmiddel, hars) en de samenstelling in % m/m van de bestanddelen;

— de relevante retentie of belasting (in respectievelijk kg/m^3 of l/m^2) die is gespecificeerd voor hout dat wordt gebruikt terwijl het in aanraking komt met water;

— de gebruikte houtsoort, met inbegrip van de dichtheid ervan en de groeisnelheid in ringen per 10 mm;

— de belasting of retentie van het geteste conserveringsmiddel en de formule die is gebruikt om de retentie te berekenen, uitgedrukt in l/m^2 of kg/m^3;

— de methode van aanbrenging van het conserveringsmiddel, waarbij het voor een penetratieproces gebruikte behandelingsregime moet worden gespecificeerd, alsmede de methode van aanbrenging, indien een oppervlakkige behandeling is gebruikt;

— de datum van de aanbrenging van het conserveringsmiddel en een raming van het vochtgehalte van de testmonsters, uitgedrukt als een percentage;

— de toegepaste conditioneringsprocedures, waarbij het type, de omstandigheden en de duur moeten worden aangegeven;

— opgave van het gebruikte afdichtingsmiddel en het aantal keren dat het is aangebracht;

— opgave van eventuele bijkomende behandeling van het hout, bijv. opgave van de leverancier, het type, de kenmerken en de belasting van een lak;

— het tijdstip en de datum van elke onderdompeling, de gebruikte hoeveelheid water voor de onderdompeling van de testmonsters bij elke onderdompeling en de hoeveelheid door het hout tijdens de onderdompeling geabsorbeerde water;

— eventuele afwijkingen van de beschreven methode en eventuele factoren die mogelijk van invloed waren op de resultaten.

LITERATUUR

(1) Europese norm, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) Europese norm, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) Europese norm, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) Europese norm, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part 1: General.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Aanhangsel 1

Rapportageforulier voor testmethode

Raming van emissies naar het milieu van met conserveringsmiddel behandeld hout: laboratoriummethode voor houten producten die niet zijn bekleed en die contact maken met zoet water of zeewater

Testlaboratorium	

Houtconserveringsmiddel

Leverancier van het conserveringsmiddel	
Specifieke en unieke naam of code van het geteste conserveringsmiddel	
In de handel gebruikte of triviale naam van het conserveringsmiddel	
Formuleringshulpstoffen	
Relevante retentie voor hout dat wordt gebruikt terwijl het in contact komt met water	

Aanbrenging

Aanbrengingsmethode	
Datum van aanbrenging	
Voor de berekening van de retentie gebruikt formule:	
Conditioneringsprocedure	
Duur van de conditionering	
Afdichtingsmiddel/aantal keren aangebracht	
Nabehandeling	indien van toepassing

Testmonsters

Houtsoort	
Dichtheid van het hout	(minimum … gemiddelde … maximum)
Groeisnelheid (ringen per 10 mm)	(minimum … gemiddelde … maximum)
Vochtgehalte	

▼**M6**

Testinrichtingen (*)	**Retentie (bijv. kg/m^3)**
Behandeld „x”	Gemiddelde waarde en standaardafwijking of bereik voor 5 monsters
Behandeld „y”	Gemiddelde waarde en standaardafwijking of bereik voor 5 monsters
Behandeld „z”	Gemiddelde waarde en standaardafwijking of bereik voor 5 monsters
Onbehandeld	
Variatie van testmethodeparameters	bijv. waterkwaliteit, afmetingen van testmonsters, enz.

(*) x, y, z staan voor de drie duplomonsters

▼M6

Tijd	Waterver-versing	Massa van testmonster		Wateropname		Watermonster				
		Behandeld (gemiddelde)	Onbehandeld	Behandeld (gemiddelde)	Onbehandeld		Testwater	x	y	z
	Datum	g	g	g	g	nr.	pH	pH	pH	pH
Start										
6 u						1				
24 u						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 2016

▼M6

Vul een afzonderlijke tabel in voor ieder actief bestanddeel

Tijd	Waterverver-sing	Analyseresultaten															
		Onbehandelde testmonsters			Behandelde testmonsters												
		Concentratie actief bestanddeel in water mg/l	Geëmit-teerde hoeveel-heid mg/m^2	Emissie-waarde $mg/m^2/d$	Concentratie actief bestanddeel in water				Geëmitteerde hoeveelheid				Emissiewaarde			
					x	y	z	Gemid-delde	x	y	z	Gemid-delde	x	y	z	Gemiddelde
	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 u																
24 u																
2 d																
4 d																
8 d																
15 d																
22 d																
29 d																

Toelichting: Aangezien met het onbehandelde monster verkregen resultaten mogelijk moeten worden gebruikt om met het behandelde monster verkregen emissiewaarden te corrigeren, moeten de resultaten van het onbehandelde monster eerst komen en worden alle waarden voor behandelde monsters geacht „gecorrigeerde waarden” te zijn. Er kan ook een correctie voor de initiële wateranalyse zijn.

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 2017

▼**M6**

Aanhangsel 2

Definities

Stof: een stof of een mengsel.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

▼M6

C.46. BIOACCUMULATIE IN IN SEDIMENT LEVENDE BENTISCHE OLIGOCHAETAE

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan OESO-testrichtsnoer (TG) 315 (2008). Sediment opnemende endobentische dieren zijn voorwerp van een potentiële blootstelling aan sedimentgebonden stoffen (1). Van deze sediment opnemende dieren spelen de aquatische Oligochaetae een belangrijke rol in de bodems van de aquatische systemen. Ze leven in het sediment en zijn vaak de meest voorkomende soort, met name in habitats met milieuomstandigheden die ongunstig zijn voor andere dieren. Door bioturbatie van het sediment en doordat ze als prooi dienen, kunnen deze dieren een grote invloed hebben op de biologische beschikbaarheid van chemische stoffen voor andere organismen, bijv. bentische vissen. In tegenstelling tot epibentische organismen, graven endobentische aquatische Oligochaetae zich in het sediment in en nemen zij onder het sedimentoppervlak sedimentdeeltjes op. Als gevolg hiervan worden deze organismen blootgesteld aan stoffen via vele opnameroutes, waaronder direct contact, opname van verontreinigde sedimentdeeltjes, poriënwater en bovenstaand water. In aanhangsel 6 zijn een aantal van de momenteel in ecotoxicologische tests gebruikte soorten bentische Oligochaetae beschreven.

2. De parameters die kenmerkend zijn voor de bioaccumulatie van een teststof zijn in de eerste plaats de bioaccumulatiefactor (BAF), de sedimentopnamesnelheidsconstante (k_s) en de eliminatiesnelheidsconstante (k_e). In aanhangsel 1 zijn gedetailleerde definities van deze parameters opgenomen.

3. Voor onderzoek naar het bioaccumulatiepotentieel van stoffen in het algemeen en naar de bioaccumulatie van stoffen met de neiging zich in of over de sedimenten te verdelen, is een compartimentspecifieke test nodig (1)(2)(3)(4).

4. Deze testmethode is bedoeld om de bioaccumulatie van sedimentgebonden stoffen in endobentische Oligochaetae te beoordelen. Het sediment wordt verrijkt met de teststof. Het gebruik van verrijkt sediment heeft ten doel een verontreinigd sediment te simuleren.

5. De onderhavige methode is gebaseerd op bestaande methoden voor toxiciteits- en bioaccumulatietests in sedimenten, bijv. (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Andere nuttige documenten zijn de discussies en resultaten van een internationale workshop (11) en de uitkomsten van een internationale ringtest (12).

6. Deze test is van toepassing op stabiele, neutrale organische stoffen die een neiging tot hechting aan sedimenten vertonen. Bioaccumulatie van sedimentgebonden, stabiele metallo-organische verbindingen kan eveneens met deze methode worden gemeten (12). De methode is niet toepasbaar op metalen en andere sporenelementen (11) zonder aanpassing van de testopzet met betrekking tot substraat en watervolumes, en mogelijk de omvang van weefselmonsters.

VEREISTEN EN INFORMATIE MET BETREKKING TOT DE TESTSTOF

7. Er zijn momenteel slechts enkele afdoende bewezen kwantitatieve structuuractiviteitsrelaties (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) betreffende bioaccumulatieprocessen beschikbaar (14). De vaakst gebruikte relatie is de correlatie tussen respectievelijk de bioaccumulatie en bioconcentratie van stabiele organische stoffen en hun lipofiliciteit (uitgedrukt als de logaritme van de octanol-waterverdelingscoëfficiënt (log K_{ow}); zie aanhangsel 1 voor een definitie), die ontwikkeld is om de verdeling van een stof

▼M6

tussen water en vis te beschrijven. Correlaties voor het sedimentcompartiment zijn met behulp van deze relatie tevens vastgesteld (15)(16)(17)(18). De correlatie tussen log K_{ow} en log BCF (bioconcentratiefactor) als een belangrijke QSAR kan nuttig zijn voor een eerste voorlopige raming van het bioaccumulatiepotentieel van sedimentgebonden stoffen. De BAF kan echter worden beïnvloed door het vetgehalte van het testorganisme en het gehalte organische koolstof van het sediment. Daarom kan de koolstof-waterverdelingscoëfficiënt (K_{oc}) ook worden gebruikt als een belangrijke bepalende factor voor de bioaccumulatie van sedimentgebonden organische stoffen.

8. Deze test is van toepassing op:

— stabiele, organische stoffen met een log K_{ow} tussen 3,0 en 6,0 (5)(19) alsmede zeer lipofiele stoffen die een log K_{ow} van meer dan 6,0 vertonen (5);

— stoffen die behoren tot een klasse van organische stoffen waarvan bekend is dat ze kunnen bioaccumuleren in levende organismen, bijv. oppervlakteactieve stoffen of stoffen met een hoog adsorptievermogen (bijv. hoge K_{oc}).

9. Vóór het begin van de studie moet informatie over de teststof worden verzameld, zoals voorzorgsmaatregelen, passende opslagomstandigheden en stabiliteit alsmede de analysemethoden. Richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat ze moeilijk te testen zijn, worden gegeven in (20) en (21). Vóór de uitvoering van een bioaccumulatietest met bentische Oligochaetae moet de volgende informatie over de teststof bekend zijn:

— de triviale naam, chemische naam (bij voorkeur de IUPAC-naam), structuurformule, CAS-registratienummer, zuiverheid;

— de oplosbaarheid in water [testmethode A.6 (22)];

— de octanol-waterverdelingscoëfficiënt, K_{ow} [testmethoden A.8, A.24 (22)];

— de sediment-waterverdelingscoëfficiënt, uitgedrukt als K_d of K_{oc} [testmethode C.19 (22)];

— de hydrolyse [testmethode C.7 (22)];

— de fototransformatie in water (23);

— de dampspanning [testmethode A.4 (22)];

— de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid [testmethoden C.4 en C.29 (22)];

— de oppervlaktespanning [testmethode A.5 (22)];

— de kritische micelconcentratie (24).

Daarnaast is de volgende informatie, indien beschikbaar, relevant:

— de biologische afbraak in het aquatische milieu [testmethoden C.24 en C.25 (22)];

— de constante van de wet van Henry.

10. Radioactief gemerkte teststoffen kunnen de analyse van water-, sediment- en biologische monsters vergemakkelijken en kunnen worden gebruikt om te bepalen of de afbraakproducten moeten worden gekwantificeerd. De hier beschreven methode is gevalideerd in een internationale ringtest (12) voor met ^{14}C gemerkte stoffen. Indien het totaal aan radioactieve residuen wordt gemeten, wordt de bioaccumulatiefactor (BAF) gebaseerd op de oorspronkelijke stof met inbegrip van eventuele retentie van afbraakproducten. Het is ook mogelijk om een metabolismeonderzoek te combineren met een bioaccumulatieonderzoek door middel van de analyse en kwantificering van het

▼M6

percentage van de oorspronkelijke teststof en de afbraakproducten daarvan in monsters die worden genomen aan het einde van de opnamefase of op het piekniveau van bioaccumulatie. In ieder geval wordt aanbevolen de berekening van de BAF te baseren op de concentratie van de oorspronkelijke teststof in de organismen en niet alleen op het totaal aan actieve residuen.

11. In aanvulling op de kenmerken van de teststof is er informatie nodig over de toxiciteit ervan voor de soort Oligochaetae die in de test wordt gebruikt, zoals een mediane letale concentratie (LC_{50}) voor de voor de opnamefase benodigde tijd, om te waarborgen dat de gekozen blootstellingsconcentraties veel lager zijn dan toxische concentraties. De voorkeur moet worden gegeven aan toxiciteitswaarden die zijn afgeleid uit langetermijnonderzoek naar subletale eindpunten (EC_{50}). Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, kan nuttige informatie worden ontleend aan een test op acute toxiciteit onder omstandigheden die identiek zijn aan die van bioaccumulatietests of aan toxiciteitsgegevens over andere surrogaatsoorten.

12. Er moet een geschikte analysemethode met een bekende juistheid, precisie en gevoeligheid voor de kwantificering van de chemische stof in de testoplossingen, in het sediment en in het biologische materiaal beschikbaar zijn, alsook nadere gegevens met betrekking tot monsterbereiding en -opslag en veiligheidsinformatiebladen voor materialen. De analytische aantoonbaarheidsgrenzen van de teststof in water, sediment en wormweefsel moeten eveneens bekend zijn. Indien een radioactief gemerkte teststof wordt gebruikt, moeten de specifieke radioactiviteit (d.w.z. Bq mol^{-1}), de positie van het radioactief gemerkte atoom en het percentage van de met onzuiverheden verbonden radioactiviteit bekend zijn. De specifieke radioactiviteit van de teststof moet zo hoog mogelijk zijn om zo laag mogelijke teststofconcentraties te kunnen aantonen (11).

13. Er moet informatie beschikbaar zijn over kenmerken van het te gebruiken sediment (bijv. de oorsprong van het sediment of de bestanddelen ervan, de pH-waarde en de ammoniakconcentratie van het poriënwater (veldsedimenten), het gehalte organische koolstof (TOC), de deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei) en het percentage drooggewicht) (6).

PRINCIPE VAN DE TEST

14. De test bestaat uit twee fasen: de opnamefase (blootstelling) en de eliminatiefase (na blootstelling). Tijdens de opnamefase worden wormen blootgesteld aan met de teststof verrijkt sediment dat is overgoten met synthetisch water en zo nodig geëquilibreerd (11). Groepen controlewormen worden onder identieke omstandigheden zonder de teststof gehouden.

15. Voor de eliminatiefase worden de wormen overgebracht naar een sediment-watersysteem dat vrij is van teststof. Een eliminatiefase is nodig om informatie te verkrijgen over de snelheid waarmee de teststof door de testorganismen wordt uitgescheiden (19)(25). Een eliminatiefase is altijd nodig, tenzij opname van de teststof tijdens de blootstellingsfase verwaarloosbaar was (bijv. als er geen statistisch verschil was tussen de concentratie van de teststof in test- en controlewormen). Indien tijdens de opnamefase geen stationaire toestand is bereikt, kan de bepaling van de kinetische parameters — kinetische bioaccumulatiefactor BAF_k, opname- en eliminatiesnelheidsconstante(n) — worden gebaseerd op de resultaten van de eliminatiefase. De verandering in de concentratie van de teststof in/op de wormen wordt gedurende beide fasen gemonitord.

16. Tijdens de opnamefase worden metingen uitgevoerd totdat BAF een plateaufase of stationaire toestand heeft bereikt. De duur van de opnamefase moet standaard 28 dagen zijn. De praktijk heeft uitgewezen dat een opnamefase van 12 tot 14 dagen voldoende is om meerdere stabiele, neutrale organische stoffen een stationaire toestand te laten bereiken (6)(8)(9).

▼M6

17. Als de stationaire toestand binnen 28 dagen niet is bereikt, wordt de eliminatiefase gestart door de aan de teststof blootgestelde Oligochaetae over te brengen naar vaten met daarin hetzelfde medium, maar zonder de teststof. De eliminatiefase wordt beëindigd hetzij wanneer een in de wormen gemeten concentratie van 10 % op dag 28 van de opnamefase wordt bereikt, hetzij na een maximale duur van 10 d. De residuconcentratie in de wormen aan het einde van de eliminatiefase wordt gerapporteerd als een aanvullend eindpunt, bijv. als niet-geëlimineerde residuen (NER). De bioaccumulatiefactor (BAF_{ss}) wordt bij voorkeur berekend op twee manieren: als de verhouding tussen de concentratie in wormen (C_a) en in het sediment (C_s) bij een kennelijke stationaire toestand, en als een kinetische bioaccumulatiefactor, BAF_K, zijnde de verhouding tussen de snelheidsconstante van opname uit het sediment (k_s) en de eliminatiesnelheidsconstante (k_e), uitgaande van eersteordekinetiek. Indien een stationaire toestand niet wordt bereikt binnen 28 dagen, moet BAF_K worden berekend aan de hand van de opnamesnelheids- en eliminatiesnelheidsconstante(n). Zie aanhangsel 2 voor de berekening. Indien eersteordekinetiek niet van toepassing is, moeten complexere modellen worden gebruikt (aanhangsel 2 en referentie (25).

18. Indien binnen 28 dagen geen stationaire toestand wordt bereikt, kan de opnamefase facultatief worden verlengd door groepen aan de teststof blootgestelde wormen, indien beschikbaar, te onderwerpen aan verdere metingen totdat de stationaire toestand wordt bereikt. Desondanks moet in dat geval de eliminatiefase parallel worden gestart op dag 28 van de opnamefase.

19. De opnamesnelheidsconstante, de eliminatiesnelheidsconstante (of -constanten, indien complexere modellen gebruikt worden), de kinetische bioaccumulatiefactor (BAF_K) en, indien mogelijk, de betrouwbaarheidsgrenzen van elk van deze parameters worden berekend met behulp van gecomputeriseerde modelvergelijkingen (zie aanhangsel 2 voor modellen). De geschiktheid voor regressieanalyse van ieder model dat wordt gebruikt, kan worden bepaald aan de hand van bijvoorbeeld de correlatiecoëfficiënt of de determinatiecoëfficiënt (coëfficiënten die in de buurt van één liggen, duiden op goede geschiktheid).

20. Ter vermindering van de variabiliteit in de testresultaten voor teststoffen met een hoge lipofiliciteit moeten de bioaccumulatiefactoren aanvullend worden uitgedrukt in verhouding tot het vetgehalte en het gehalte aan organische koolstof (TOC) in het sediment (biota-sedimentaccumulatiefactor (BSAF) in kg sediment TOC kg^{-1} vetgehalte van de wormen). Deze aanpak is gebaseerd op ervaringen en theoretische correlaties voor het aquatische compartiment, waarin er voor sommige chemische klassen een duidelijk verband bestaat tussen het bioaccumulatiepotentieel van een stof en de lipofiliciteit ervan; dit is duidelijk vastgesteld voor vissen (14)(25)(27). Er bestaat tevens een verband tussen het vetgehalte van de testvis en de geconstateerde bioaccumulatie van dergelijke stoffen. Voor bentische organismen zijn soortgelijke correlaties gevonden, (15)(16)(17)(18). Indien voldoende wormweefsel beschikbaar is, kan het vetgehalte van de proefdieren op hetzelfde biologische materiaal worden bepaald als het materiaal dat gebruikt is om de concentratie van de teststof te bepalen. Om praktische redenen wordt echter aanbevolen om geacclimatiseerde controledieren minimaal bij de start te gebruiken of, bij voorkeur, aan het einde van de opnamefase om het vetgehalte te meten, dat vervolgens kan worden gebruikt om de BAF-waarden te normaliseren.

GELDIGHEID VAN DE TEST

21. Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig:

— de cumulatieve mortaliteit van de wormen (controle- en blootgestelde groepen) tot het einde van de test mag niet meer dan 20 % van het oorspronkelijke aantal bedragen;

— daarnaast moet worden aangetoond dat de wormen zich in het sediment ingraven, wat maximale blootstelling mogelijk maakt. Zie punt 28 voor nadere gegevens.

▼M6

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Diersoort

22. Diverse soorten aquatische Oligochaetae kunnen voor de test worden gebruikt. De vaakst gebruikte soorten worden vermeld in aanhangsel 6.

23. Toxiciteitstests (96 uur, uitsluitend in water) moeten op regelmatige basis (bijv. eenmaal per maand) worden uitgevoerd met een toxische referentiestof zoals kaliumchloride (KCl) of kopersulfaat ($CuSO_4$) (1) om de gezondheidstoestand van de proefdieren aan te tonen (1)(6). Indien referentietoxiciteitstests niet op regelmatige basis worden uitgevoerd, moet de totale groep organismen die in een sedimentbioaccumulatietest wordt gebruikt, worden gecontroleerd met gebruikmaking van een toxische referentiestof. Metingen van het vetgehalte kan ook nuttige informatie over de conditie van de dieren geven.

Kweken van de testorganismen

24. Om te zorgen voor voldoende wormen voor de uitvoering van bioaccumulatietests moeten de wormen mogelijk permanent worden gehouden in een laboratoriumcultuur met één soort. Laboratoriumkweekmethoden voor de gekozen testsoorten worden samengevat in aanhangsel 6. Zie voor nadere gegevens de referenties (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Apparatuur

25. Voor alle onderdelen van de apparatuur moet het gebruik van materialen die teststoffen kunnen oplossen of absorberen of andere stoffen kunnen logen en die een schadelijk effect op de proefdieren hebben, worden vermeden. Er kan gebruik worden gemaakt van rechthoekige of cilindervormige standaardkamers met een passend volume van een chemisch inert materiaal die geschikt zijn voor de densiteit, d.w.z. het aantal testwormen. Het gebruik van zachte kunststof slangen voor het toedienen van water of lucht moet worden vermeden. Voor apparatuur die in contact komt met de testmedia, moet polytetrafluoroethyleen, roestvrij staal en/of glas worden gebruikt. Voor stoffen met een hoge adsorptiecoëfficiënt, zoals synthetische pyretroïden, kan het noodzakelijk zijn gesilaniseerd glas te gebruiken. In deze situaties moet de apparatuur na gebruik als afval worden verwijderd (5). Bij radioactief gemerkte stoffen en bij vluchtige stoffen moet stripping en het ontsnappen van de gestripte stof worden voorkomen. Er moeten afscheiders (bijv. gaswasflessen van glas) met geschikte absorptiemiddelen worden gebruikt om eventuele residuen die uit de testkamers verdampen, op te vangen (11).

Water

26. Het bovenstaande water moet zodanig zijn dat de testsoort daarin gedurende de acclimatisatie en de looptijd van de test kan overleven zonder dat de specimens een abnormaal aspect of gedrag gaan vertonen. Synthetisch water conform testmethode C.1 (25) wordt aanbevolen om te gebruiken als bovenstaand water en in de laboratoriumculturen van de wormen. Het is aangetoond dat diverse testsoorten in dit water kunnen overleven, groeien en zich kunnen voortplanten (8) en dat er zo wordt gezorgd voor maximale standaardisatie van de test- en kweekomstandigheden. Het water moet worden gekarakteriseerd voor in elk geval de pH-waarde, het geleidende vermogen en de hardheid. Analyse van het water op microverontreinigingen vóór gebruik kan in dit verband nuttige informatie opleveren (aanhangsel 4).

27. Het water dient gedurende de test een constante kwaliteit te vertonen. Het bovenstaande water moet een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben. De totale hardheid moet bij het begin van de test tussen 90 en 400 mg $CaCO_3$ per liter liggen (7). Het pH-bereik en het hardheidsbereik in het voornoemde synthetische water worden gegeven in testmethode C.1 (25). Indien er een

▼M6

interactie tussen de hardheidsionen en de teststof wordt vermoed, moet water met een lagere hardheid worden gebruikt. Aanhangsel 4 geeft een overzicht van aanvullende criteria voor aanvaardbaar verdunningswater overeenkomstig OESO-testrichtsnoer (TG) 210 (34).

Sediment

28. Het sediment moet van een dusdanige kwaliteit zijn dat de testorganismen kunnen overleven en, bij voorkeur, zich kunnen voortplanten gedurende de acclimatiserings- en testperioden, zonder een abnormaal uiterlijk te hebben of abnormaal gedrag te vertonen. De wormen moeten tunnels in het sediment graven. Graafgedrag kan van invloed zijn op de blootstelling en daardoor ook op de BAF. Daarom moet vermijding van het sediment of het graafgedrag van de testorganismen worden gerapporteerd, voor zover de troebelheid van het bovenstaande water dergelijke waarnemingen toelaat. De wormen (controle- en blootgestelde groepen) moeten zich in het sediment ingraven binnen een periode van 24 uur na toevoeging aan de testvaten. Indien de wormen permanent geen tunnels graven of het sediment blijven vermijden (bijv. meer dan 20 % gedurende meer dan de helft van de opnamefase), duidt dit erop dat de testomstandigheden niet passend zijn of dat de testorganismen niet gezond zijn of dat de concentratie van de teststof dit gedrag veroorzaakt. In een dergelijk geval moet de test worden stopgezet en herhaald onder verbeterde omstandigheden. Aanvullende informatie over opname van sediment kan worden verkregen door de methoden te gebruiken als beschreven in (35) en (36), die sedimentopname of deeltjesselectie in de testorganismen specificeren. Indien dit kan worden waargenomen, moet de aan- of afwezigheid van fecaal materiaal op het sedimentoppervlak, die duiden op opname van sediment door de wormen, worden genoteerd en in overweging worden genomen bij de interpretatie van de testresultaten voor wat betreft de blootstellingsroutes.

29. Een kunstmatig sediment op basis van de in testmethode C.8 (40) kunstmatige grond wordt aanbevolen voor gebruik in zowel de tests als de laboratoriumculturen van de wormen (aanhangsel 5), aangezien natuurlijke sedimenten van toereikende kwaliteit mogelijk niet gedurende het gehele jaar verkrijgbaar zijn. Daarnaast kunnen inheemse organismen alsook de mogelijke aanwezigheid van microverontreinigingen in natuurlijke sedimenten van invloed zijn op de test. Diverse testsoorten kunnen overleven, groeien en zich voortplanten in het kunstmatige sediment (8).

30. Het kunstmatige sediment moet worden gekarakteriseerd met ten minste de oorsprong van de bestanddelen, de deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei), het gehalte aan organische koolstof (TOC), het watergehalte en de pH. Meting van het redoxpotentiaal is facultatief. Natuurlijke sedimenten van niet-verontreinigde terreinen kunnen echter ook als test- en/of kweeksediment dienen (1). Natuurlijke sedimenten moeten worden gekarakteriseerd met ten minste de oorsprong (plaats van verzameling), pH en ammoniakgehalte van het poriënwater, gehalte aan organische koolstof (TOC), deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei) en het procentuele watergehalte (6). Aanbevolen wordt het natuurlijke sediment, voordat het wordt verrijkt met de teststof, zeven dagen te laten rusten onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen, indien ammoniakontwikkeling wordt verwacht. Aan het eind van deze conditioneringsperiode moet het bovenstaande water worden verwijderd en weggegooid. Analyse van het sediment of de bestanddelen ervan op microverontreinigingen vóór gebruik kan in dit verband nuttige informatie opleveren.

Voorbereiding

31. De bewerking van natuurlijke sedimenten vóór het gebruik ervan in het laboratorium is beschreven in (1)(6)(44). De bereiding van het kunstmatige sediment wordt beschreven in aanhangsel 5.

▼M6

Opslag

32. Natuurlijke sedimenten moeten zo kort mogelijk in het laboratorium worden opgeslagen. U.S. EPA (6) beveelt een maximale opslagperiode van 8 weken aan, in het donker bij 4 ± 2 °C. In de opslagvaten mag boven het sediment geen gasruimte zijn. Aanbevelingen voor de opslag van kunstmatig sediment worden gegeven in aanhangsel 5.

Het aanbrengen van de teststof

33. Het sediment wordt verrijkt met de teststof. De verrijkingsprocedure houdt in dat op een of meer bestanddelen een laag teststof wordt aangebracht. Zo kan het kwartszand, of een deel ervan (bijv. 10 g kwartszand per testvat) worden doordrenkt met een oplossing van de teststof in een geschikt oplosmiddel, dat vervolgens langzaam wordt ingedampt. Vervolgens kan het met een laag van de teststof bedekte deel met het vochtige sediment worden gemengd. Bij de bereiding van het sediment moet rekening worden gehouden met de hoeveelheid zand die in het mengsel van teststof en zand aanwezig is (het sediment wordt dus met minder zand bereid) (6).

34. In geval van een natuurlijk sediment kan de teststof worden toegevoegd door een gedroogd deel van het sediment te verrijken op de wijze zoals hierboven voor het kunstmatige sediment is beschreven, of door de teststof door het vochtige sediment te roeren, met daarna verdamping indien een solubilisator is gebruikt. Geschikte oplosmiddelen voor het verrijken van vochtig sediment zijn ethanol, methanol, ethyleenglycol-monomethylether, ethyleenglycol-dimethylether, demithylformamide en triëthyleenglycol (5)(34). De toxiciteit en vluchtigheid van het oplosmiddel alsmede de oplosbaarheid van de teststof in het gekozen oplosmiddel moeten de voornaamste criteria zijn op basis waarvan een geschikte solubilisator wordt gekozen. Aanvullende richtsnoeren voor verrijkingsprocedures worden gegeven in Environment Canada (1995)(41). De aan het sediment toegevoegde teststof moet zorgvuldig en gelijkmatig over het sediment worden verdeeld. Deelsteekproeven in duplo van het verrijkte sediment moeten worden geanalyseerd om de concentraties van de teststof in het sediment te controleren en om de mate van homogeniteit van de teststofverdeling te bepalen.

35. Nadat het verrijkte sediment met bovenstaand water is bereid, is het wenselijk de teststof zich te laten verdelen tussen het sediment en de waterfase. Dit moet bij voorkeur gebeuren onder de in de test heersende temperatuur- en beluchtingsomstandigheden. De tijd die nodig is voor equilibratie, hangt af van het sediment en de stoffen en kan variëren van enkele uren tot verscheidene dagen en soms zelfs weken (4-5 weken) (28)(42). In deze test wordt niet gewacht tot een evenwicht is ontstaan, maar wordt een equilibratieperiode van 48 uur tot 7 dagen aanbevolen. Afhankelijk van het doel van de studie, bijvoorbeeld wanneer milieuomstandigheden moeten worden nagebootst, kan het verrijkte sediment gedurende een langere periode geëquilibreerd of „gerijpt” worden (11).

UITVOERING VAN DE TEST

Inleidende test

36. Het verdient aanbeveling een verkennende proef uit te voeren om de testomstandigheden bij de definitieve test (bijvoorbeeld teststofconcentraties, duur van de opname- en de eliminatiefase) te optimaliseren. Het gedrag van wormen, bijvoorbeeld vermijding van sediment, waarbij wormen uit

▼M6

het sediment ontsnappen, hetgeen door de teststof en/of het sediment zelf kan worden veroorzaakt, moet in een inleidende test worden geobserveerd en geregistreerd. Vermijding van sediment kan ook worden gebruikt als een subletale parameter in een inleidende test voor het ramen van de in een bioaccumulatietest te gebruiken teststofconcentratie(s).

Blootstellingsomstandigheden

Duur van de opnamefase

37. De testorganismen worden tijdens de opnamefase aan de teststof blootgesteld. Het eerste monster moet 4 tot 24 uur na het begin van de opnamefase worden genomen. De opnamefase dient maximaal 28 dagen te duren (1)(6)(11), tenzij kan worden aangetoond dat reeds eerder een evenwicht wordt bereikt. De stationaire toestand treedt op, wanneer: (i) de bioaccumulatiefactoren bij iedere bemonsteringsperiode, in een grafiek uitgezet tegen de tijd, evenwijdig gaan lopen aan de tijdas; (ii) drie opeenvolgende analysen van BAF van monsters die zijn genomen met tussenpozen van ten minste twee dagen een variatie van niet meer dan ± 20 % ten opzichte van elkaar vertonen; en (iii) er geen significante verschillen zijn tussen de drie bemonsteringsperioden (op basis van statistische vergelijkingen, bijv. analyse van variatie en regressieanalyse). Indien de stationaire toestand na 28 dagen niet is bereikt, kan de opnamefase worden beëindigd door de eliminatiefase te starten, waarbij de BAF_K kan worden berekend aan de hand van de opname- en eliminatiesnelheidsconstanten (zie ook de punten 16 tot en met 18).

Duur van de eliminatiefase

38. Het eerste monster moet 4 tot 24 uur na het begin van de eliminatiefase worden genomen, aangezien zich in de beginperiode snelle veranderingen in weefselresidu kunnen voordoen. Aanbevolen wordt om de eliminatiefase te beëindigen, hetzij wanneer de concentratie van de teststof minder dan 10 % van de concentratie in stationaire toestand is hetzij na een maximale duur van 10 dagen. De residuconcentratie in de wormen aan het einde van de eliminatiefase wordt gerapporteerd als een secundair eindpunt. De duur van de fase kan echter afhankelijk zijn van de tijd gedurende welke de concentratie van de teststof in de wormen boven de analytische aantoonbaarheidsgrens blijft.

Testorganismen

Aantal testwormen

39. Het aantal wormen per monster moet een dusdanige massa wormweefsel opleveren dat de massa van de teststof per monster aan respectievelijk het begin van de opnamefase en het einde van de eliminatiefase significant hoger is dan de detectiegrens voor de teststof in biologisch materiaal. In de voornoemde fasen van de opname- en eliminatiefasen is de concentratie in de proefdieren gewoonlijk relatief laag (6)(8)(18). Aangezien het individuele gewicht bij vele soorten aquatische Oligochaetae zeer laag is (5-10 mg natgewicht per individueel dier voor *Lumbriculus variegatus* en *Tubifex tubifex*), kunnen de wormen van een duplotestkamer in een groep worden gebundeld voor het bepalen van het gewicht en de analyse van de teststof. Voor testsoorten met een hoger individueel gewicht (bijv. *Branchiura sowerbyi*) kunnen duplo's met één individueel dier worden gebruikt, maar in dergelijke gevallen moet het aantal duplo's worden verhoogd tot vijf per bemonsteringspunt (11). Opgemerkt zij echter dat *B. sowerbyi* geen deel uitmaakte van de ringtest (12) en daarom niet wordt aanbevolen als een soort die bij voorkeur binnen deze methode moet worden gebruikt.

40. Er moeten wormen van vergelijkbare grootte worden geselecteerd (zie aanhangsel 6 voor *L. variegatus*). Ze moeten afkomstig zijn van dezelfde bron en het moeten volwassen of grote dieren van dezelfde leeftijdsklasse zijn (zie aanhangsel 6). Het gewicht en de leeftijd van een dier kunnen een significant effect hebben op de BAF-waarden (bijv. vanwege een verschillend vetgehalte en/of de aanwezigheid van eitjes); deze parameters moeten nauwkeurig gerapporteerd worden. Vóór het begin van de test moet een deelsteekproef van wormen worden gewogen om een schatting van het gemiddelde nat- en drooggewicht te verkrijgen.

▼M6

41. Van *Tubifex tubifex* en *Lumbriculus variegatus* wordt verwacht dat ze zich tijdens de testperiode voortplanten. Het uitblijven van voortplanting in een bioaccumulatietest moet worden gerapporteerd en in aanmerking worden genomen bij de interpretatie van de testresultaten.

Densiteit

42. Er moet gebruik worden gemaakt van hoge sediment-worm- en water-wormverhoudingen om de verlaging van de teststofconcentratie in het sediment tijdens de opnamefase tot een minimum te beperken en om vermindering van de opgeloste-zuurstofconcentratie te voorkomen. De gekozen densiteit moet ook overeenkomen met de in de natuur voorkomende populatiedichtheid van de gekozen soort (43). Voor *Tubifex tubifex* bijvoorbeeld wordt een densiteit van 1-4 mg wormweefsel (natgewicht) per gram vochtig sediment aanbevolen (8)(11). In de referenties (1) en (6) wordt voor *L. variegatus* een densiteit aanbevolen van ≤ 1 g drooggewicht wormweefsel per 50 g organische koolstof in het sediment.

43. De in een test te gebruiken wormen worden uit de cultuur verwijderd door het sediment van de cultuur te zeven. De dieren (volwassen of grote wormen zonder tekenen van recente fragmentatie) worden overgebracht naar glazen schalen (bijv. petrischalen) met schoon water. Als de testomstandigheden verschillen van de cultuuromstandigheden, moet een acclimatiseringsfase van 24 uur volstaan. Voordat de wormen worden gewogen, moet aanhangend water van de wormen worden verwijderd. Dit kan worden gedaan door de wormen voorzichtig op een vooraf bevochtigde papieren tissue te plaatsen. Het gebruik van absorberend papier wordt voor dit doel niet aanbevolen, aangezien dit stress voor of beschadiging van de wormen kan veroorzaken. Brunson et al. (1998) hebben het gebruik van niet-drooggedepte wormen van ongeveer 1,33 maal de gewenste biomassa aanbevolen. Deze extra 33 % komt overeen met het verschil tussen drooggedepte en niet-drooggedepte wormen (28).

44. Bij het begin van de opnamefase (dag 0 van de test) worden de testorganismen uit de acclimatiseringskamer verwijderd en steekproefsgewijs verdeeld over schalen (bijv. petrischalen) met daarin synthetisch water door aan iedere schaal groepen van twee wormen toe te voegen, totdat elke schaal tien wormen bevat. Elk van deze groepen wormen worden vervolgens steekproefsgewijs verdeeld naar afzonderlijke testvaten, bijv. met behulp van een zacht stalen tangetje. De testvaten worden vervolgens onder testomstandigheden geïncubeerd.

Voeding

45. Gezien het lage gehalte aan nutriënten van het kunstmatige sediment moet aan het sediment een voedselbron worden toegevoegd. Om de blootstelling van de testorganismen niet te onderschatten, bijv. door selectief niet-verontreinigd voedsel toe te dienen, moet het voedsel dat nodig is voor de voortplanting en groei van de testorganismen eenmaal aan het sediment worden toegevoegd vóór of tijdens de aanbrenging van de teststof (zie aanhangsel 5).

Sediment-waterverhouding

46. De aanbevolen sediment-waterverhouding is 1:4 (45). Deze verhouding wordt verondersteld geschikt te zijn om de juiste zuurstofconcentraties te handhaven en het ontstaan van ammoniak in het bovenstaande water te voorkomen. Het zuurstofgehalte in het bovenstaande water moet worden gehandhaafd op een verzadigingsniveau van ≥ 40 %. Het bovenstaande water van de testvaten moet voorzichtig worden belucht (bijv. 2-4 bellen per seconde) via een pasteurpipet dat ongeveer 2 cm boven het sedimentoppervlak is geplaatst, om perturbatie van het sediment zo veel mogelijk te beperken.

▼M6

Licht en temperatuur

47. De fotoperiode in de cultuur en de test duurt doorgaans 16 uur (1)(6). De lichtintensiteit in de testomgeving moet op een niveau van ongeveer 500-1 000 lux worden gehouden. De temperatuur moet gedurende de gehele test 20 ± 2 °C zijn.

Testconcentraties

48. Eén testconcentratie (zo laag mogelijk) wordt gebruikt voor de bepaling van de opnamekinetiek, maar een tweede (hogere) concentratie kan worden gebruikt (bijv. (46)). In dat geval worden monsters genomen en geanalyseerd wanneer ze de stationaire toestand hebben bereikt of na 28 d om de bij de lagere concentratie gemeten BAF te bevestigen (11). De hogere concentratie moet zo worden gekozen dat nadelige effecten kunnen worden uitgesloten (bijv. door ongeveer 1 % te kiezen van de laagste bekende concentratie met een chronisch effect, EC_x, op basis van relevante onderzoeken naar chronische toxiciteit). De lagere testconcentratie moet significant hoger zijn dan de detectiegrens in sediment- en biologische monsters voor de gebruikte analysemethode. Indien de effectconcentratie van de teststof dicht bij de analytische aantoonbaarheidsgrens ligt, verdient het aanbeveling om een radioactief gemerkte teststof met een hoge specifieke radioactiviteit te gebruiken.

Met teststof behandelde duplo's en controleduplo's

49. Het minimumaantal behandelde duplo's voor kinetische metingen moet drie per bemonsteringspunt zijn (11) gedurende de opname- en eliminatiefase. Aanvullende duplo's moeten worden gebruikt voor bijvoorbeeld facultatieve aanvullende bemonsteringsdagen. Voor de eliminatiefase wordt een overeenkomstig aantal duplo's bereid met niet-verrijkt sediment en bovenstaand water, zodat de behandelde wormen kunnen worden overgebracht van de behandelde vaten naar niet-behandelde vaten aan het einde van de opnamefase. Het totale aantal behandelde duplo's moet voldoende zijn voor zowel de opname- als de eliminatiefase.

50. In plaats daarvan kunnen de wormen die zijn geselecteerd voor bemonstering tijdens de eliminatiefase in één groot vat worden blootgesteld aan verrijkt sediment van dezelfde batch als die is gebruikt voor de opnamekinetiek. Aangetoond moet worden dat de testomstandigheden (bijv.sedimentdiepte, sediment-waterverhouding, densiteit, temperatuur, waterkwaliteit) vergelijkbaar zijn met de duplo's die zijn geselecteerd voor de opnamefase. Aan het einde van de opnamefase moeten water-, sediment- en wormmonsters uit dit vat worden genomen voor analyse en een voldoende aantal grote wormen die geen tekenen van recente fragmentatie vertonen, moeten voorzichtig worden verwijderd en overgebracht naar de duplovaten die voor de eliminatiefase zijn bereid (bijv. tien organismen per duplovat).

51. Indien geen ander oplosmiddel dan water wordt gebruikt, moeten ten minste 9 duplo's van een negatieve controle (ten minste 3 die zijn bemonsterd bij het begin, 3 aan het eind van de opnamefase en 3 aan het eind van de eliminatiefase) beschikbaar zijn voor biologische en achtergrondconcentratie-analyse. Indien een solubilisator wordt gebruikt om de teststof aan te brengen, moet een oplosmiddelcontrole worden uitgevoerd (3 duplo's moeten aan het begin worden bemonsterd, 3 aan het eind aan de opnamefase en 3 aan het eind van de eliminatiefase). In dat geval moeten ten minste 4 duplo's van een negatieve controle (geen oplosmiddel) beschikbaar zijn voor monstername aan het eind van de opnamefase. Deze duplo's kunnen biologisch worden vergeleken met de oplosmiddelcontrolegroep om informatie te verkrijgen over een mogelijk effect van het oplosmiddel op de testorganismen. Zie aanhangsel 3 voor nadere gegevens.

▼M6

Frequentie van de metingen van de waterkwaliteit

52. Tijdens de opname- en eliminatiefase moeten ten minste de volgende waterkwaliteitsparameters worden gemeten in het bovenstaande water:

temperatuur	in één vat van elk behandelingsniveau op elke bemonsteringsdag, en in één controlevat eenmaal per week en aan het begin en eind van de opname- en eliminatieperiode; de temperatuur in het omringende medium (omgevingslucht of waterbad) of in één representatief testvat kan ook worden gerapporteerd, bijv. als continumeting of met tussenpozen van een uur;
gehalte opgeloste zuurstof	in één vat van elk behandelingsniveau, en in één controlevat op elke bemonsteringsdag; uitgedrukt als mg/L en % verzadigingswaarde van lucht;
luchttoevoer	ten minste eenmaal per dag (werkdagen) controleren en indien nodig aanpassen;
pH	in één behandeld vat van elk behandelingsniveau op elke bemonsteringsdag, en in één controlevat eenmaal per week en aan het begin en eind van de opname- en eliminatieperiode;
totale hardheid van het water	ten minste in één behandeld vat en één controlevat aan het begin en eind van de opname- en eliminatieperiode, uitgedrukt als mg/l $CaCO_3$;
totaal gehalte ammoniak	ten minste in één behandeld vat en één controlevat aan het begin en eind van de opname- en eliminatieperiode; uitgedrukt als mg/l NH_4^+ of NH_3 of totaal ammoniak-N.

Bemonstering en analyse van wormen, sediment en water

Bemonsteringsschema

53. Voorbeelden van bemonsteringsschema's voor een opnamefase van 28 dagen en een eliminatiefase van 10 dagen zijn opgenomen in aanhangsel 3.

54. Het water en het sediment in de testkamers worden bemonsterd om de concentratie teststof vóór toevoeging van de wormen en tijdens zowel de opname- als de eliminatiefase te bepalen. Tijdens de test worden de concentraties van de teststof in de wormen, het sediment en het water bepaald om de verdeling van de teststof tussen de compartimenten van het teststof te volgen.

55. De wormen, het sediment en het water moeten ten minste zes maal worden bemonsterd tijdens zowel de opname- als de eliminatiefase.

56. Ga verder met monsternemingen, totdat een plateaufase (stationaire toestand) is vastgesteld (zie aanhangsel 1) of gedurende 28 dagen. Indien binnen 28 dagen geen plateaufase wordt bereikt, wordt er begonnen met de eliminatiefase. Wanneer met de eliminatiefase wordt begonnen, moeten de daarvoor gekozen wormen worden overgebracht naar duplokamers met daarin onbehandeld sediment en water (zie ook de punten 17 en 18).

Bemonstering en monsterbereiding

57. Verzamel watermonsters door een hoeveelheid water die voldoende is voor het meten van de hoeveelheid teststof in het monster te decanteren, overhevelen of pipetteren.

58. Het resterende bovenstaande water wordt zorgvuldig uit de testkamer(s) gedecanteerd of overgeheveld. Sedimentmonsters moeten voorzichtig worden genomen, waarbij de wormen zo min mogelijk worden verstoord.

▼M6

59. Verwijder op het moment van monstername alle wormen uit de testduplo, bijv. door het sediment te suspenderen met bovenstaand water en de inhoud van iedere duplo op een ondiepe schaal uit te spreiden, waarna de wormen met een zacht stalen tangetje kunnen worden opgepakt. Spoel ze snel af met water in een ondiepe glazen of stalen schaal. Verwijder het aanhangende water. Breng de wormen voorzichtig over naar een van tevoren gewogen bak en weeg ze. De wormen worden geëuthanaseerd door middel van bevriezing (bijv. ≤ – 18 °C). De aanwezigheid van en het aantal cocons en/of nakomelingen moeten worden gerapporteerd.

60. Over het algemeen moeten de wormen worden gewogen en geëuthanaseerd onmiddellijk na de monstername zonder een darmontlastingsfase om een conservatieve BAF te verkrijgen die ook betrekking heeft op verontreinigde darminhoud en om verlies van in het lichaam aanwezige residuen tijdens een darmontlastingsfase in alleen water te voorkomen (8). Van stoffen met een log K_{ow} van meer dan 5 wordt niet verwacht dat ze in significante mate worden verwijderd tijdens een darmontlastingsfase in alleen water, terwijl stoffen met een log K_{ow} van minder dan 4 in aanzienlijke hoeveelheden verloren kunnen gaan (47).

61. Tijdens de eliminatiefase ontlasten de wormen hun darmen in schoon sediment. Dit betekent dat metingen onmiddellijk vóór de eliminatiefase ook betrekking hebben op verontreinigde darminhoud, terwijl aangenomen wordt dat het grootste deel van de verontreinigde darminhoud na de initiële 4 tot 24 uur van de eliminatiefase wordt vervangen door schoon sediment (11)(47). De concentratie in de wormen van dit monster kunnen in dat geval worden beschouwd als de weefselconcentratie na ontlasting van de darm. Om rekening te houden met de verdunning van de teststofconcentratie door opname van niet-verontreinigd sediment tijdens de eliminatiefase, kan het gewicht van de darminhoud worden geschat op basis van de verhouding natgewicht/asgewicht van de worm of de verhouding drooggewicht/asgewicht van de worm.

62. Indien het doel van een specifiek onderzoek is om de biobeschikbaarheid en werkelijke residuen in het weefsel van testorganismen te meten, moet ten minste een deelsteekproef van behandelde dieren (bijv. uit drie aanvullende duplovaten), bij voorkeur bemonsterd tijdens de stationaire toestand, worden gewogen, in schoon water worden gehouden gedurende 6 uur om de wormen hun darmen te laten ontlasten (47) en vóór analyse opnieuw gewogen. Gegevens met betrekking tot het wormgewicht en de lichaamsconcentratie van deze deelsteekproef kunnen vervolgens worden vergeleken met waarden die zijn verkregen met wormen die hun darmen niet hebben ontlast. De wormen die zijn gekozen voor de eliminatiemeting mogen niet aan een darmontlastingsfase worden onderworpen alvorens ze naar schoon sediment worden overgebracht, om de dieren aan zo min mogelijk stress bloot te stellen.

63. De water-, sediment- en wormmonsters moeten bij voorkeur onmiddellijk na verwijdering (d.w.z. binnen 1-2 dagen) worden geanalyseerd om ontbinding of andere verliezen te voorkomen en de opname- en eliminatiesnelheden moeten bij benadering worden berekend naarmate de test vordert. Indien de analyse meteen wordt uitgevoerd, wordt ook vermeden dat te veel tijd voorbijgaat alvorens het bereiken van het plateau wordt geconstateerd.

64. Als de monsters niet onmiddellijk worden geanalyseerd, moeten ze onder passende omstandigheden worden bewaard. Verzamel vóór aanvang van het onderzoek informatie over de stabiliteit en juiste opslagomstandigheden voor de betreffende teststof (bijv. opslagduur en -temperatuur, extractieprocedures, enz.). Indien dergelijke informatie niet beschikbaar is, kunnen met teststof verrijkte monsters aan een controletest worden onderworpen om de opslagstabiliteit te bepalen.

Kwaliteit van de analysemethode

65. Aangezien de nauwkeurigheid, de precisie en de gevoeligheid van de analysemethode ten aanzien van de teststof bepalend zijn voor de kwaliteit van de hele procedure, moet experimenteel worden gecontroleerd of de precisie en de reproduceerbaarheid van de chemische analyse alsmede de recovery

▼M6

van de teststof in de water-, sediment- en wormmonsters bevredigend zijn voor de gekozen methode. Controleer ook of de teststof niet detecteerbaar is in de controlekamers in hogere concentraties dan de achtergrondconcentratie. Corrigeer zo nodig de waarden van C_w, C_s en C_a voor de recovery- en achtergrondwaarden van controles. Hanteer alle monsters tijdens de gehele test zodanig dat verontreiniging en verlies (bijv. als gevolg van adsorptie van de teststof aan het bemonsteringsapparaat) tot een minimum worden beperkt.

66. De totale recovery en de teststofrecovery in wormen, sediment, water en, indien gebruikt, in afscheiders met absorptiemiddelen om verdampte teststof op te vangen, moeten worden geregistreerd en gerapporteerd.

67. Aangezien het gebruik van radioactief gemerkte stoffen wordt aanbevolen, is het mogelijk om te analyseren op totale radioactiviteit (d.w.z. de oorspronkelijke teststof en afbraakproducten). Voor zover dit haalbaar is in de analyse, kan de kwantificering van de oorspronkelijke teststof en de afbraakproducten in stationaire toestand of aan het eind van de opnamefase echter ook belangrijke informatie opleveren. Als het de bedoeling is om dergelijke metingen te verrichten, moeten de monsters vervolgens worden onderworpen aan geschikte extractieprocedures, zodat de oorspronkelijke stof apart kan worden gekwantificeerd. Ingeval een gedetecteerd omzettingsproduct een significant percentage (bijv. > 10 %) vertegenwoordigt van de radioactief die is gemeten in de testorganismen in stationaire toestand of aan het eind van de opnamefase, wordt aanbevolen dergelijke afbraakproducten te identificeren (5).

68. Vanwege de geringe individuele biomassa is het vaak niet mogelijk om de teststofconcentratie in elke individuele worm te bepalen, tenzij *Branchiura sowerbyi* (40-50 mg natgewicht per worm) als testsoort wordt gebruikt (11). Daarom is het toegestaan om bemonsterde individuele wormen uit een bepaald testvat in in een groep te bundelen, hoewel dit een beperking vormt voor de statistische procedures die op de gegevens toegepast kunnen worden. Indien een specifieke statistische procedure en statische kracht belangrijke overwegingen zijn, moet de test een toereikend aantal proefdieren en/of duplotestkamers omvatten om het gewenste bundelen van wormen in groepen en de gewenste statische procedure en kracht mogelijk te maken.

69. Het verdient aanbeveling om de BAF uit te drukken als functie van het totale natgewicht, van het totale drooggewicht en, indien nodig (bijv. voor zeer lipofiele stoffen), als functie van het vetgehalte en TOC van het sediment. Voor de bepaling van het vetgehalte moeten geschikte methoden worden gebruikt (48)(49). De extractietechniek met chloroform/methanol (50) kan als standaardmethode worden aanbevolen (48). Om het gebruik van gechloreerde oplosmiddelen te vermijden, kan echter een aangepaste versie van de methode van Bligh en Dyer (50), als beschreven in (51), worden gebruikt. Aangezien de verschillende methoden verschillende resultaten opleveren (48), is het van belang dat bijzonderheden over de gebruikte methode worden verstrekt. De meting van het vetgehalte wordt, indien mogelijk, d.w.z. als voldoende wormweefsel voorhanden is, uitgevoerd op hetzelfde monster of extract als voor de analyse van de teststof wordt gebruikt — de vetten moeten immers meestal toch worden verwijderd alvorens het extract door middel van chromatografie kan worden geanalyseerd (5). Om praktische redenen wordt echter aanbevolen om geacclimatiseerde controledieren minimaal bij de start te gebruiken of, bij voorkeur, aan het einde van de opnamefase om het vetgehalte te meten, bijv. in drie monsters.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Bewerking van de resultaten

70. De opnamecurve van de teststof wordt verkregen door de teststofconcentratie in/op de wormen tijdens de opnamefase uit te zetten tegen de tijd in een

▼M6

lineair coördinatenstelsel. Indien de curve een plateau heeft bereikt, wordt de BAF_{ss} in stationaire toestand gemeten:

$$\frac{C_a \text{ in stationaire toestand of op dag 28 (gemiddelde)}}{C_s \text{ in stationaire toestand of op dag 28 (gemiddelde)}}$$

71. De kinetische bioaccumulatiefactor (BAFK) wordt bepaald als de verhouding ks/ke. De eliminatiesnelheidsconstante (ke) wordt gewoonlijk bepaald op basis van de eliminatiecurve (d.w.z. de uitgezette concentratie van de teststof in de wormen tijdens de eliminatiefase). De opnamesnelheidsconstante (ks) wordt vervolgens berekend aan de hand van de opnamecurvekinetiek. Het verdient de voorkeur BAFK en de snelheidsconstanten ks en ke te berekenen met behulp van een gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechniek (zie aanhangsel 2). Als de eliminatie duidelijk niet van de eerste orde is, moeten complexere modellen worden toegepast (25)(27)(52).

72. De biota-sedimentaccumulatiefactor (BSAF) wordt bepaald door de BAFK te normaliseren voor het vetgehalte van de wormen en het totale koolstofgehalte in het sediment.

Interpretatie van resultaten

73. De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten concentraties van de teststofconcentraties in de buurt liggen van de detectiegrens van de gebruikte analysemethode.

74. Bioaccumulatiegegevens van goede kwaliteit resulteren in scherp afgetekende opname- en eliminatiecurven. De betrouwbaarheidsgrenzen voor de BAF-waarden van onderzoeken met een goede testopzet mogen niet hoger zijn dan 25 % (5).

Testverslag

75. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof

— fysieke aard en fysisch-chemische eigenschappen, bijv. log K_{ow}, oplosbaarheid in water;

— chemische identificatiegegevens, bron van de teststof, identiteit en concentratie van eventueel gebruikte oplosmiddelen;

— indien radioactief gemerkt, de precieze positie van de gemerkte atomen, de specifieke radioactiviteit en de procentuele radioactiviteit die in verband wordt gebracht met onzuiverheden.

Diersoort

— wetenschappelijke naam, stam, oorsprong, eventuele voorafgaande behandeling, acclimatisatie, leeftijd, grootte-interval enz.

Testomstandigheden

— gebruikte testprocedure (bijv. statisch, semistatisch of doorstroom);

— aard en kenmerken van de gebruikte verlichting en de fotoperiode(s);

— testopzet (bijv. aantal, materiaal en grootte van de testkamers, watervolume, sedimentmassa en -volume, verversingssnelheid van het water (voor doorstroom- of semistatische procedures), gebruikte beluchting vóór en tijdens de test, aantal duplo's, aantal wormen per duplo, aantal testconcentraties, duur van de opname- en eliminatiefasen, frequentie van de bemonstering);

▼M6

— methode voor het bereiden en aanbrengen van de teststof en de redenen voor het kiezen van een specifieke methode;

— de nominale testconcentraties;

— bron van de bestanddelen van de kunstmatige grond of — bij gebruik van natuurlijke media — oorsprong van de grond, beschrijving van eventuele voorbehandeling, resultaten van eventuele proeven om aan te tonen dat de proefdieren kunnen leven en/of zich kunnen voortplanten in het gebruikte medium, sedimentkenmerken (pH en ammoniakgehalte van het poriënwater (natuurlijke sedimenten), totale gehalte aan organische koolstof (TOC), deeltjesgrootteverdeling (percentage zand, silt en klei), procentuele watergehalte en eventuele andere verrichte metingen) alsmede waterkenmerken (pH, hardheid, geleidend vermogen, temperatuur, gehalte opgeloste zuurstof, chloorresiduen (indien gemeten) en eventuele andere verrichte metingen);

— het nominale en gemeten drooggewicht in % van het natgewicht (of de verhouding tussen drooggewicht en natgewicht) van het kunstmatige sediment; het gemeten drooggewicht in % van het natgewicht (of de verhouding tussen drooggewicht en natgewicht) van veldsedimenten;

— waterkwaliteit binnen de testkamers, gekarakteriseerd aan de hand van de temperatuur, pH, totale hardheid en concentratie opgeloste koolstof;

— gedetailleerde informatie over de verwerking van water-, sediment- en wormmonsters, met inbegrip van details van de bereiding, opslag, verrijkingsprocedures, extractie en analyseprocedures (en -precisie) voor de teststof en het vetgehalte en de recovery van de teststof.

Resultaten

— mortaliteit van de controlewormen en de wormen in elke testkamer alsmede eventueel waargenomen subletale effecten met inbegrip van abnormaal gedrag (bijv. vermijding van het sediment, aanwezigheid of afwezigheid van fecaal materiaal, uitblijven van voortplanting);

— het gemeten drooggewicht in % van het natgewicht (of de verhouding tussen drooggewicht en natgewicht) van het sediment en de testorganismen (nuttig voor normalisatie);

— het vetgehalte van de wormen;

— grafieken van de opname- en eliminatiekinetiek van de teststof in de wormen en van de tijd tot de stationaire toestand;

— C_a, C_s en C_w (met standaardafwijking en bereik, indien van toepassing) voor alle bemonsteringstijdstippen (C_a uitgedrukt in g kg^{-1} nat- en drooggewicht van het hele lichaam, C_s uitgedrukt in g kg^{-1} nat- en drooggewicht van het sediment en C_w in mg l^{-1}). Indien een biota-sedimentaccumulatiefactor (BSAF; zie aanhangsel 1 voor een definitie) nodig is (bijv. om de resultaten van twee of meer tests die met dieren met een ander vetgehalte zijn uitgevoerd, te kunnen vergelijken), moet C_a aanvullend worden uitgedrukt in g kg^{-1} vetgehalte van het organisme en moet C_s worden uitgedrukt in g kg^{-1} organische koolstof (OC) van het sediment;

— BAF (uitgedrukt in kg vochtig sediment·kg^{-1} natgewicht worm), de sedimentopnamesnelheidsconstante k_s (uitgedrukt in g vochtig sediment· kg^{-1} van natgewicht worm d^{-1}) en de eliminatiesnelheidsconstante k_e (uitgedrukt in d^{-1}); BSAF (uitgedrukt in kg OC in het sediment kg^{-1} vetgehalte van de worm) kan aanvullend worden gerapporteerd;

▼**M6**

— niet-geëlimineerde residuen (NER) aan het eind van de eliminatiefase;

— indien gemeten: percentages van de oorspronkelijke stof, afbraakproducten en gebonden residuen (d.w.z. het percentage van de teststof dat niet geëxtraheerd kan worden met normale extractiemethoden) die in de proefdieren zijn aangetoond;

— voor statistische analysen van de gegevens gebruikte methoden.

Evaluatie van de resultaten

— overeenstemming van de resultaten met de in punt 21 vermelde geldigheidscriteria;

— onverwachte of ongewone resultaten, bijv. onvolledige eliminatie van de teststof uit de proefdieren; in dergelijke gevallen kunnen de resultaten van een eventueel inleidend onderzoek nuttige informatie opleveren.

▼M6

Aanhangsel 1

Definities en eenheden

Bioaccumulatie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme ten opzichte van de concentratie van de teststof in het omringende medium. Bioaccumulatie is het gevolg van zowel bioconcentratie- als biomagnificatieprocessen (zie hieronder).

De **bioaccumulatiefactor** (BAF) op enig moment van de opnamefase van deze bioaccumulatietest, is de verhouding tussen de concentratie van de teststof in of op het testorganisme (C_a in g kg^{-1} natgewicht of drooggewicht) en de concentratie van die stof in het omringende medium (C_s in kg^{-1} natgewicht of drooggewicht van sediment). Om te verwijzen naar de eenheden van C_a en C_s heeft de BAF de eenheden van kg sediment kg^{-1} worm (15).

De **bioaccumulatiefactor in stationaire toestand** (BAF_{ss}) is de BAF in stationaire toestand en ondergaat gedurende langere tijd geen significante wijzigingen als de concentratie van de teststof in het omringende medium (C_s in g kg^{-1} natgewicht of drooggewicht van sediment) constant blijft tijdens deze periode.

Bioaccumulatiefactoren die rechtstreeks op basis van de verhouding tussen de sedimentopnamesnelheidsconstante en de eliminatiesnelheidsconstanten (respectievelijk k_s en k_e, zie hieronder) worden berekend, worden aangeduid met de term kinetische bioaccumulatiefactor (BAF_K).

Bioconcentratie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme ten gevolge van uitsluitend de opname via het lichaamsoppervlak ten opzichte van de concentratie van de teststof in het omringende medium.

Biomagnificatie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme ten gevolge van voornamelijk de opname van verontreinigde voeding of prooi ten opzichte van de concentratie van de teststof in de voeding of prooi. Biomagnificatie kan leiden tot een overdracht of accumulatie van de teststof binnen voedselketens.

De **biota-grondaccumulatiefactor** (BSAF) is de verhouding tussen de voor vetgehalte genormaliseerde concentratie van de teststof in of op het testorganisme en de voor organische koolstof genormaliseerde concentratie van de teststof in het sediment in stationaire toestand. C_a wordt uitgedrukt in g kg^{-1} vetgehalte van het organisme en C_s in g kg^{-1} gehalte organische stof in het sediment.

Bovenstaand water is het water dat in het testvat op het sediment ligt.

De **conditioneringsperiode** wordt gebruikt om het microbiële deel van het sediment te stabiliseren en bijv. ammoniak afkomstig van sedimentbestanddelen te verwijderen; deze conditionering vindt plaats voordat het sediment wordt verrijkt met de teststof. Gewoonlijk wordt het bovenstaande water na de conditionering weggegooid.

De **eliminatie** van een teststof is het verlies van die stof uit het weefsel van het testorganisme door actieve of passieve processen die optreden ongeacht of de teststof in het omringende medium aanwezig is.

De **eliminatiefase** is de periode die begint op het moment waarop de testorganismen van een medium dat de teststof bevat worden overgebracht naar een medium dat die stof niet bevat, en gedurende welke de eliminatie (of het nettoverlies) van de teststof uit het testorganisme wordt bestudeerd.

▼M6

De **equilibratieperiode** wordt gebruikt om de teststof zich over de vaste fase, het poriënwater en het bovenstaande water te laten verspreiden; deze equilibratie vindt plaats nadat het sediment met de teststof is verrijkt en voordat de testorganismen worden toegevoegd.

De **eliminatiesnelheidsconstante** (k_e) is de numerieke waarde die de snelheid aangeeft waarmee de concentratie van de teststof in of op het testorganisme afneemt na overbrenging van de testorganismen uit een medium dat de teststof bevat naar een medium dat de teststof niet bevat; k_e wordt uitgedrukt in d^{-1}.

Kunstmatig sediment (ook wel bereid, gereconstitueerd of synthetisch sediment genoemd) is een mengsel van materialen waarmee de fysische bestanddelen van natuurlijk sediment worden nagebootst.

De **octanol-waterverdelingscoëfficiënt** (K_{ow}) is de verhouding tussen de oplosbaarheid van een stof in n-octanol en in water bij evenwicht; deze verhouding wordt soms ook uitgedrukt als P_{ow}. Het logaritme van K_{ow} (log K_{ow}) wordt gebruikt als een indicatie van het bioaccumulatiepotentieel van een stof door in het water levende organismen.

De **opname- of blootstellingsfase** is de periode gedurende welke de testorganismen aan de teststof worden blootgesteld.

De **organische koolstof-waterverdelingscoëfficiënt** (K_{oc}) is de verhouding tussen de concentratie van een stof in of op de fractie organische koolstof van een sediment en de concentratie van die stof in water in een toestand van evenwicht.

Een **plateau** of **stationaire toestand** wordt gedefinieerd als het evenwicht tussen de opname- en eliminatieprocessen die gelijktijdig optreden tijdens de blootstellingsfase. De stationaire toestand wordt bereikt wanneer in een grafiek van de BAF op ieder bemonsteringspunt als functie van de tijd de curve evenwijdig gaat lopen met de tijdas en drie opeenvolgende bepalingen van BAF op monsters die met tussenpozen van ten minste twee dagen worden genomen, niet meer dan 20 % van elkaar verschillen en er bovendien geen statistisch significant verschil bestaat tussen de waarden verkregen op de drie bemonsteringstijdstippen. Voor teststoffen die langzaam worden opgenomen, verdient het de voorkeur om intervallen van zeven dagen te gebruiken (5).

Poriënwater, ook wel interstitieel water genoemd, is het water in de ruimten tussen de sediment- of bodemdeeltjes.

De **sedimentopnamesnelheidsconstante** (k_s) is de numerieke waarde die aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in of op de testorganismen toeneemt ten gevolge van de opname uit de sedimentfase. k_s wordt uitgedrukt in g sediment kg^{-1} van worm d^{-1}.

Verrijkt sediment is sediment waaraan teststof is toegevoegd;

▼M6

Aanhangsel 2

Berekening van opname- en eliminatieparameters

Het belangrijkste eindpunt van een bioaccumulatietest is de bioaccumulatiefactor, BAF. De gemeten BAF kan worden berekend door de concentratie van de teststof in het testorganisme, C_a, te delen door de concentratie van de teststof in het sediment, C_s, in stationaire toestand. Indien de stationaire toestand tijdens de opnamefase niet wordt bereikt, wordt de BAF op dezelfde manier berekend voor dag 28. Er dient echter opgetekend te worden of de BAF al dan niet gebaseerd is op concentraties in stationaire toestand.

De manier waarop de kinetische bioaccumulatiefactor (BAF_K), de grondopnamesnelheidsconstante (k_s) en de eliminatiesnelheidsconstante (k_e) bij voorkeur verkregen moeten worden, is om gebruik te maken van gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechnieken. Op basis van de tijdreeks van gemiddelde accumulatiefactoren (C_a, gemiddelde waarden van elke bemonsteringsdag/C_s, gemiddelde waarden van elke bemonsteringsdag = AF) van de opnamefase op basis van het natgewicht van wormen en sediment alsmede de modelvergelijking

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[vergelijking 1]}$$

waarbij AF(t) de verhouding is tussen de concentratie van teststof in wormen en de concentratie van de teststof in het sediment op een willekeurig moment (t) van de opnamefase, berekenen deze computerprogramma's waarden voor BAF_K, k_s en k_e.

Indien de stationaire toestand wordt bereikt tijdens de opnamefase (d.w.z. $t = \infty$), kan vergelijking 1 worden gereduceerd tot

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[vergelijking 2]}$$

waarbij

k_s = opnamesnelheidsconstante in weefsel [g sediment kg^{-1} van worm d^{-1}];

k_e = eliminatiesnelheidsconstante [d^{-1}];

Hierbij benadert $k_s/k_e \times C_s$ de concentratie van de teststof in het wormweefsel in stationaire toestand ($C_{a,ss}$).

De biota-sedimentaccumulatiefactor (BSAF) moet als volgt worden berekend:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

waarbij foc de fractie organische koolstof in het sediment op basis van drooggewicht is en flip de fractie wormvet op basis van hetzij drooggewicht hetzij natgewicht.

Aan de hand van een reeks tegen de tijd uitgezette concentratiewaarden kan de eliminatiekinetiek worden gemodelleerd door gebruik te maken van de volgende modelvergelijking en een gecomputeriseerde, op berekening gebaseerde niet-lineaire parameterschattingsmethode.

Het gemiddelde gemeten in het lichaam aanwezige residu aan het einde van de opnamefase wordt aanbevolen als het standaardbeginpunt. De waarde die is gemodelleerd/geschat op basis van de opnamefase moet alleen worden gebruikt indien de gemeten waarde bijvoorbeeld significant afwijkt van het gemodelleerde in het lichaam aanwezige residu. Zie tevens punt 50 voor alternatieve voorafgaande blootstelling van wormen die voor de eliminatiefase zijn geselecteerd; bij deze aanpak worden monsters van deze vooraf blootgestelde wormen op dag 0 van de eliminatiefase geacht een realistisch residugehalte in het lichaam te hebben om de eliminatiekinetiek mee te beginnen.

▼M6

Als de tegen de tijd uitgezette gegevens wijzen op een constante exponentiële afname van de concentratie van de teststof in de dieren, kan een een-compartimentmodel (vergelijking [4]) worden gebruikt om het tijdsverloop van de eliminatie te beschrijven.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[vergelijking 3]}$$

Eliminatieprocessen lijken soms uit twee fasen te bestaan in de zin dat ze tijdens de eerste fasen een snelle afname van C_a vertonen, waarna dit verandert in een langzamer verlies van teststoffen in de latere fasen van de eliminatie (8)(19)(25). De twee fasen kunnen worden verklaard aan de hand van de aanname dat er twee verschillende compartimenten in het organisme zijn, waaruit de teststof met verschillende snelheden verloren gaat. In deze gevallen moet specifieke literatuur worden bestudeerd (15)(16)(17)(25).

Een eliminatie in twee compartimenten wordt beschreven door, bijvoorbeeld, de volgende vergelijking (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[vergelijking 4]}$$

A en B staan voor de grootte van de compartimenten (in percentage van het totale residu in het weefsel) waarbij A het compartiment is met een snel verlies van de teststof en B het compartiment met een langzaam verlies van de stof. De som van A en B is gelijk aan 100 % van het gehele volume van het dierencompartiment in stationaire toestand. k_a en k_b staan voor de overeenkomstige eliminatieconstanten [d^{-1}]. Als het tweecompartimentenmodel wordt toegepast voor regressieanalyse van de depuratiegegevens, kan de opnamesnelheidsconstante k_s als volgt worden bepaald (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[vergelijking 5]}$$

Deze modelvergelijkingen moeten echter met voorzichtigheid worden gebruikt, in het bijzonder indien tijdens de test de biobeschikbaarheid van de teststof verandert (42).

Als alternatief voor de bovenstaande modelvergelijkingen kan de kinetiek (k_s en k_e) ook worden berekend in één uitvoering van de test door het eersteordekinetiekmodel op alle gegevens van zowel de opname- als de eliminatiefase samen toe te passen. Voor een beschrijving van een methode die een dergelijke gecombineerde berekening van opname- en eliminatiesnelheidsconstanten mogelijk maakt, kunnen (55), (56) en (57) worden geraadpleegd.

De niet-geëlimineerde residuen (NER) moeten worden berekend als een secundair eindpunt door de verhouding tussen de gemiddelde concentratie in de wormen (C_a) op dag 10 van de eliminatiefase en de gemiddelde concentratie in de wormen (C_a) in stationaire toestand (dag 28 van de opnamefase) te vermenigvuldigen met 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ bij einde eliminatie } (\text{gemiddeld}) \times 100}{C_a \text{ in stationaire toestand } (\text{gemiddeld})}}$$

▼M6

Aanhangsel 3

Voorbeeld van een bemonsteringsschema voor een bioaccumulatietest van 28 dagen

a) **Opnamefase (met inbegrip van een equilibratiefase van 4 dagen)**

Dag	Activiteiten
– 6	Turfsuspensie voor sediment bereiden; conditionering van de suspensie gedurende 48 uur.
– 4	Sediment of sedimentfractie verrijken; alle bestanddelen van het sediment mengen; sedimentmonsters van behandeld sediment en oplosmiddelcontrolesediment verwijderen voor de bepaling van de teststofconcentratie; bovenstaand water toevoegen; incubatie onder testomstandigheden (equilibratiefase).
– 3/– 2	De testorganismen verwijderen uit de cultuur voor acclimatisering.
0	Waterkwaliteit meten (zie punt 52); duplo's verwijderen voor het nemen van water- en sedimentmonsters voor de bepaling van de teststofconcentratie; steekproefsgewijze verdeling van de wormen over de testkamers; voldoende deelsteekproeven van wormen apart houden voor de bepaling van de analytische achtergrondwaarden; luchttoevoer regelen, indien een gesloten testsysteem wordt gebruikt.
1	Duplo's verwijderen voor monstername; regelen van luchttoevoer, wormgedrag, waterkwaliteit (zie punt 56); water-, sediment- en wormmonsters nemen voor de bepaling van de teststofconcentratie.
2	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren.
3	Zelfde als dag 1.
4 - 6	Zelfde als dag 2.
7	Zelfde als dag 1; verdampt water zo nodig aanvullen.
8 - 13	Zelfde als dag 2.
14	Zelfde als dag 1; verdampt water zo nodig aanvullen.
15 - 20	Zelfde als dag 2.
21	Zelfde als dag 1; verdampt water zo nodig aanvullen.
22 - 27	Zelfde als dag 2.
28	Zelfde als dag 1; waterkwaliteit meten (zie punt 52); einde van opnamefase; voldoende deelsteekproeven van wormen apart houden voor de bepaling van de analytische achtergrondwaarden, nat- en drooggewicht en vetgehalte; wormen overbrengen van resterende blootgestelde duplo's naar vaten met daarin schoon sediment voor de eliminatiefase (geen ontlasting van de darm); water-, sediment- en wormmonsters nemen uit de oplosmiddelcontroles; bemonstering van afscheidingsoplossingen, indien geïnstalleerd.
	Bij de planning van activiteiten die aan de blootstelling voorafgaan (equilibratiefase), moet rekening worden gehouden met de eigenschappen van de teststof. Indien nodig, conditionering van het bereide sediment onder bovenstaand water bij 20 ± 2 °C gedurende 7 dagen; in dit geval moet het sediment eerder worden bereid!
	De voor dag 2 beschreven activiteiten moeten dagelijks worden uitgevoerd (althans op werkdagen).

▼**M6**

b) **Eliminatiefase**

Dag	Activiteiten
– 6	Turfsuspensie voor sediment bereiden; conditionering van de suspensie gedurende 48 uur.
– 4	Alle bestanddelen van het sediment mengen; sedimentmonsters van behandeld sediment en oplosmiddel-controlesediment verwijderen voor de bepaling van de teststofconcentratie; bovenstaand water toevoegen; incubatie onder testomstandigheden.
0 (dag 28 van de op-namefase)	Waterkwaliteit meten (zie punt 52); wormen overbrengen van resterende blootgestelde duplo's naar vaten met daarin schoon sediment; na **4 — 6 uur** duplo's verwijderen voor het nemen van water-, sediment- en wormmonsters voor de bepaling van de teststofconcentratie; steekproefsgewijze verdeling van de wormen over de testkamers;
1	Duplo's verwijderen voor monstername; regelen van luchttoevoer, wormgedrag, waterkwaliteit (zie punt 52); water-, sediment- en wormmonsters nemen voor de bepaling van de teststofconcentratie.
2	Luchttoevoer regelen, wormgedrag en temperatuur registreren.
3	Zelfde als dag 1.
4	Zelfde als dag 2.
5	Zelfde als dag 1.
6	Zelfde als dag 2.
7	Zelfde als dag 1; verdampt water zo nodig aanvullen.
8 - 9	Zelfde als dag 2.
10	Zelfde als dag 1; einde van eliminatiefase; waterkwaliteit meten (zie punt 52); nemen van water-, sedi-ment- en wormmonsters van de oplosmiddelcontroles; bemonstering van afscheidingsoplossingen, indien geïnstalleerd.
	Het sediment wordt voor aanvang van de eliminatiefase op dezelfde manier voorbereid als voor de opnamefase.
	De voor dag 2 beschreven activiteiten moeten dagelijks worden uitgevoerd (althans op werkdagen).

▼**M6**

Aanhangsel 4

Enkele fysisch-chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater

BESTANDDEEL	CONCENTRATIES
Deeltjes	< 20 mg/l
Totale hoeveelheid organische koolstof	< 2µg/l
Niet-geïoniseerd ammonium	< 1 µg/l
Chloorresiduen	< 10 µg/l
Totale hoeveelheid organofosfaat-bestrijdingsmiddelen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organochloor-bestrijdingsmiddelen plus polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totale hoeveelheid organisch chloor	< 25 ng/l

SAMENSTELLING VAN HET AANBEVOLEN SYNTHETISCH WATER

a) Calciumchlorideoplossing

Los 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

b) Magnesiumsulfaatoplossing

Los 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

c) Natriumbicarbonaatoplossing

Los 2,59 g $NaHCO_3$ op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

d) Kaliumchlorideoplossing

Los 0,23 g KCl op in gedeïoniseerd water; vul aan met gedeïoniseerd water tot 1 l

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het geleidend vermogen van het gedestilleerde of gedeïoniseerde water mag niet groter zijn dan 10 µS cm^{-1}.

25 ml van elk van de oplossingen (a) tot en met (d) wordt gemengd en het totale volume wordt met gedeïoniseerd water aangevuld tot 1 l. Het totaal van de calcium- en magnesiumionen in deze oplossing is 2,5 mmol/l.

De verhouding van Ca-ionen:Mg-ionen is 4:1 en die van Na-ionen:K-ionen 10:1. Het zuurbindend vermogen $K_{S4.3}$ van deze oplossing is 0,8 mmol/l.

Belucht het oplossingswater tot het is verzadigd met zuurstof, en bewaar het oplossingswater daarna zonder verdere beluchting gedurende ongeveer twee dagen tot gebruik.

Het oplossingswater moet een pH-waarde tussen 6 en 9 hebben.

▼M6

Aanhangsel 5

Kunstmatig sediment — aanbevelingen voor de bereiding en opslag

In afwijking van de vereisten in testmethode C.8 (40) is het aanbevolen turfgehalte van het kunstmatige sediment 2 % in plaats van 10 % van het drooggewicht, overeenkomstig het lage tot matige organische gehalte van natuurlijke sedimenten (58).

Percentage van droge bestanddelen van het kunstmatige sediment:

Bestanddeel	Kenmerken	% van droog sediment
Turf	Veenmosturf, mate van decompositie: „medium", aan de lucht gedroogd, geen zichtbare plantenresten, fijngemalen (deeltjesgrootte ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kwartszand	Korrelgrootte: ≤ 2 mm, maar > 50 % van de deeltjes moet binnen het bereik 50-200 μm liggen	76
Kaolienklei	Met ≥ 30 % kaoliniet	22 ± 1
Voedselbron	*Folia urticae*, bladeren van *Urtica sp.* (grote brandnetel) in poedervorm, fijngemalen (deeltjesgrootte ≤ 0,5 mm) of een mengsel van bladeren van *Urtica sp.* in poedervorm met alfacellulose (1: 1); in overeenstemming met farmaceutische normen, voor menselijke consumptie; naast droog sediment	0,4 - 0,5 %
Calciumcarbonaat	$CaCO_3$, verpulverd, chemisch zuiver, naast droog sediment	0,05 - 1
Gedeïoniseerd water	Geleidend vermogen ≤ 10 μS/cm, naast droog sediment	30 - 50

Als verhoogde ammoniakconcentraties worden verwacht, bijv. als bekend is dat de teststof de nitrificatie remt, kan het nuttig zijn om 50 % van het stikstofrijke urtica-poeder te vervangen door cellulose (bijv., α-cellulosepoeder, chemisch zuiver, deeltjesgrootte ≤ 0,5 mm).

Voorbereiding

De turf wordt aan de lucht gedroogd en gemalen tot een fijn poeder (deeltjesgrootte ≤ 0,5 mm, geen zichtbare plantenresten). Een suspensie van de vereiste hoeveelheid turfpoeder wordt bereid door een deel van het gedeïoniseerde water te gebruiken dat moet worden toegevoegd aan het droge sediment (een watervolume van 11,5 × drooggewicht van turf is bruikbaar gebleken om een turfsuspensie (8) te maken die geroerd kan worden) met behulp van een homogeniseerapparaat met een hoge capaciteit.

De pH van deze suspensie wordt met $CaCO_3$ aangepast tot 5,5 ± 0,5. De suspensie wordt ten minste twee dagen lang onder zachtjes roeren bij 20 ± 2 °C geconditioneerd om de pH te stabiliseren en een stabiele microbiële component te verkrijgen. De pH wordt nogmaals gemeten en zo nodig met $CaCO_3$ tot 6,0 ± 0,5 aangepast. Vervolgens wordt de gehele oplossing gemengd met de andere droge bestanddelen, rekening houdend met een eventueel voor verrijking gebruikt deel. Het resterende gedeïoniseerde water wordt toegevoegd om een homogeen sediment te verkrijgen. De pH wordt nogmaals gemeten en zo nodig met $CaCO_3$ tot 6,5 - 7,5 aangepast. Als een verhoogde ammoniakontwikkeling wordt verwacht, kan het echter nuttig zijn de pH van het sediment onder 7 (bijv. tussen 6,0 en 6,5) te houden. Er worden monsters van het sediment genomen om het drooggewicht en het gehalte aan organische koolstof te bepalen. Als een verhoogde ammoniakontwikkeling wordt verwacht, kan het kunstmatige sediment zeven dagen worden geconditioneerd onder dezelfde omstandigheden die ook in de test zullen heersen (bijv. sediment-waterverhouding 1: 4, dikte van de sedimentlaag als in de testvaten), voordat het wordt verrijkt met de teststof, d.w.z. het moet worden overgoten met water, dat moet worden belucht. Aan het eind van de conditioneringsperiode moet het bovenstaande water worden verwijderd en weggegooid. Er worden monsters van het sediment genomen om het drooggewicht en het gehalte aan organische koolstof te bepalen (bijv. drie monsters).

▼M6

Daarna wordt het verrijkte kwartszand gemengd met het sediment voor elk behandelingsniveau, wordt het sediment over de duplotestvaten verdeeld en overgoten met het testwater (bv een sediment-waterverhouding van 1: 4, dikte van de sedimentlaag als in de testvaten). De vaten worden daarna geïncubeerd onder dezelfde omstandigheden die ook in de test heersen. Hier begint de equilibratieperiode. Het bovenstaande water moet worden belucht.

De gekozen voedingsbron moet worden toegevoegd vóór of tijdens de verrijking van het sediment met de teststof. Het voedsel kan in eerste instantie door de turfsuspensie worden gemengd (zie hierboven). Overmatige achteruitgang van de voedselbron vóór de toevoeging van de testorganismen — bijv. in geval van een lange equilibratieperiode — kan echter worden voorkomen door de tijdsperiode tussen de toevoeging van het voedsel en het begin van de blootstelling zo kort mogelijk te houden. Om te waarborgen dat het voedsel voldoende in contact komt met de teststof, moet de voedselbron uiterlijk op de dag waarop het sediment wordt verrijkt met de teststof, door het sediment worden gemengd. Hierop kunnen uitzonderingen worden gemaakt in gevallen waarin de duur van de equilibratieperiode leidt tot overmatige microbiële afbraak van het voedsel, voordat de testorganismen worden toegevoegd. Er worden monsters van het sediment genomen om het drooggewicht en het gehalte aan organische koolstof te bepalen (bijv. drie monsters van verrijkt sediment of controlesediment).

Het drooggewicht van de bestanddelen (turf, zand, kaolien) moet worden gerapporteerd in g en in procenten van het totale drooggewicht.

Het watervolume dat wordt toegevoegd aan de droge bestanddelen tijdens de bereiding van het sediment moet ook worden gerapporteerd in procenten van het totale drooggewicht (bijv. 100 % drooggewicht + 46 % water betekent 1 000 g drooggewicht ontvangt in totaal 460 ml water, resulterend in 1 460 g vochtig sediment).

Opslag

De droge bestanddelen van het kunstmatige sediment kunnen op een droge en koele plaats bij kamertemperatuur worden bewaard. Het bereide, vochtige sediment kan worden opgeslagen (voor later gebruik in uitsluitend de cultuur) bij 4 ± 2 °C in het donker gedurende een periode van 2 tot 4 weken vanaf de dag van bereiding (8).

Sediment dat met de teststof verrijkt is, moet onverwijld worden gebruikt, tenzij informatie beschikbaar is die erop duidt dat het sediment in kwestie bewaard kan worden zonder dat dit van invloed is op de toxiciteit en biobeschikbaarheid van de teststof. Monsters van verrijkt sediment kunnen tot de analyse onder de voor de desbetreffende teststof aanbevolen omstandigheden worden bewaard.

▼M6

Aanhangsel 6

Voor bioaccumulatietests aanbevolen soorten Oligochaetae

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

De Oligochaeta-worm van de familie Tubificidae *Tubifex tubifex* (Müller) leeft in zoetwatersedimenten in buisjes die bekleed zijn met slijm. In deze buisjes leven de wormen met hun naar beneden gericht, waarbij ze sedimentdeeltjes opnemen met gebruikmaking van de bijbehorende micro-organismen en organische resten. Het achterste deel bevindt zich gewoonlijk in het bovenstaande water voor ademhalingsdoeleinden. Hoewel deze soort leeft in een groot aantal verschillende sedimenttypen op het gehele noordelijke halfrond, geeft *Tubifex tubifex* de voorkeur aan relatief geringe korrelgrootten (59). De geschiktheid van deze soort voor ecotoxicologische tests wordt beschreven in bijvoorbeeld (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Kweekmethoden

Om te zorgen voor een voldoende aantal *Tubifex tubifex* voor de uitvoering van bioaccumulatietests moeten de wormen worden gehouden in een permanente laboratoriumcultuur. Een systeem bestaande uit kunstmatig sediment op basis van de kunstmatige grond conform testmethode C.8 (40) en synthetisch water conform testmethode C.1 wordt aanbevolen voor het kweken van *T. tubifex* (8).

Als kweekvaten kunnen glazen of roestvrijstalen bakken met een hoogte van 12 tot 20 cm worden gebruikt. In elk kweekvat wordt een laag vochtig kunstmatig sediment ingebracht dat is bereid als beschreven in aanhangsel 5. De diepte van de sedimentlaag moet dusdanig zijn dat de wormen hun natuurlijke graafgedrag kunnen vertonen (minimale diepte voor *T. tubifex* 2 cm). Synthetisch water wordt aan het systeem toegevoegd. Verstoring van het sediment moet worden voorkomen. Het water moet voorzichtig worden belucht (bijv. 2 bellen per seconde met lucht die is gefilterd met 0,45 μm) via een pasteurpipet dat 2 cm boven het sedimentoppervlak is geplaatst. De aanbevolen temperatuur van de cultuur is 20 ± 2 °C.

De wormen worden aan het kweeksysteem toegevoegd met een maximale densiteit van 20 000 individuele wormen/m^2 sedimentoppervlak. Een hogere densiteit kan een vermindering van de groei- en voortplantingssnelheden veroorzaken (43).

In culturen met kunstmatig sediment moeten de wormen van voedsel worden voorzien. Fijngemalen visvoer, bijv. TetraMin® kan dienen als aanvullende voeding (8); Klerks 1994, persoonlijke mededeling. De hoeveelheid voeding moet toereikend zijn voor voldoende groei en voortplanting en tegelijkertijd het ontstaan van ammoniak en schimmelgroei in de cultuur tot een minimum beperken. Voedsel kan tweemaal per week worden toegediend (bijv. 0,6 - 0,8 mg per cm^2 sedimentoppervlak). Praktijkervaringen hebben uitgewezen dat de toediening van voedsel dat gesuspendeerd en gehomogeniseerd is in gedeïoniseerd water kan bijdragen aan een homogene verdeling van het voedsel over het sedimentoppervlak in de kweekvaten.

Om ophoping van ammoniak te voorkomen, moet het bovenstaande water worden ververst, hetzij via een doorstroomsysteem of, ten minste één keer per week, handmatig. Het sediment in de stamculturen moet eens per drie maanden worden ververst.

Het nemen van wormmonsters kan worden gedaan door het sediment van de cultuur te zeven met een zeef van 1 mm, indien uitsluitend volwassen dieren nodig zijn. Voor het verwijderen van cocons kan gaas van 0,5 mm en voor jonge wormen kan een zeef van 0,25 mm worden gebruikt. Nadat het sediment erdoorheen is gegaan, kunnen de zeven in synthetisch water worden geplaatst. De wormen verlaten het gaas en kunnen dan uit het water worden gepakt met een zachte stalen tangetje of een pipet met gevuurpolijste randen.

▼M6

Uitsluitend intacte en duidelijk geïdentificeerde specimens van *Tubifex tubifex* (bijv. (64)) worden gebruikt om een test of nieuwe culturen te beginnen. Zieke of gewonde wormen evenals cocons die aangetast zijn door schimmeldraden moeten worden verwijderd.

Een gesynchroniseerde cultuur kan desgewenst en wanneer nodig zorgen voor wormen van een bepaalde leeftijd. Nieuwe kweekvaten worden ingericht na de gekozen intervallen (bijv. eens in de twee weken), beginnend met dieren van een bepaalde leeftijd (bijv. cocons). Onder de hier beschreven cultuuromstandigheden zijn de wormen na 8 tot 10 weken volwassen. De culturen kunnen worden geoogst, wanneer de wormen nieuwe cocons hebben gelegd, bijv. na tien weken. De bemonsterde volwassen wormen kunnen worden gebruikt voor tests en met de cocons kunnen nieuwe culturen worden gestart.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) is ook een bewoner van zoetwatersedimenten overal ter wereld en wordt veel gebruikt in ecotoxicologische tests. Informatie over de biologie, cultuuromstandigheden en gevoeligheid van de soort is te vinden in (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* kan ook worden gekweekt in het kunstmatige sediment dat wordt aanbevolen voor *T. tubifex* volgens (8) binnen bepaalde beperkingen. Aangezien *L. variegatus* in de natuur de voorkeur geeft aan grovere sedimenten dan *T. tubifex (59)*, kunnen laboratoriumculturen met het voor *T. tubifex* gebruikte kunstmatige sediment na 4 tot 6 maanden ophouden te bestaan. Praktijkervaring heeft uitgewezen dat *L. variegatus* gedurende enkele jaren kan worden gehouden in een substraat van zandachtig materiaal (bijv. kwartszand, fijn grind) in een doorstroomsysteem met gebruikmaking van visvoer als voedingsbron, zonder dat het substraat ververst hoeft te worden. Een groot voordeel van *L. variegatus* in vergelijking met andere aquatische soorten Oligochaetae is zijn snelle voortplanting, die leidt tot snel toenemende biomassa in populaties die in het laboratorium worden gekweekt (1)(6)(9)(10).

Kweekmethoden

De kweekomstandigheden voor *Lumbriculus variegatus* zijn in detail beschreven in Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Hieronder wordt een korte samenvatting van deze omstandigheden gegeven.

De wormen kunnen worden gekweekt in grote aquaria (57-80 l) bij 23 °C met een 16 L:8 D fotoperiode (100-1 000 lux) en met natuurlijk water dat elke dag wordt ververst (45-50 l per aquarium). Het substraat wordt bereid door ongebleekte bruine papieren handdoeken in repen te knippen en deze enkele seconden te mengen met kweekwater, zodat kleine stukjes papiersubstraat ontstaan. Dit substraat kan direct in de kweekaquaria voor *Lumbriculus* worden gebruikt door de bodem van de bak ermee te bedekken, of het kan in gedeïoniseerd water worden ingevroren voor later gebruik. Nieuw substraat in de bak zal doorgaans een houdbaarheid van ongeveer twee maanden hebben.

Elke wormcultuur wordt begonnen met 500 tot 1 000 wormen en wordt 3 keer per week onder verversings- of doorstroomomstandigheden gevoed met een 10 ml-suspensie met 6 g startvoer voor forellen. Statische of semistatische culturen moeten een lagere dosering voer krijgen om bacterie- en schimmelgroei te voorkomen. Voedsel en papieren substraat moeten worden geanalyseerd op de stoffen die in de bioaccumulatietests worden gebruikt.

Onder deze omstandigheden verdubbelt het aantal dieren in de cultuur doorgaans in ongeveer 10 tot 14 dagen.

Lumbriculus variegatus kan uit de culturen worden verwijderd door bijv. substraat met fijnmazig gaas, of organismen met een gevuurpolijste glazen pipet met brede mond (diameter van ongeveer 5 mm) naar een aparte beker over te brengen. Als er ook substraat naar deze beker wordt overgebracht, moet de beker met daarin de wormen en het substraat een nacht onder doorstroomomstandigheden rusten, waardoor het substraat uit de beker zal verdwijnen, terwijl de wormen op

▼M6

de bodem van de beker zullen achterblijven. De wormen kunnen daarna in nieuw voorbereide kweekbakken worden geplaatst of voor de test verder worden verwerkt zoals uiteengezet in (1) en (6). Verwondingen of autotomie van de wormen moeten worden voorkomen, bijv. door voor het behandelen van deze wormen pipetten met gevuurpolijste randen of roestvrijstalen staafjes te gebruiken.

Een punt waar goed rekening mee moet worden gehouden bij gebruik van *L. variegatus* in sedimentbioaccumulatietests, is de wijze van voortplanting van de soort (architomie gevolgd door morphallaxis). Deze aseksuele voortplanting leidt tot twee fragmenten, die gedurende enige tijd geen voedsel tot zich nemen, tot het kop- of staartdeel is geregenereerd (bijv. (36), (37)). Dit betekent de opname van sediment en verontreinigingen in *L. variegatus* mogelijk niet continu plaatsvindt zoals bij wormen van de familie Tubificidae, die zich niet door middel van fragmentatie voortplanten.

Er moet daarom een synchronisatie plaatsvinden om ongecontroleerde voortplanting en regeneratie en latere hoge variatie in de testresultaten zoveel mogelijk te beperken. Een dergelijke grote variatie kan optreden wanneer sommige dieren die zich in stukken hebben gedeeld en dus gedurende enige tijd geen voer tot zich nemen, minder worden blootgesteld aan de teststof dan dieren die zich tijdens de test niet in stukken delen, bijv. (38). 10 tot 14 dagen vóór het begin van de blootstelling moeten de wormen kunstmatig in stukken worden gedeeld (synchronisatie) (65). Grote wormen moeten worden gebruikt, die bij voorkeur geen tekenen van recente fragmentatie vertonen. Deze wormen kunnen op een glazen objectglaasje in een druppel kweekwater worden gelegd en met een scalpel in het middendeel van het lichaam in stukken worden gedeeld. Er dient op te worden gelet dat de achterste einden van gelijke grootte zijn. De achterste einden moeten vervolgens in een kweekvat met daarin hetzelfde substraat als gebruikt in de cultuur en hetzelfde synthetische water tot het begin van de blootstelling met rust gelaten worden om nieuwe koppen te regenereren. Wanneer de gesynchroniseerde wormen zich ingraven in het substraat, is dit een teken van regeneratie van nieuwe koppen (de aanwezigheid van geregenereerde koppen kan worden bevestigd door een representatieve steekproef onder een stereoscopische microscoop te inspecteren). De testorganismen zullen daarna naar verwacht in een vergelijkbare fysiologische toestand verkeren. Dit betekent dat, wanneer zich tijdens de test bij gesynchroniseerde wormen regeneratie door morphallaxis voordoet, verwacht wordt dat vrijwel alle dieren in gelijke mate zijn blootgesteld aan het verrijkte sediment. Het voeren van de gesynchroniseerde wormen dient plaats te vinden zodra de wormen zich in het substraat beginnen in te graven, of 7 dagen na de dissectie. Het voederregime moet vergelijkbaar zijn met dat van de reguliere culturen, maar het kan raadzaam zijn de gesynchroniseerde wormen dezelfde voedselbronnen te geven als in de test zullen worden gebruikt. De wormen moeten worden gehouden bij de testtemperatuur, bij 20 ± 2 °C. Na de regeneratieperiode moeten voor de test intacte, complete wormen worden gebruikt die na een voorzichtige mechanische stimulus actief zwemmen of kruipen. Verwondingen of autotomie van de wormen moeten worden voorkomen, bijv. door voor het behandelen van deze wormen pipetten met gevuurpolijste randen of roestvrijstalen staafjes te gebruiken.

Als in de test *Lumbriculus variegatus* wordt gebruikt, moet het aantal wormen tijdens de test vanwege de specifieke voortplantingswijze van deze soort toenemen, mits de omstandigheden daarvoor geschikt zijn (6). Het uitblijven van voortplanting in een bioaccumulatietest met *L. variegatus* moet worden gerapporteerd en in aanmerking worden genomen bij de interpretatie van de testresultaten.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (niet gevalideerd in de ringtest)**

Branchiura sowerbyi leeft in diverse sedimenttypen van reservoirs, meren, vijvers en rivieren, en bewoont oorspronkelijk tropische gebieden. Ze zijn ook te vinden in warme waterlichamen van het noordelijke halfrond. Ze komen echter in grotere aantallen voor in kleimoddersedimenten met een hoog gehalte aan organisch materiaal. Voorts leven de wormen in de sedimentlaag. Zelfs het achterste deel

▼M6

van de wormen wordt gewoonlijk ingegraven. Deze soort is gemakkelijk te herkennen aan de kieuwdraden op het achterste deel van de worm. De volwassen dieren kunnen een lengte van 9 — 11 cm en een natgewicht van 40-50 mg bereiken. De wormen hebben een hoge voortplantingssnelheid, met een verdubbeling van de populatie binnen minder dan 2 weken onder de in het onderstaande beschreven temperatuur- en voedingsomstandigheden (Aston et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* is gebruikt in zowel toxiciteits- als bioaccumulatieonderzoeken (respectievelijk Marchese & Brinkhurst 1996, (31) en Roghair et al. 1996, (67)).

Kweekmethoden

Een samenvatting van de kweekomstandigheden voor *Branchiura sowerbyi* wordt in het onderstaande gegeven (verstrekt door Mercedes R. Marchese, INALI, Argentinië, en Carla J. Roghair, RIVM, Nederland).

Er is niet één voorgeschreven techniek voor het kweken van de testorganismen. De organismen kunnen worden gekweekt met gebruikmaking van niet-verontreinigd, natuurlijk sediment (31). De praktijk wijst uit dat een medium bestaande uit natuurlijk sediment en zand de conditie van de wormen verbetert in vergelijking met zuiver natuurlijk sediment (32)(67). Bekers van 3 l met daarin 1 500 ml sediment-watermedium, bestaande uit 375 ml natuurlijk, niet-verontreinigd sediment (ongeveer 10 % totaal gehalte aan organische koolstof; ongeveer 17 % van de deeltjes ≤ 63 μm), 375 ml schoon zand (M32) en 750 ml synthetisch of gedechlorineerd kraanwater kunnen voor de cultuur worden gebruikt (31)(32)(67). Papieren doeken kunnen ook worden gebruikt als een kweeksubstraat, maar de populatiegroei is geringer dan in natuurlijk sediment. In semistatische systemen wordt de waterlaag in de beker langzaam belucht en moet het bovenstaande water wekelijks worden ververst.

Elke beker bevat 25 jonge wormen om mee te beginnen. Na twee maanden worden de grote wormen uit het sediment verwijderd met een pincet en in een nieuwe beker met vers bereid sediment-watermedium. De oude beker bevat ook cocons en jonge wormen. Tot 400 jonge wormen per beker kunnen op deze manier worden geoogst. Volwassen wormen kunnen gedurende ten minste één jaar voor voortplanting worden gebruikt.

De temperatuur van de culturen moet worden gehandhaafd tussen 21 en 25 °C. De variatie van de temperatuur moet minder zijn dan ± 2 °C. De tijd die nodig is voor de embryo-ontwikkeling vanaf het moment waarop een eitje wordt gelegd tot het moment waarop het jong de cocon verlaat, is ongeveer drie weken bij 25 °C. De productie van eitjes die werd verkregen per overlevende worm van de soort *B. sowerbyi* bleek te variëren van 6,36 (31) tot 11,2 (30) in modder bij 25 °C. Het aantal eitjes per cocon varieert van 1,8 tot 2,8 (66)(69) of tot 8 (68).

Wekelijkse metingen moeten worden verricht voor opgeloste zuurstof, waterhardheid, temperatuur en pH. Visvoer (bijv. TetraMin®) kan twee of drie keer per week als suspensie ad libitum worden toegevoegd. De wormen kunnen ook ad libitum met ontdooide sla worden gevoerd.

Een belangrijk voordeel van deze soort is de grote individuele biomassa (maximaal 40 — 50 mg natgewicht per individueel dier). Om deze reden kan deze soort worden gebruikt in bioaccumulatietests voor teststoffen die niet radioactief gemerkt zijn. De soort kan worden blootgesteld in de systemen die voor *T. tubifex* of *L. variegatus* worden gebruikt met één individuele worm per duplo (11). In dat geval moet echter een groter aantal duplo's worden gebruikt, tenzij grotere testkamers worden gebruikt (11). Ook moet het geldigheidscriterium in verband met graafgedrag voor deze soort worden aangepast.

▼**M6**

LITERATUUR

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Europese Commissie (EC) (2003). Technische leidraad voor risicobeoordeling ter ondersteuning van Richtlijn 93/67/EEG van de Commissie betreffende de risicobeoordeling van nieuwe aangemelde stoffen, Verordening (EG) nr. 1488/94 van de Commissie inzake de risicobeoordeling van bestaande stoffen, en Richtlijn 98/8/EG van het Europees Parlement en de Raad betreffende het op de markt brengen van biociden; Deel I — IV. Bureau voor officiële publicaties van de Europese Gemeenschappen, Luxemburg.

(3) OESO (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO), Parijs.

(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. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Envir. Toxicol. 14, 1885-1894.

(5) Hoofdstuk C.13 van deze bijlage, Bioconcentratie: doorstroomtest met vissen.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Hoofdstuk C.27 van deze bijlage, Test ter bepaling van de toxiciteit voor chironomiden in sedimenten en water m.b.v. verrijkt sediment.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & 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. and 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. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Toxicol. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & 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. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & 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. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and 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. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OESO (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) De volgende hoofdstukken van deze bijlage:

Hoofdstuk A.4, Dampspanning

Hoofdstuk A.5, Oppervlaktespanning

Hoofdstuk A.6, Oplosbaarheid in water

Hoofdstuk A.8, Verdelingscoëfficiënt, schudflesmethode

Hoofdstuk A.24, Verdelingscoëfficiënt, HPLC-methode

Hoofdstuk C.7, Afbraak — niet-biologische afbraak: hydrolyse in afhankelijkheid van de pH

Hoofdstuk C.4 A-F Bepaling van de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid

Hoofdstuk C.19, Raming van de adsorptiecoëfficiënt (K_{oc}) aan de bodem en aan rioolslib met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC)

Hoofdstuk C.29, gemakkelijke biologische afbreekbaarheid — CO_2 in gesloten vaten

(23) OESO (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OESO, Parijs.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & 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 & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlijn Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & 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. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & 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. & 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. & 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) Hoofdstuk C.1 van deze bijlage, Acute toxiciteitstest voor vissen.

(34) OESO (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OESO, Parijs.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & 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. & 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. & 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. & 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) Hoofdstuk C.8 van deze bijlage, Toxiciteit voor regenwormen.

(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). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): 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. & 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. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Envir. Toxicol. 18, 1244-1249.

(48) 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. Toxicol. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & 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. & 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. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & 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.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & 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. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Envir. 31: 277-285.

▼M6

(57) 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. Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Envir. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Envir. Toxicol. 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. Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & 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. & 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. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): 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. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & 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. & 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. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. TEST OP TOXICITEIT BIJ VISSEN IN VROEGE LEVENSSTADIA (FELS — FISH EARLY-LIFE STAGE)

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 210 (2013) van de OESO. Tests in de vroege levensfasen van vissen zijn bedoeld om de letale en subletale effecten van chemische stoffen op de geteste levensfasen en soorten vast te stellen. Zij leveren waardevolle informatie op voor het ramen van de chronische letale en subletale effecten van de chemische stof op andere vissoorten.

2. Testrichtlijn 210 is gebaseerd op een voorstel van het Verenigd Koninkrijk dat werd besproken tijdens een bijeenkomst van OESO-deskundigen in Medmenham (Verenigd Koninkrijk) in november 1988 en werd verder bijgewerkt in 2013 in het licht van de ervaringen met het gebruik van de test en aanbevelingen van een OESO-workshop over toxiciteitstests bij vissen die werd gehouden in september 2010 (1).

PRINCIPE VAN DE TEST

3. De vroege levensfasen van vissen worden blootgesteld aan een concentratiebereik van de in water opgeloste teststof. Dit gebeurt bij voorkeur onder doorstroomomstandigheden, al kunnen semistatische omstandigheden ook worden aanvaard als dat niet mogelijk is. Voor meer informatie dient de OESO-leidraad voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels te worden geraadpleegd (2). Aan het begin van de test worden bevruchte eieren in testkamers geplaatst, waarna de test doorloopt gedurende de tijd die nodig is voor de controlevissen om de jonge levensstadium te bereiken. Deze periode is specifiek voor elke soort. De letale en subletale effecten worden beoordeeld en vergeleken met de controlewaarden om de laagste concentratie met waargenomen effecten (lowest observed effect concentration, LOEC) te bepalen, om zo i) de concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (no observed effect concentration, NOEC) en/of ii) de ECx (bv. EC10, EC50) te bepalen door met behulp van een regressiemodel een raming te maken van de concentratie die zou leiden tot een verandering van het effect met x %. De rapportage van de relevante effectconcentraties en parameters kan afhankelijk zijn van het regelgevingskader. De ECx moet in het bereik van de testconcentraties liggen, zodat de ECx kan worden bepaald door interpolatie in plaats van extrapolatie (zie aanhangsel 1 voor definities).

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

4. Met de term „teststof” wordt verwezen naar datgene dat wordt getest. De oplosbaarheid in water (zie hoofdstuk A.6 van deze bijlage) en de dampspanning (zie hoofdstuk A.4 van deze bijlage) van de teststof moeten bekend zijn. Tevens moet er een betrouwbare analysemethode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en bepaalbaarheidsgrens, beschikbaar zijn voor de kwantificering van de chemische stof in de testoplossingen. Hoewel dit niet nodig is voor het uitvoeren van de test, kunnen de resultaten van een acute-toxiciteitstest (zie hoofdstukken C.1 of C.49 van deze bijlage), bij voorkeur uitgevoerd op de soorten die voor deze test werden gekozen, nuttige informatie opleveren.

5. Indien de testmethode wordt gebruikt voor het testen van een mengsel, moet de samenstelling van het mengsel in de mate van het mogelijke worden gekarakteriseerd, bv. aan de hand van de chemische identiteit van de bestanddelen, hun kwantitatieve aandeel in het mengsel en hun stofspecifieke eigenschappen (zoals die hierboven vermeld). Voordat de testmethode wordt gebruikt om een mengsel te testen voor regelgevingsdoeleinden, dient te worden overwogen of zij aanvaardbare resultaten zal opleveren voor het beoogde regelgevingsdoel.

6. Nuttige gegevens over de teststof zijn de structuurformule, de zuiverheid van de stof, de oplosbaarheid van de stof in water, de stabiliteit van de stof in water en licht, pK_a, P_{ow} en de resultaten van een onderzoek naar de mate van gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (bv. hoofdstuk C.4 of C.29 van deze bijlage).

▼M7

GELDIGHEID VAN DE TEST

7. Een test is uitsluitend onder de volgende voorwaarden geldig:

— het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele test > 60 % van de verzadigingswaarde van lucht bedragen;

— het verschil in watertemperatuur tussen de testkamers en tussen de opeenvolgende dagen mag op geen enkel moment van de test groter zijn dan ± 1,5 °C. Tevens mag de watertemperatuur niet hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 2);

— analytische meting van de testconcentraties is verplicht;

— het totale percentage bevruchte eitjes en uitgekomen vissen in de controlegroep en eventueel in de controle met alleen het oplosmiddel dat de test overleeft, moet groter of gelijk zijn aan de minimale percentages in aanhangsel 2.

8. Als er zich een kleine afwijking van de geldigheidscriteria voordoet, moeten de gevolgen daarvan voor de betrouwbaarheid van de testgegevens worden overwogen en moeten die overwegingen worden opgenomen in het verslag. De effecten op het overleven, het uitkomen en de groei in de oplosmiddelcontrole in vergelijking met de negatieve controle moeten worden gerapporteerd en besproken met het oog op de betrouwbaarheid van de testgegevens.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Testkamers

9. Alle glazen, roestvrijstalen of andere chemisch inerte bakken mogen worden gebruikt. Aangezien bekend is dat silicone een sterk vermogen heeft om lipofiele stoffen te absorberen, dient het gebruik van siliconenleidingen bij doorstroomstudies en het gebruik van siliconendichtingen die met water in contact komen, tot een minimum te worden beperkt door bv. glazen monobloc-aquaria te gebruiken. De afmetingen van de bakken moeten groot genoeg zijn om de nodige groei toe te laten in de controlegroep, het gehalte opgeloste zuurstof in stand te houden (voor kleine vissoorten volstaat bijvoorbeeld een bak met een volume van 7 liter) en de densiteitscriteria te handhaven die in punt 19 zijn vastgelegd. Het is wenselijk de testkamers willekeurig in het testgebied te plaatsen. Een gerandomiseerde blokopzet waarbij elke behandeling aanwezig is in elk blok, geniet de voorkeur boven een volledig gerandomiseerde opzet. De testkamers moeten worden beschermd tegen ongewenste invloeden van buitenaf. Het testsysteem moet bij voorkeur vooraf lang genoeg worden behandeld met concentraties van de teststof om stabiele blootstellingsconcentraties te kunnen aantonen voordat de testorganismen in het systeem worden geïntroduceerd.

Keuze van de soorten

10. In tabel 1 staan de aanbevolen vissoorten. Dit sluit niet uit dat ook andere soorten mogen worden gebruikt, maar in dat geval kan het nodig zijn de testprocedure aan te passen om geschikte proefomstandigheden te creëren. Als er wordt gekozen voor een andere vissoort, moet worden aangegeven waarom er voor deze soort is gekozen en moet tevens worden gerapporteerd welke experimentele methode wordt toegepast.

Leefomstandigheden van de broedvis

11. Meer informatie over de relatief beste leefomstandigheden voor de broedvissen vindt u in aanhangsel 3 en de genoemde referenties (3) (4) (5).

Omgaan met bevruchte eieren, embryo's en larven

12. In eerste instantie kunnen bevruchte eieren, embryo's en larven binnen de hoofdbak worden onderverdeeld in kleinere glazen of roestvrijstalen bakken

▼M7

die zijn voorzien van gaaswanden waardoor de testoplossing vrij door de hoofdbak kan stromen. Een niet-turbulente doorstroming in deze kleine bakken kan worden verkregen door deze aan een arm te hangen die ze op en neer beweegt, waarbij de organismen te allen tijde onder water blijven. Bevruchte eitjes van zalmachtigen kunnen op een rek of gaas worden gelegd met gaten die zo groot zijn dat de larven, nadat ze zijn uitgekomen, erdoorheen kunnen vallen.

13. Indien er eihouders, roosters of gaaswerken zijn gebruikt om de eitjes in de hoofdbak op hun plaats te houden, moeten deze worden verwijderd zodra de larven uitkomen, zoals beschreven in de richtsnoeren in aanhangsel 3. Stukken gaas die voorkomen dat larven ontsnappen, mogen niet worden verwijderd. Als de larven moeten worden overgeplaatst, mogen zij niet aan de lucht worden blootgesteld. Er mogen geen netten worden gebruikt om larven uit de eihouders te halen. Het moment van overplaatsing is afhankelijk van de soort en moet worden gedocumenteerd in het verslag. Soms is overplaatsing echter niet nodig.

Water

14. Water waarin de gekozen testsoort in afdoende mate langdurig kan overleven en groeien is geschikt als testwater (zie aanhangsel 4). Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de broedvissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bv. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bv. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), ammonium, het totale residugehalte aan chloorpesticiden, het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld halfjaarlijks worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Als van het water bekend is dat het een variabele kwaliteit heeft, moeten de metingen vaker worden verricht; de frequentie ervan is dan afhankelijk van hoe variabel de waterkwaliteit is. In aanhangsel 4 worden enkele chemische kenmerken van geschikt verdunningswater genoemd.

Testoplossingen

15. Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stamoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat de testkamers de juiste reeks testconcentraties krijgen toegediend (bv. met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem). De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Een stroomsnelheid die overeenkomt met ten minste vijf testkamervolumes per 24 uur is wenselijk (3). Als de in punt 19 vastgestelde densiteit wordt geëerbiedigd, is een lagere stroomsnelheid van bv. 2-3 testkamervolumes echter ook mogelijk om te voorkomen dat het voeder te snel wordt verwijderd.

16. De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen of schudden van de teststof in verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren en/of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) of passieve doseringsmethoden (6) worden gebruikt. Het gebruik van een draagvloeistof wordt niet aanbevolen. Indien echter een oplosmiddel noodzakelijk is, moet gelijktijdig een controletest met het oplosmiddel worden uitgevoerd, met dezelfde oplosmiddelconcentratie als voor de chemische behandelingen wordt gebruikt. Dat wil zeggen dat het oplosmiddelniveau bij voorkeur gelijk moet zijn voor alle concentraties en voor de oplosmiddelcontrole. Voor sommige verdunningssystemen kan dat technisch moeilijk zijn; in dat geval dient de oplosmiddelconcentratie in de oplosmiddelcontrole gelijk te zijn aan de hoogste oplosmiddelconcentratie in de dosisgroep. Voor moeilijk te testen stoffen dient OESO-leidraad nr. 23 voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels te worden geraadpleegd (2).

▼M7

Als er een oplosmiddel wordt gebruikt, dient de keuze van het juiste oplosmiddel af te hangen van de chemische eigenschappen van de teststof. In OESO-leidraad nr. 23 wordt een maximumconcentratie van 100 µl/l aanbevolen. Om potentiële effecten van het oplosmiddel op de gemeten eindpunten (7) te vermijden, wordt aanbevolen om de oplosmiddelconcentratie zo laag mogelijk te houden.

17. Voor een semi-statische test kunnen twee verschillende verversingsprocedures worden toegepast. Ofwel worden nieuwe testoplossingen bereid in schone bakken en worden de overlevende eieren en larven voorzichtig overgeplaatst naar de nieuwe bakken, ofwel worden de testorganismen in de testbakken gehouden terwijl een deel (ten minste twee derde) van het volume testoplossing/controle wordt vervangen.

PROCEDURE

Blootstellingsomstandigheden

Duur

18. De test moet worden gestart zo snel mogelijk nadat de eieren zijn bevrucht en bij voorkeur in de testoplossing zijn geplaatst vóór, of zo snel mogelijk na, het begin van het blastodiscus-stadium. De duur van de test hangt af van de vissoort die wordt gebruikt. Aanhangsel 2 bevat de aanbevolen duur voor enkele soorten.

Densiteit

19. Het aantal bevruchte eitjes aan het begin van de test moet toereikend zijn om te kunnen voldoen aan de statistische vereisten. De eitjes moeten willekeurig worden verdeeld over de verschillende behandelingen. Daarbij moeten ten minste 80 eitjes per concentratie worden gebruikt, gelijk verdeeld over ten minste drie replicaat-testkamers. De densiteit (biomassa per volume testoplossing) moet zo laag zijn dat het gehalte aan opgeloste zuurstof van minimaal 60 % van de luchtverzadigingswaarde zonder beluchting in stand kan worden gehouden tijdens het eistadium en het larvaal stadium. Bij doorstroomtests wordt een densiteit van maximaal 0,5 g/l nat gewicht per 24 uur en maximaal 5 g/l oplossing op een willekeurig moment (3) aanbevolen.

Licht en temperatuur

20. De fotoperiode en watertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (zie aanhangsel 2).

Voeding

21. Het voeder en het voeren zijn van kritiek belang, en het is essentieel dat voor elk levensstadium het juiste voeder wordt gegeven op het juiste moment en in een hoeveelheid die volstaat om de normale groei te ondersteunen. De dieren in alle replicaten dienen ongeveer dezelfde voeding te krijgen, tenzij er correcties nodig zijn om rekening te houden met de sterfte. Overtollig voedsel en fecaal materiaal moeten indien nodig worden verwijderd om te voorkomen dat er zich afvalstoffen ophopen. Aanhangsel 3 bevat gedetailleerde voederschema's, al worden het voer en de voederschema's voortdurend verfijnd om de overleving te verbeteren en de groei te optimaliseren naarmate meer ervaring wordt opgedaan. Levend voeder is een vorm van milieuverrijking en dient daarom te worden gebruikt in plaats van of als aanvulling op droogvoer of bevroren voeder, voor zover dat gepast is voor de desbetreffende soort en het desbetreffende levensstadium.

Testconcentraties

22. Normaliter zijn er vijf concentraties van de teststof nodig, met een minimum van vier replicaten per concentratie, die een constante factor van maximaal 3,2 van elkaar verschillen. Bij het selecteren van de reeks concentraties moet rekening worden gehouden (1) met eventuele informatie over het acute toxiciteitsonderzoek, bij voorkeur bij dezelfde soort, en/of met een bereikbepalingstest. Bij het selecteren van de reeks testconcentraties dient evenwel rekening te worden gehouden met alle bronnen van informatie, met inbegrip van bronnen als een „read-across” of gegevens van een acute toxiciteitstest bij vissenembryo's. Een limiettest of uitgebreide limiettest met minder dan vijf concentraties kan als definitieve test worden aanvaard als er enkel empirische

▼M7

NOEC's moeten worden vastgesteld. Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet er een motivering worden gegeven. Er mogen geen concentraties van de teststof worden gebruikt die hoger zijn dan de LC_{50} over 96 uur of, indien dit lager is, 10 mg/l.

Controles

23. In aanvulling op de testreeks met concentraties van de teststof, moeten een verdunningswatercontrole en, indien nodig, een oplosmiddelcontrole met enkel het oplosmiddel als draagvloeistof worden uitgevoerd (zie punt 16).

Frequentie van de analytische bepalingen en metingen

24. Voor aanvang van de blootstellingsperiode moet de juiste werking van het afgiftesysteem van de teststof zijn gewaarborgd voor alle replicaten (bijvoorbeeld door de testconcentraties te meten). De noodzakelijke analysemethoden moeten zijn vastgesteld, inclusief een passende bepaalbaarheidsgrens (limit of quantification, LOQ) en voldoende kennis over de stabiliteit van de stof in het testsysteem. Tijdens de test worden de concentraties van de teststof regelmatig bepaald om de blootstelling te karakteriseren. Er moeten minimaal vijf bepalingen plaatsvinden. In doorstroomsystemen moet de teststof ten minste een keer per week in één replicaat per concentratie analytisch worden bepaald, waarbij systematisch wordt gewisseld van replicaat. Aanvullende analytische bepalingen komen de kwaliteit van het testresultaat vaak ten goede. De monsters moeten mogelijk worden gefilterd om eventuele deeltjes te verwijderen (bijvoorbeeld met een poriëngrootte van 0,45 μm) of worden gecentrifugeerd om ervoor te zorgen dat de bepalingen betrekking hebben op de teststof in ware oplossing. Om de adsorptie van de teststof te beperken, moeten de filters worden verzadigd voor gebruik. Wanneer de gemeten concentraties niet binnen de nominale concentratie van 80-120 % blijven, dienen de effectconcentraties te worden bepaald en uitgedrukt in verhouding tot het rekenkundige gemiddelde van de concentraties voor doorstroomtests (zie aanhangsel 6 van testmethode C.20 voor de berekening van het rekenkundig gemiddelde (8)), en uitgedrukt in verhouding tot het geometrische gemiddelde van de gemeten concentraties voor semistatische tests (zie hoofdstuk 5 in de OESO-leidraad voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (2)).

25. In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de temperatuur en de pH in alle testbakken ten minste één keer per week worden gemeten. Het zoutgehalte en de hardheid moeten worden gemeten aan het begin en het einde van de test, indien gerechtvaardigd. De temperatuur moet bij voorkeur in ten minste één testbak continu worden gecontroleerd.

Waarnemingen

26. **Stadium van embryonale ontwikkeling**: het embryonale stadium aan het begin van de blootstelling aan de teststof moet zo nauwkeurig mogelijk worden gecontroleerd. Hiervoor kan een representatief monster van eitjes worden gebruikt die afdoende zijn gefixeerd en geklaard.

27. **Uitkomen en overleven**: minimaal één keer per dag moet uitkomen en overleven worden geobserveerd en de aantallen geregistreerd. Als er vroeg in de embryonale ontwikkeling (bijvoorbeeld op dag één of dag twee van de test) schimmel op eitjes wordt vastgesteld, dienen die eitjes te worden geteld en verwijderd. Dode embryo's, larven en jonge vissen moeten meteen worden verwijderd zodra ze worden opgemerkt, aangezien zij snel kunnen ontbinden en uiteen kunnen vallen door het gedrag van de overige vissen. Het verwijderen van dode organismen moet zeer voorzichtig gebeuren om beschadiging van naastgelegen eitjes/larven te voorkomen. De tekenen van dood variëren per soort en per stadium. Bijvoorbeeld:

▼M7

— voor bevruchte eitjes: met name in de eerste stadia duidelijk minder doorzichtig en een verandering van kleur als gevolg van coagulatie en/of precipitatie van proteïne, hetgeen resulteert in een wit ondoorschijnend uiterlijk;

— voor embryo's, larven en jonge vissen: onbeweeglijkheid en/of geen ademhaling en/of geen hartslag en/of witte ondoorschijnende kleur van het centrale zenuwstelsel en/of geen reactie op een mechanische prikkel.

28. **Afwijkend uiterlijk**: het aantal larven of jonge vissen dat een afwijkende lichaamsvorm vertoont dient op gepaste tijden te worden geregistreerd, naargelang van de duur van de test en de aard van de beschreven afwijkingen. Larven en jonge vissen met een afwijking kunnen van nature voorkomen en bij sommige vissoorten kan het aantal oplopen tot enkele procenten van de controlegroep(en). Wanneer de misvormingen en het ermee samenhangende afwijkende gedrag zo ernstig worden geacht dat het organisme er aanzienlijk onder lijdt, en het een punt heeft bereikt waarop het niet meer zal herstellen, mag het uit de test worden verwijderd. Dergelijke dieren moeten worden geëuthanaseerd en in de latere gegevensanalyse als sterfgevallen worden behandeld. Voor de meeste soorten die in deze testmethode worden aanbevolen, is de normale embryonale ontwikkeling gedocumenteerd (9) (10) (11) (12).

29. **Afwijkend gedrag**: afwijkingen, zoals hyperventilatie, ongecoördineerd zwemmen en atypisch(e) onbeweeglijkheid of eetgedrag moeten op gepaste tijden worden geregistreerd naargelang van de duur van de test (bv. een keer per dag voor warmwatersoorten). Deze effecten zijn moeilijk te kwantificeren, maar kunnen, als zij worden waargenomen, helpen om de sterftegegevens te interpreteren.

30. **Gewicht**: aan het eind van de test worden alle overlevende vissen tenminste per replicaat gewogen (waarbij het aantal dieren in het replicaat en het gemiddelde gewicht per dier worden gerapporteerd): nat gewicht — (droog-gedept) geniet de voorkeur, al mogen gegevens over het droge gewicht ook worden gerapporteerd (13).

31. **Lengte**: aan het eind van de test worden de individuele lengtes gemeten. Het is aanbevolen om de totale lengte te meten, al kan ook de standaardlengte worden gebruikt in het geval er vinrot in de staart of vinerosie is opgetreden. Voor alle vissen in een bepaalde test moet dezelfde methode worden gebruikt. De individuele lengte kan worden gemeten met een schuifmaat, een digitale camera of een gekalibreerd micrometer-oculair. De typische minimumlengten zijn gedefinieerd in aanhangsel 2.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

32. Het is aanbevolen dat de testopzet en de selectie van de statistische proef een voldoende groot onderscheidend vermogen (80 % of hoger) waarborgen om biologisch significante veranderingen in de eindpunten op te sporen wanneer er een NOEC moet worden gerapporteerd. De rapportage van de relevante effectconcentraties en parameters kan afhankelijk zijn van het regelgevingskader. Als er een EC_x moet worden gerapporteerd, moeten de testopzet en de selectie van het regressiemodel van dien aard zijn dat de EC_x kan worden geraamd, zodat i) het betrouwbaarheidsinterval van 95 % voor EC_x nul niet omvat en niet te ruim is, ii) het betrouwbaarheidsinterval van 95 % voor het voorspelde gemiddelde bij EC_x het controlegemiddelde niet omvat en iii) er geen significant gebrek aan afstemming tussen het regressiemodel en de gegevens bestaat. Voor elke aanpak moet de procentuele verandering in elk eindpunt waarvan opsporing of raming significant is, worden geïdentificeerd. De testopzet moet dat mogelijk maken. Als niet aan bovenstaande voorwaarden voor het bepalen van EC_x is voldaan, moet de NOEC-aanpak worden gehanteerd. Het is niet waarschijnlijk dat voor alle eindpunten dezelfde procentuele verandering geldt, en het is evenmin waarschijnlijk dat er een haalbaar experiment kan worden opgezet dat voor alle eindpunten aan deze criteria voldoet. Daarom is het van belang om bij het opzetten van het experiment bijzondere aandacht te schenken aan die eindpunten die van belang zijn voor het respectieve experiment. In de aanhangsels 5 en 6 zijn

▼M7

statistische stroomdiagrammen en richtsnoeren voor elke aanpak opgenomen die als leidraad kunnen dienen voor de behandeling van gegevens en voor de keuze van de meest geschikte statistische proef of het meest geschikte model. Andere statistische aanpakken mogen worden gebruikt voor zover zij wetenschappelijk gerechtvaardigd zijn.

33. De variatie moet binnen elke set replicaatbakken worden geanalyseerd met behulp van variantieanalyse of kruistabellen. Bij die analyse moet een passende statistische analysemethode worden gebruikt. Bij het maken van een meervoudige vergelijking tussen de resultaten van de afzonderlijke concentraties en de resultaten van de controlegroepen, wordt de stap-omlaag-toets van Jonckheere-Terpstra of van Williams aanbevolen voor continue responsen, en de stap-omlaag-toets van Cochran-Armitage voor binaire responsen die overeenkomen met een monotone concentratierespons en geen aanwijzingen van extrabinomiale variantie (14). Wanneer er aanwijzingen zijn van extrabinomiale variantie, wordt aanbevolen om de correctie van Rao-Scott op de toets van Cochran-Armitage (15) (16) of de toets van Williams, Dunnett (na een hoektransformatie) of Jonckheere-Terpstra, toegepast op replicaatverhoudingen, te gebruiken. Wanneer de gegevens niet stroken met een monotone concentratierespons, kan het nuttig zijn om de methode van Dunnett, Dunn of Mann-Whitney te gebruiken voor continue responsen, en de exacte toets van Fisher voor binaire responsen (14) (17) (18). Bij het toepassen van statistische methodes of modellen moet ervoor worden gezorgd dat aan de vereisten van de methode of het model is voldaan (bv. de variabiliteit van kamer tot kamer is geraamd en meegenomen in de testopzet en de gebruikte toets of het gebruikte model). De gegevens moeten worden beoordeeld op normaliteit, en in aanhangsel 5 is beschreven wat er met de residuen van een ANOVA moet gebeuren. In aanhangsel 6 worden aanvullende overwegingen voor de regressieaanpak besproken. Om aan de vereisten van een statistische proef te voldoen, moeten transformaties worden overwogen. Transformaties om een regressiemodel passend te maken moeten echter zeer zorgvuldig worden uitgewerkt, aangezien een verandering in de niet-getransformeerde respons met 25 % bijvoorbeeld niet overeenkomt met een verandering van 25 % in een getransformeerde respons. In alle analyses is de testkamer en niet de afzonderlijke vis de analyse-eenheid en de experimenteenheid; zowel de hypothesetoetsen als de regressie dienen dat te weerspiegelen (3) (14) (19) (20).

Testverslag

34. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

Stof die uit één component bestaat

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz. (met inbegrip van het gehalte aan organische koolstof, indien van toepassing);

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk gekarakteriseerd aan de hand van bv. chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Proefdiersoort:

— wetenschappelijke naam, stam, bron en verzamelmethode van de bevruchte eitjes en daaropvolgende behandeling.

▼M7

Testomstandigheden:

— gebruikte testprocedure (bv. semistatisch of doorstroom, densiteit);

— fotoperiode(n);

— testopzet (bv. aantal testkamers en replicaten, aantal eitjes per replicaat, materiaal en afmetingen van de testkamer (hoogte, breedte, volume), watervolume per testkamer);

— wijze waarop de stamoplossingen werden bereid en verversingsfrequentie (indien een ontsluitingsmiddel is gebruikt, moeten de aard en de concentratie daarvan worden vermeld);

— methode voor het doseren van de teststof (bv. pompen, verdunningssystemen);

— de recovery van de methode en de nominale testconcentraties, de bepaalbaarheidsgrens, de gemiddelden van de gemeten waarden en standaarddeviaties in de testbakken en de methode waarmee die werden verkregen, en bewijs dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in ware oplossing;

— kenmerken van het verdunningswater: pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, restchloorgehalte (indien gemeten), totale hoeveelheid organische koolstof (indien gemeten), zwevende deeltjes (indien gemeten), zoutgehalte van het testmedium (indien gemeten), alsmede de resultaten van eventuele andere metingen;

— waterkwaliteit in de testbakken: pH, hardheid, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof;

— gedetailleerde gegevens over de voeding (bijvoorbeeld het type voedsel, de leverancier, het rantsoen en de frequentie).

Afzonderlijk (of per replicaat) en, waar passend, als gemiddelde en variatiecoëfficiënt gerapporteerde resultaten voor de volgende eindpunten:

— gegevens waaruit blijkt dat de totale overleving in de controlegroepen voldeed aan de aanvaardbaarheidsnorm voor het gebruikte proefdier (aanhangsel 2);

— gegevens over de sterfte in elk stadium (embryo, larve en jonge vis) en cumulatieve sterfte;

— dagen tot het uitkomen, aantal larven dat elke dag is uitgekomen, en het einde van het uitkomen;

— aantal gezonde vissen aan het eind van de test;

— gegevens over de lengte (vermelden of het gaat om standaard- of totale lengte) en het gewicht van de overlevende dieren;

— gevallen, aantal en beschrijving van morfologische afwijkingen (indien aanwezig);

— gevallen, aantal en beschrijving van effecten op het gedrag (indien aanwezig);

— gebruikte aanpak voor de statistische analyse (regressieanalyse of variantieanalyse) en de behandeling van gegevens (gebruikte statistische proef of gebruikt model);

— concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen voor elke beoordeelde respons (NOEC);

▼M7

— laagste concentratie met waargenomen effecten (bij p = 0,05) voor elke beoordeelde respons (LOEC);

— EC_x voor elke beoordeelde respons, indien van toepassing, en betrouwbaarheidsintervallen (bv. 90 % of 95 %) en een grafiek van het gepaste model dat werd gebruikt om deze waarde te berekenen, de helling van de concentratie/responscurve, de formule van het regressiemodel, de geraamde modelparameters en hun standaardfout.

Alle afwijkingen van deze testmethode.

Bespreking van de resultaten, met inbegrip van de eventuele invloed van afwijkingen van deze testmethode op de resultaten van de test.

Tabel 1

Aanbevolen vissoorten voor de test

ZOETWATER	ESTUARIEN en MARIEN
Oncorhynchus mykiss Regenboogforel	*Cyprinodon variegatus* Edelsteentandkarper
Pimephales promelas Amerikaanse dikkop-elrits	*Menidia* sp. „Silverside”
Danio rerio Zebravis	
Oryzias latipes Japanse rijstvis of medaka	

LITERATUUR

(1) OESO (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr. 171, OESO, Parijs.

(2) OESO (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr. 23, OESO Parijs.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 blz.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Hoofdstuk C.20 van deze bijlage, *Daphnia magna* voortplantingstest.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼M7

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 — 376.

(14) OESO (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, OESO, Parijs.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of 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. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

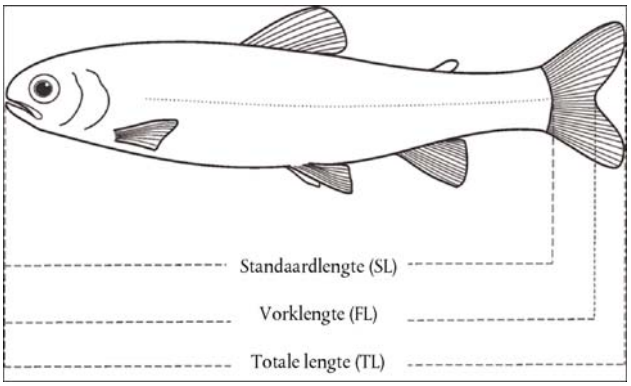
Vorklengte (FL): de lengte van het uiteinde van de snuit tot het einde van de middenstraal van de staartvin, wordt gebruikt bij vissen waarbij het moeilijk is om te bepalen waar de wervelkolom ophoudt (www.fishbase.org)

Standaardlengte (SL): de lengte van een vis, gemeten van het uiteinde van de bek tot het achtereinde van de laatste wervel of het achtereinde van het midlaterale van de hypurale plaat. Eenvoudig gesteld wordt de lengte van de staartvin in deze meting niet meegerekend. (www.fishbase.org)

Totale lengte (TL): de lengte van het uiteinde van de bek tot het uiteinde van de langste lob van de staartvin, gewoonlijk gemeten met de lobben samengedrukt langs de middenlijn. Dit is een meting in rechte lijn, die niet wordt gemeten over de welving van het lichaam (www.fishbase.org)

Figuur 1:

beschrijving van de verschillende lengtes die worden gebruikt.



Chemische stof: een stof of mengsel

EC_x: (Effect concentration for x % effect) is de concentratie die binnen een bepaalde blootstellingstijd x % van een effect op testorganismen veroorzaakt ten opzichte van een controle. De EC_{50} is bijvoorbeeld de geschatte concentratie die gedurende een bepaalde blootstellingsperiode bij 50 % van een blootgestelde populatie een effect op een testeindpunt zal hebben.

De **Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)** is de laagste geteste concentratie van een teststof waarbij de stof een statistisch significant effect ($p \leq 0,05$) heeft vergeleken met de controlegroep. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd. Aanhangsels 5 en 6 bevatten richtsnoeren hieromtrent.

No Observed Effect Concentration (NOEC) (concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen): de testconcentratie direct onder de LOEC, die in vergelijking met de controle geen statistisch significant effect heeft ($p < 0,05$) binnen een aangegeven blootstellingsperiode.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

UVCB: stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

▼M7

Aanhangsel 2

TESTOMSTANDIGHEDEN, DUUR EN OVERLEVINGSCRITERIA VOOR AANBEVOLEN VISSOORTEN

SOORT	TESTOMSTANDIGHEDEN			AANBEVOLEN DUUR VAN DE TEST	Typische minimale gemiddelde totale lengte van de controlevissen aan het einde van het onderzoek (mm) ([1])	OVERLEVING BINNEN CONTROLEGROEP (minimum)	
	Temperatuur (°C)	Zoutgehalte ($^0/_{00}$)	Fotoperiode (uur)			Uitkomen eitjes	Overleving na het uitkomen
Zoetwater:							
Oncorhynchus mykiss Regenboogforel	10 ± 1,5 ([2])		12 — 16 ([3])	2 weken nadat de controlevissen vrij kunnen eten (of 60 dagen na het uitkomen)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Amerikaanse dikkop-elrits	25 ± 1,5		16	32 dagen na de start van de test (of 28 dagen na het uitkomen)	18	70 %	75 %
Danio rerio Zebravis	26 ± 1,5		12 — 16 ([4])	30 dagen na het uitkomen	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Japanse rijstvis of medaka	25 ± 2		12 — 16 ([5])	30 dagen na het uitkomen	17	80 %	80 %
Estuarien en marien:							
Cyprinodon variegatus Edelsteentandkarper	25 ± 1,5	15-35 ([5])	12 — 16 ([4])	32 dagen na de start van de test (of 28 dagen na het uitkomen)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Silverside	22 — 25	15-35 ([5])	13	28 dagen	20	80 %	60 %

Verklaring:

([1]) De typische minimale gemiddelde totale lengte is geen geldigheidscriterium, maar afwijkingen onder dit cijfer dienen zorgvuldig te worden onderzocht met het oog op de gevoeligheid van de test. De minimale gemiddelde totale lengte wordt afgeleid van een selectie gegevens die op het desbetreffende moment beschikbaar zijn.

([2]) Naargelang van de specifieke stam van regenboogforel die wordt getest, kan het nodig zijn om andere temperaturen te hanteren. Broedvissen moeten bij dezelfde temperatuur worden gehouden als die welke voor de eitjes zal worden gebruikt. Nadat de eitjes in ontvangst zijn genomen van een commerciële kweker, is een korte aanpassingsperiode (bv. 1-2 uur) nodig om de temperatuur te testen na aankomst.

([3]) Duisternis voor embryo's en larven tot een week nadat de eitjes zijn uitgekomen, behalve wanneer ze worden geïnspecteerd. Daarna zwak licht tot het eind van de test (fotoperiode van 12-16 uur)[(4).]

([4]) Het lichtregime moet altijd constant zijn voor de desbetreffende testomstandigheden.

([5]) Dit wordt voor elke test verricht tot ± $2^0/_{00}$.

02008R0440 — NL — 18.05.2017 — 007.001 — 2064

▼M7

Aanhangsel 3

RICHTSNOEREN VOOR HET VOEDEREN EN HANTEREN VAN BROED- EN TESTVISSEN VAN AANBEVOLEN SOORTEN

SOORT	VOEDSEL (*)				OVERPLAATSINGSTIJD NA HET UITKOMEN	TIJD TOT DE EERSTE VOEDING
	Broedvis	Net uitgekomen larve	Jonge exemplaren			
			Soort	Frequentie		
Zoetwater:						
Oncorhynchus mykiss Regenboogforel	forelvoer	Geen (a)	startvoer voor forellen BSN	2-4 voedingen per dag	14-16 dagen na het uitkomen of bij het naar boven zwemmen (niet essentieel)	19 dagen na het uitkomen of bij het naar boven zwemmen
Pimephales promelas Amerikaanse dikkop-elrits	BSN, voervlokken, FBS	BSN	BSN48, voervlokken	2-3 keer per dag	zodra 90 % is uitgekomen	2 dagen na het uitkomen
Danio rerio Zebravis	BSN, voervlokken	Commercieel larvenvoer, protozoa (b), proteïne (c)	BSN48, voervlokken,	BSN een keer per dag; voervlokken twee keer per dag	zodra 90 % is uitgekomen	2 dagen na het uitkomen
Oryzias latipes Japanse rijstvis of medaka	voervlokken	BSN, voervlokken (of protozoa or rotiferen)	BSN48, voervlokken (of rotiferen)	BSN een keer per dag; voervlokken twee keer per dag of voervlokken en rotiferen een keer per dag	niet van toepassing	6-7 dagen na het paaien
Estuarien en marien:						
Cyprinodon variegatus Edelsteentandkarper	BSN, voervlokken, FBS	BSN	BSN48	2-3 voedingen per dag	niet van toepassing	1 dag na het uitkomen/naar boven zwemmen
Menidia sp. Silverside	BSN48, voervlokken	BSN	BSN48	2-3 voedingen per dag	niet van toepassing	1 dag na het uitkomen/naar boven zwemmen

Verklaring:

(*) Er dient te worden gevoederd tot het verzadigingspunt. Overtollig voedsel en fecaal materiaal moeten indien nodig worden verwijderd om te voorkomen dat er zich afvalstoffen ophopen

FBS bevroren pekelkreeftjes (frozen brine shrimp); volwassen Artemia sp

BSN larvale pekelkreeftjes (brine shrimp nauplii); net uitgekomen

BSN48 larvale pekelkreeftjes (brine shrimp nauplii); 48 uur oud

(a) larven met dooierzakjes behoeven geen voedsel

(b) gefilterd uit gemengde kweek

(c) korrels van fermentatieproces

▼M7

Aanhangsel 4

ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN GESCHIKT VERDUNNINGSWATER

Bestanddeel	Drempelconcentratie
Vaste deeltjes	5 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammoniak	1 µg/l
Restchloorgehalte	10 µg/l
Totaal organofosforpesticiden	50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Chroom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Koper	1 µg/l
IJzer	1 µg/l
Lood	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Kwik	100 ng/l
Zilver	100 ng/l

▼M7

Aanhangsel 5

STATISTISCHE RICHTSNOEREN VOOR NOEC-BEPALING

Algemene opmerkingen

De replicaatbak is de analyse-eenheid. Voor continue metingen, zoals het meten van de grootte, dient daarom een gemiddelde of mediaan te worden berekend voor het replicaat, en die replicaatwaarden zijn de gegevens die worden geanalyseerd. Het onderscheidend vermogen van de gebruikte tests moet worden aangetoond, bij voorkeur op basis van een adequate historische gegevensbank voor elk laboratorium. De grootte van het effect die kan worden gedetecteerd met een onderscheidend vermogen van 75-80 % moet voor elk eindpunt worden vermeld met de statistische toets die zal worden gebruikt.

De gegevensbanken die beschikbaar zijn bij het ontwikkelen van deze testmethode, bepalen het mogelijke onderscheidende vermogen van de aanbevolen statistische toetsen. Elk afzonderlijk laboratorium moet aantonen dat het in staat is om aan deze vereiste inzake het onderscheidend vermogen te voldoen door een eigen analyse van dat vermogen te verrichten of door aan te tonen dat de variatiecoëfficiënt (VC) voor elke respons het 90_e percentiel van de VC's die werden gebruikt bij de ontwikkeling van de TG, niet overschrijdt. Deze VC's zijn vermeld in tabel 1. Als er enkel gemiddelden of medianen per replicaat beschikbaar zijn, kan de VC binnen het replicaat buiten beschouwing worden gelaten..

Tabel 1

90_e percentiel VC's voor geselecteerde zoetwatersoorten

Soort	Respons	VC_Tussen replicaten	VC_Binnen replicaten
Regenboogforel	Lengte	17,4	9,8
	Gewicht	10,1	28
Amerikaanse dikkop-elrits	Lengte	16,9	13,5
	Gewicht	11,7	38,7
Zebravis	Lengte	43,7	11,7
	Gewicht	11,9	32,8

Voor nagenoeg alle statistische toetsen die worden gebruikt om toxicologische onderzoeken van laboratoria te evalueren, is het de vergelijking van de dosisgroepen met de controlegroepen die van belang is. Daarom is het niet raadzaam te eisen dat er een significante ANOVA F-toets plaatsvindt voordat een toets van Dunnett of William wordt gebruikt, of een significante toets van Kruskal-Wallis voordat de toets van Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney of Dunn wordt gebruikt (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

De toets van Dunnett bevat een multipliciteitscorrectie, en de percentages vals-positieven en vals-negatieven worden nadelig beïnvloed door de F-toets als poortwachter te gebruiken. Evenzo waarborgen de stap-omlaagtoetsen van Williams en Jonckheere-Terpstra waarbij een significantieniveau van 0,05 wordt gehanteerd bij elke stap, een totaalpercentage van vals-positieven van 5 %, en dat percentage en het onderscheidend vermogen van de toetsen worden nadelig beïnvloed door de F- of de Kruskal-Wallis-toets als poortwachter te gebruiken. De toetsen van Mann-Whitney en Dunn moeten worden gecorrigeerd voor multipliciteit en daarbij wordt aanbevolen om de Bonferroni-Holm-correctie te gebruiken.

De meeste aanbevelingen inzake het toetsen van hypotheses en het verifiëren van de aannamen die aan de basis liggen van deze toetsen, worden in OESO (2006) besproken, waarin ook een uitgebreide literatuurlijst is opgenomen.

▼M7

Behandeling van controles wanneer een oplosmiddel wordt gebruikt

Als er een oplosmiddel wordt gebruikt, moeten zowel een verdunningswatercontrole als een oplosmiddelcontrole worden uitgevoerd. De twee controles dienen te worden vergeleken voor elke respons en te worden gecombineerd voor statistische analyse, als er geen significant verschil wordt vastgesteld tussen de controles. Is dat wel het geval, dan dient de oplosmiddelcontrole te worden gebruikt om de NOEC te bepalen of de EC_x te ramen en wordt de watercontrole niet gebruikt. Zie de beperkingen in de geldigheidscriteria (punt 7)

Voor de lengte, het gewicht, het percentage uitgekomen eitjes of sterfte onder de larven of afwijkende larven en de eerste en laatste dag van het uitkomen of het naar boven zwemmen, moet een T-toets of een Mann-Whitney-toets worden gebruikt om de verdunningswatercontrole en de oplosmiddelcontrole te vergelijken bij het significantieniveau van 0,05, waarbij alle dosisgroepen buiten beschouwing worden gelaten. De resultaten van die toetsen moeten worden gerapporteerd.

Groottemetingen (lengte en gewicht)

De waarden voor de lengte en het gewicht van de afzonderlijke vissen kunnen normaal of lognormaal verdeeld zijn. De gemiddelde waarden per replicaat zijn gewoonlijk normaal verdeeld vanwege de centrale limietstelling en bevestigd op basis van gegevens uit meer dan 100 ELS-onderzoeken bij drie zoetwatersoorten. Wanneer de gegevens of de historische gegevensbanken wijzen op een lognormale verdeling van de groottewaarden van de afzonderlijke vissen, kan de gemiddelde logaritme per replicaat van de waarden voor de afzonderlijke vissen worden berekend en kunnen de gegevens voor analyse de antilogaritmen van die gemiddelde replicaatlogaritmen zijn.

De gegevens moeten worden beoordeeld op overeenstemming met een normale verdeling en homogeniteit van variantie. Daartoe dienen de residuen van een ANOVA-model met concentratie als enige verklarende klassevariabele te worden gebruikt. Daarbij kan worden gebruikgemaakt van een visuele bepaling op basis van puntenwolken en histogrammen of stam-en-bladgrafieken. Als alternatief kan ook een formele toets zoals die van Shapiro-Wilk of Anderson-Darling worden gebruikt. De overeenstemming met de homogeniteit van variantie kan worden beoordeeld aan de hand van een visueel onderzoek van dezelfde puntenwolk of formeel op basis van een toets van Levene. Enkel parametrische toetsen (zoals Williams en Dunnett) moeten worden beoordeeld op normaliteit en homogeniteit van variantie.

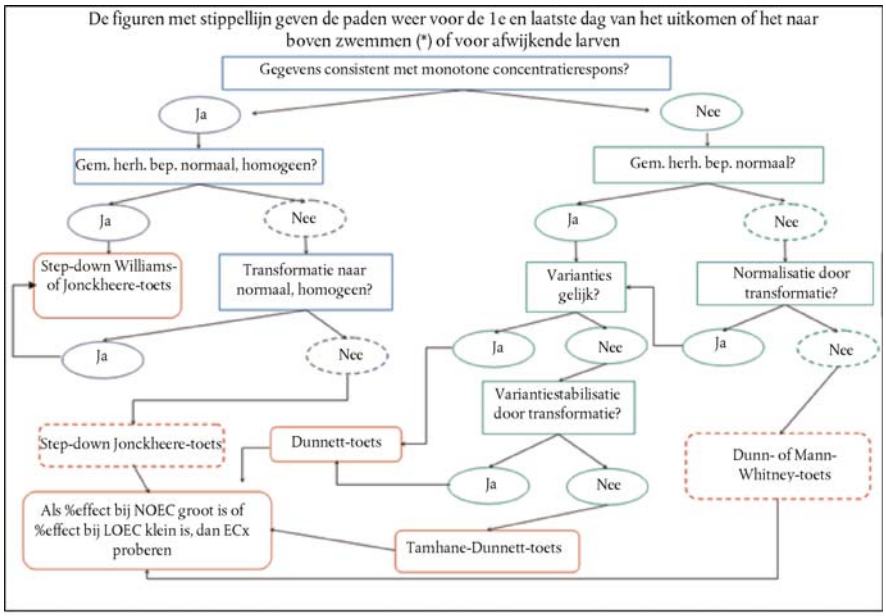
Daarbij moet aandacht worden geschonken aan mogelijke uitschieters en het effect daarvan op de analyse. De uitschieterstoets van Tukey en een visueel onderzoek van de hierboven genoemde puntenwolk met residuen kunnen worden gebruikt. Er zij op gewezen dat de waarnemingen betrekking hebben op volledige replicaten. Het uitsluiten van uitschieters uit de analyse moet dus steeds zorgvuldig worden overwogen.

De statistische toetsen waarbij gebruik wordt gemaakt van de kenmerken van de testopzet en de biologische verwachtingen, zijn trendtoetsen die met stapjes omlaag worden toegepast, zoals die van Williams en Jonckheere-Terpstra. In die toetsen wordt uitgegaan van een monotone concentratierespons, en de gegevens moeten worden beoordeeld op overeenstemming met die aanname. Dat kan visueel gebeuren op basis van een puntenwolk van de replicagemiddelden ten opzichte van de testconcentratie. Het is nuttig om een stuksgewijze lineaire curve over die puntenwolk te leggen waarin de concentratiegemiddelden gewogen naar monstergrootte van het replicaat met elkaar worden verbonden. Als die stuksgewijze curve sterk afwijkt van de monotoniteit, wijst dat erop dat er mogelijk andere toetsen dan trendtoetsen moeten worden gebruikt. Als alternatief kunnen formele toetsen worden gebruikt. Een eenvoudige manier om een formele toets uit te voeren is om lineaire en kwadratische contrasten van de concentratiegemiddelden te berekenen. Als het kwadratische contrast significant is en het lineaire contrast niet, dan kan dat op problemen met de monotoniteit wijzen, die nader moet worden beoordeeld aan de hand van puntenwolken. Wanneer de normaliteit of de homogeniteit van variantie een probleem kan zijn, kunnen die contrasten worden berekend op basis van op rang getransformeerde gegevens. Alternatieve werkwijzen, zoals de monotoniteitstoets van Bartholomew, kunnen worden gebruikt, maar maken het proces complexer.

▼M7

Figuur 2:

NOEC-stroomdiagram groottemetingen (lengte en gewicht)



(*) Deze responsen beantwoorden nooit aan de aannamen voor parametrische analyses of modellen.

Tenzij de gegevens niet stroken met de vereisten voor deze toetsen, wordt de NOEC bepaald door de toets van Williams of Jonckheere-Terpstra met stapjes omlaag toe te passen. OESO (2006) bevat meer informatie over deze procedures. Voor gegevens die niet stroken met de vereisten voor een stap-omlaagtrendtoets, kan de toets van Dunnett of van Tamhane-Dunnett (T3) worden gebruikt. Beide toetsen bevatten een correctie voor multipliciteit. In deze toetsen wordt uitgegaan van normaliteit en, in het geval van Dunnett, ook van homogeniteit van variantie. Indien niet aan die voorwaarden is voldaan, kan de niet-parametrische toets van Dunn worden gebruikt. OESO (2006) bevat meer informatie over al deze toetsen. Figuur 2 geeft een overzicht van hoe kan worden nagegaan welke test de voorkeur geniet.

Aantal uitgekomen eitjes en overlevende larven

Deze gegevens hebben betrekking op de percentages eitjes die uitkomen of larven die overleven in afzonderlijke replicaten. Deze percentages moeten worden beoordeeld op extrabinomiale variantie, wat gebruikelijk maar niet alomtegenwoordig is voor zulke metingen. Het stroomdiagram in figuur 3 kan helpen om de optimale toets te kiezen; zie de tekst voor een gedetailleerde beschrijving.

Er zijn twee toetsen die vaak worden gebruikt: de C(α)-toets van Tarone (Tarone, 1979) en chi-kwadraattoetsen, die elk afzonderlijk op elke testconcentratie moeten worden toegepast. Als er extrabinomiale variantie wordt vastgesteld in minstens één testconcentratie, moeten methoden worden gebruikt die daarmee rekening houden.

Formule 1:

C (α)-toets van Tarone (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

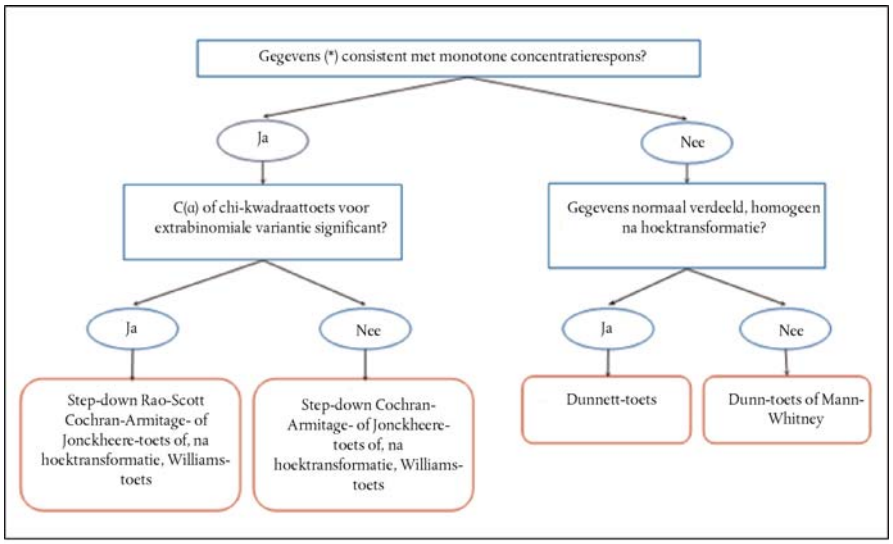
waarbij p het gemiddelde percentage voor een bepaalde concentratie is, **m** het aantal replicaatbakken, $\mathbf{n_j}$ het aantal individuen in replicaat **j**, en $\mathbf{x_j}$ het aantal

▼M7

individuen in dat replicaat die een respons vertonen, hetzij die niet uitgekomen zijn of dood zijn. Deze toets wordt afzonderlijk toegepast op elke concentratie. Deze toets kan worden gezien als een gecorrigeerde chi-kwadraattoets, maar uit beperkte simulaties van het onderscheidend vermogen uitgevoerd door Tarone is gebleken dat zij krachtiger is dan een chi-kwadraattoets.

Figuur 3:

NOEC-stroomdiagram voor uitgekomen eitjes en sterfte onder de larven.



(*) Gegevens hebben betrekking op percentages van het replicaat

Wanneer er geen significante aanwijzingen van extrabinomiale variantie zijn, kan de stap-omlaagtoets van Cochran-Armitage worden gebruikt. Replicaten worden in deze toets buiten beschouwing gelaten, dus wanneer er dergelijke aanwijzingen zijn, wordt de correctie van Rao-Scott op de toets van Cochran-Armitage aanbevolen, die rekening houdt met replicaten, replicaatgrootte en extrabinomiale variantie. Voorbeelden van alternatieve toetsen zijn de stap-omlaagtoetsen van Williams en Jonckheere-Terpstra en de toets van Dunnett, zoals beschreven voor de groottemetingen. Deze toetsen zijn van toepassing ongeacht eventuele extrabinomiale variantie, maar hebben een iets beperkter onderscheidend vermogen (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Eerste of laatste dag van het uitkomen of naar boven zwemmen

De respons is een geheel getal, dat aangeeft op welke dag van de test de aangegeven waarneming wordt waargenomen voor een bepaalde replicaatbak. Het waardenbereik is gewoonlijk erg beperkt, en vaak zijn grote delen van de waarden gelijk, waarbij bv. de eerste dag waarop eitjes uitkomen dezelfde is voor alle controlereplicaten en soms ook voor een of twee lage testconcentraties. Parametrische proeven zoals Williams en Dunnett zijn niet geschikt voor zulke gegevens. Tenzij er aanwijzingen zijn van ernstige niet-monotoniteit, is de stap-omlaagtoets van Jonckheere-Terpstra bijzonder goed in staat om effecten van de teststof te detecteren. Anders kan de proef van Dunn worden gebruikt.

Afwijkingen bij de larven

De respons is het aantal larven dat een of andere afwijking vertoont. Deze respons heeft vaak een lage incidentie en vertoont een aantal soortgelijke problemen als de eerste dag van het uitkomen. Soms is de concentratierespons ook grillig. Als de gegevens op zijn minst ruwweg een monotone concentratievorm volgen, is de stap-omlaagtoets van Jonckheere-Terpstra goed in staat om effecten te detecteren. Anders kan de proef van Dunn worden gebruikt.

▼**M7**

VERWIJZINGEN

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OESO (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, nr. 54. Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, OESO, Parijs.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Aanhangsel 6

STATISTISCHE RICHTSNOEREN VOOR REGRESSIERAMINGEN

Algemene opmerkingen

De waarnemingen die worden gebruikt om een model te passen zijn replicaatgemiddelden (lengte en gewicht) of percentages van het replicaat (uitgekomen eitjes en sterfte onder de larven) (OESO 2006).

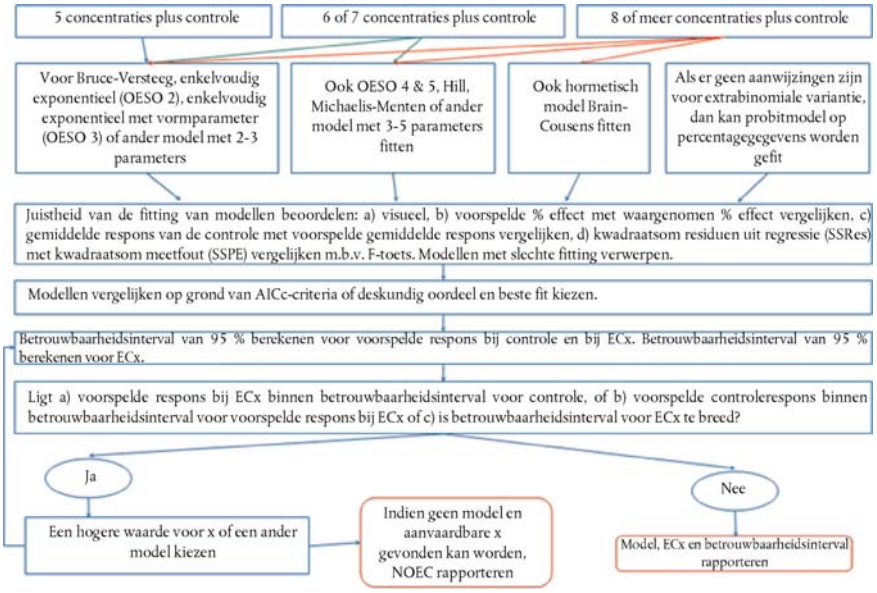
Gewoonlijk wordt aanbevolen om een gewogen regressie te hanteren met de monstergrootte van het replicaat als wegingsfactor. Ook andere weegschema's zijn mogelijk, zoals een weging op basis van de voorspelde gemiddelde respons of een combinatie van die laatste en een weging op basis van de monstergrootte van het replicaat. Weging op basis van reciproque waarden van de variantie binnen de concentratie van de monsters wordt niet aanbevolen (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Bij een eventuele transformatie van de responsen voorafgaand aan de analyse dient de onafhankelijkheid van de waarnemingen te worden bewaard en dienen de EC_x en de betrouwbaarheidslimieten te worden uitgedrukt in de oorspronkelijke meeteenheden, en niet in getransformeerde eenheden. Een verandering met 20 % in de lengtelogaritme is bijvoorbeeld niet gelijk aan een verandering met 20 % in de lengte (Lyles *et.al* 2008, Draper and Smith 1999).

Het stroomdiagram in figuur 4 geeft een overzicht voor EC_x-ramingen. De details zijn beschreven in onderstaande tekst.

Figuur 4:

Stroomdiagram voor EC_x, raming van de gemiddelde lengte voor het replicaat of het percentage uitgekomen eitjes of sterfte onder de larven, zie tekst voor meer informatie.



Overwegingen voor uitgekomen eitjes en sterfte onder de larven

Voor het aantal uitgekomen eitjes en de sterfte onder de larven is het over het algemeen het beste om een aflopend model te passen, tenzij er een probitmodel wordt gepast, zoals hieronder beschreven. Dat wil zeggen dat het percentage eitjes dat niet uitkomt of het percentage larven dat sterft moet worden gemodelleerd. De reden daarvoor is dat EC_x betrekking heeft op een concentratie waarbij er een verandering gelijk aan x % van de gemiddelde controlerespons plaatsvindt. Als 5 % van de eitjes in de controlegroep niet uitkomt en het percentage niet-uitgekomen eitjes wordt gemodelleerd, heeft EC20 betrekking op een concentratie waarbij er een verandering optreedt gelijk aan 20 % van het percentage

▼M7

niet-uitgekomen eitjes in de controlegroep, namelijk 5 %, en dat is een verandering van 0,2*0,05=0,01 of 1 procentpunt in een percentage niet-uitgekomen eitjes van 6 %. Een dergelijke kleine verandering kan niet op een zinvolle manier worden geraamd op basis van de beschikbare gegevens en is niet van biologisch belang. Als daarentegen het percentage eitjes dat uitkomt wordt gemodelleerd, dan zou het controlepercentage in dit voorbeeld 95 % zijn, en komt een verlaging ten opzichte van het controlegemiddelde met 20 % neer op een verandering van 0,95*0,2=0,18, dus van een percentage uitgekomen eitjes van 95 % naar een percentage uitgekomen eitjes van 77 % (= 95-18). Die effectconcentratie kan wel worden geraamd en is naar verwachting van groter belang. Bij groottemetingen is dit geen probleem, hoewel schadelijke effecten voor de grootte gewoonlijk neerkomen op een afname van de grootte.

Modellen voor de grootte (lengte en gewicht) en het percentage uitgekomen eitjes of overlevende larven.

Met uitzondering van het hormetische model van Brain-Cousens zijn al deze modellen beschreven en aanbevolen in OESO (2006). De zogeheten OESO 2-5 worden ook besproken voor ecotoxiciteitstests in Slob (2002). Er zijn natuurlijk nog talrijke andere modellen die nuttig kunnen zijn. In Bunke, *et al*. (1999) worden verschillende modellen opgesomd die hier niet zijn opgenomen, en er zijn ook talrijke modellen te vinden in de verwijzingen. Onderstaande modellen worden voorgesteld omdat zij bijzonder geschikt zouden zijn voor ecotoxiciteitstests en omdat zij gangbaar zijn.

Met 5 testconcentraties plus controle

— Bruce-Versteeg

— Enkelvoudig exponentieel (OESO 2)

— Exponentieel met vormparameter (OESO 3)

— Enkelvoudig exponentieel met ondergrens (OESO 4)

Met 6 of meer testconcentraties plus controle

— Exponentieel met vormparameter en ondergrens (OESO 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Wanneer er zichtbare aanwijzingen zijn van hormese (weinig waarschijnlijk bij de percentages uitgekomen eitjes of overlevende larven, maar wordt soms waargenomen bij groottewaarnemingen)

— Brain-Cousens hormetisch; Brain and Cousens (1989)

Alternatieve modellen voor uitgekomen eitjes en sterfte onder de larven

— Oplopende modellen voor deze responsen kunnen worden gepast met behulp van probitmodellen (of logistische modellen) als er geen aanwijzingen van extrabinomiale variantie zijn en de controle-incidentie is geraamd bij het passen van het model. Dit is niet de methode die de voorkeur verdient, aangezien het individu als analyse-eenheid wordt behandeld, en niet het replicaat (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Geschiktheid van een enkel model

— Waargenomen en voorspelde procentuele daling bij elke testconcentratie visueel vergelijken (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper and Smith 1999).

— De vierkantswortel van de gemiddelde regressiefout vergelijken met de vierkantswortel van de zuivere gemiddelde fout met behulp van een F-toets (Draper and Smith 1999).

— Controleren of elke term in het model significant verschilt van nul (d.w.z. bepalen of alle termen in het model van belang zijn) (Motulsky and Christopoulos 2004).

▼M7

— Puntenwolken van residuen uit regressie vs. testconcentratie, mogelijk op een log(conc)-schaal. Deze puntenwolk mag geen patroon vertonen; de punten moeten willekeurig verspreid zijn rond een horizontale lijn op nulhoogte.

— De gegevens moeten worden beoordeeld op normaliteit en homogeniteit van variantie zoals aangegeven in aanhangsel 5.

— Voorts moet de normaliteit van de residuen over het regressiemodel worden beoordeeld met behulp van de methoden die in aanhangsel 5 zijn vermeld voor de residuen voor ANOVA.

Modellen vergelijken

— Gebruik de AICc-criteria van Akiake. Kleinere AICc-waarden wijzen op een betere passing, en als AICc(B)-AICc(A)≥10, dan is model A nagenoeg altijd beter dan model B (Motulsky and Christopoulos (2004).

— Vergelijk de twee modellen visueel door na te gaan hoe goed zij aan bovenstaande criteria voor een enkel model voldoen.

— Er wordt aanbevolen om het zuinigheidsprincipe te hanteren, waarbij het meest eenvoudige model dat redelijk geschikt is voor de gegevens, wordt gebruikt (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Kwaliteit van de EC_x-raming

Het betrouwbaarheidsinterval (CI) voor EC_x mag niet te ruim zijn. Er moet statistisch worden beoordeeld hoe ruim het betrouwbaarheidsinterval kan zijn zonder dat de ECx zijn nut verliest. Simulaties voor regressiemodellen die geschikt zijn voor het percentage uitgekomen eitjes en gegevens over de grootte wijzen uit dat ongeveer 75 % van de betrouwbaarheidsintervallen voor EC_x (x=10, 20 of 30) slechts twee testconcentraties omvatten. Dat kan als algemene leidraad worden gebruikt voor wat aanvaardbaar is en als praktische leidraad voor wat haalbaar is. Verschillende auteurs vermelden dat betrouwbaarheidsintervallen moeten worden gerapporteerd voor alle modelparameters en dat ruime betrouwbaarheidsintervallen wijzen op onaanvaardbare modellen (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

Het CI voor EC_x (of een andere modelparameter) mag de nul niet omvatten (Motulsky and Christopoulos 2004). Dit is de regressie die gelijk is aan het minimale significante verschil dat vaak wordt genoemd in aanpakken om hypotheses te toetsen (bv. Wang *et al* 2000). Het betrouwbaarheidsinterval voor de gemiddelde responsen bij de LOEC dient ook het controlegemiddelde niet te omvatten. Men dient zich af te vragen of de parameterramingen wetenschappelijk plausibel zijn. Als het betrouwbaarheidsinterval voor y0 ± 20 % is, is er bijvoorbeeld geen EC_{10}-raming plausibel. Als het model een effect van 20 % voorspelt bij concentratie C en het maximale waargenomen effect bij C en lagere concentraties 10 % bedraagt, dan is de EC_{20} niet plausibel (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

EC_x hoort geen extrapolatie te vereisen buiten het bereik van positieve concentraties (Draper and Smith 1999, OESO 2006). Als algemene leidraad kan bijvoorbeeld worden gesteld dat EC_x niet meer mag bedragen dan ongeveer 25 % minder dan de laagste geteste concentratie of meer dan de hoogste geteste concentratie.

VERWIJZINGEN

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, VS.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, blz. 107-121

OESO (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, nr. 54, Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling, OESO, Parijs.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, blz. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. TEST VOOR KORTETERMIJNEFFECTEN OP DE VOORTPLANTING VAN VISSEN

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 229 (2012) van de OESO. De noodzaak om een vistest te ontwikkelen en te valideren waarmee actieve endocriene chemische stoffen kunnen worden gedetecteerd, komt voort uit de bezorgdheid dat de chemicaliënniveaus in het milieu schadelijke effecten kunnen hebben bij mensen en dieren als gevolg van de interactie van deze chemicaliën met het hormoonstelsel. In 1998 is de OESO een actie gestart om bestaande richtsnoeren te herzien en nieuwe richtsnoeren te ontwikkelen voor het screenen en testen op potentiële hormoonontregelaars. Eén onderdeel van de actie was de ontwikkeling van een testrichtsnoer voor het screenen van chemische stoffen die uitwerken op het hormoonstelsel van vissoorten. De test voor kortetermijneffecten op de voortplanting van vissen heeft een uitgebreid validatieprogramma ondergaan, bestaande uit interlaboratoriumstudies met geselecteerde chemische stoffen om de relevantie en betrouwbaarheid aan te tonen van de test voor de detectie van chemische stoffen die van invloed zijn op de voortplanting door middel van verschillende mechanismen, waaronder endocriene middelen (1, 2, 3, 4, 5). Alle eindpunten van de OESO-testrichtsnoer zijn gevalideerd voor de Amerikaanse dikkop-elrits, en een deelverzameling van eindpunten is gevalideerd voor het Japanse rijstvisje (vitellogenine en secundaire geslachtskenmerken) en de zebravis (vitellogenine). De validatiewerkzaamheden zijn collegiaal getoetst door een panel van deskundigen die zijn benoemd door de nationale coördinatoren van het OESO-programma voor testrichtsnoeren (6) en deels door een onafhankelijk panel van deskundigen in opdracht van het United States Environmental Protection Agency (29). De test is niet ontworpen voor de herkenning van specifieke mechanismen van hormonale ontwrichting omdat de proefdieren een intacte hypothalamus-hypofyse-gonade-as (HPG-as) hebben, die kan reageren op chemische stoffen die op verschillende niveaus uitwerken op de HPG-as.

2. Deze testmethode beschrijft een screening in vivo waarbij geslachtsrijpe mannetjes- en kuitschietende vrouwtjesvissen bij elkaar worden gehouden en gedurende een beperkt deel van hun levenscyclus (21 dagen) worden blootgesteld aan een chemische stof. Na afloop van de 21-daagse blootstellingsperiode worden twee biomerker-eindpunten bij de mannetjes en de vrouwtjes gemeten als indicatoren van endocriene activiteit van de teststof; deze eindpunten zijn vitellogenine en secundaire geslachtskenmerken. De vitellogenine wordt gemeten bij de Amerikaanse dikkop-elrits, het Japanse rijstvisje en de zebravis, terwijl de secundaire geslachtskenmerken worden gemeten bij de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje. Daarnaast wordt de kwantitatieve vruchtbaarheid dagelijks bewaakt gedurende de volledige test. De geslachtsklieren worden eveneens geconserveerd en de histopathologie kan worden geëvalueerd om de voortplantingsgeschiktheid van de proefdieren te beoordelen en de bewijskracht van andere eindpunten te ondersteunen.

3. Deze bioassay fungeert als een in-vivoscreeningstest van de voortplanting en de toepassing ervan moet worden gezien in samenhang met het „Conceptueel kader van de OESO voor het testen en beoordelen van hormoonontregelende stoffen” (30). In dit conceptuele kader wordt de test voor kortetermijneffecten op de voortplanting van vissen voorgesteld op niveau 3 als in-vivotest die gegevens moet opleveren over geselecteerde endocriene mechanismen/wegen.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN EN BEPERKINGEN

4. Vitellogenine (VTG) wordt gewoonlijk geproduceerd door de lever van vrouwelijke gewervelde oviparen in reactie op doorstromend endogeen oestrogeen. Vitellogenine is een precursor van eidooierproteïnen en wordt vanuit de lever in de bloedbaan naar het ovarium getransporteerd en daar opgenomen en gemodificeerd door de zich ontwikkelende eitjes. Vitellogenine is vrijwel niet detecteerbaar in het plasma van onvolwassen vrouwtjes- en mannetjesvissen omdat deze over onvoldoende circulerend oestrogeen beschikken; hun lever is echter wel in staat om vitellogenine samen te stellen en af te scheiden in reactie op exogene oestrogeenstimulatie.

▼M7

5. Het meten van vitellogenine dient om chemische stoffen met verschillende oestrogene werkingsmechanismen te detecteren. De detectie van oestrogene chemicaliën is mogelijk door de inductie van vitellogenine in mannetjesvissen te meten en is overvloedig gedocumenteerd in de collegiaal getoetste wetenschappelijke literatuur (bijvoorbeeld (7)). Vitellogenine-inductie is ook aangetoond na blootstelling aan aromatiseerbare androgenen (8, 9). Een vermindering in het circulatieniveau van oestrogenen bij vrouwtjes, bijvoorbeeld door de remming van de aromatase die het endogene androgeen omzet in het natuurlijke oestrogeen 17β-estradiol, veroorzaakt een afname van het VTG-niveau, dat wordt gebruikt om chemicaliën met aromatase-remmende eigenschappen te detecteren (10, 11). De biologische relevantie van de vitellogeninereactie na remming van oestrogenen/aromatase is vastgesteld en ruimschoots gedocumenteerd. Mogelijk wordt de productie van VTG bij vrouwtjes echter ook beïnvloed door algemene toxiciteit en niet-endocriene toxische werkingsmechanismen, bijvoorbeeld hepatotoxiciteit.

6. Er zijn verschillende meetmethoden ontwikkeld en gestandaardiseerd voor routinegebruik. Dit is het geval bij soortspecifieke methoden van Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) waarbij gebruik wordt gemaakt van immunochemie voor de kwantificering van VTG die wordt geproduceerd in kleine bloed- of levermonsters van afzonderlijke vissen (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Voor de VTG-meting worden bloedmonsters van de Amerikaanse dikkop-elrits, bloedmonsters of een kop-/staarthomogenaat van de zebravis, en levermonsters van het Japanse rijstvisje genomen. Bij het rijstvisje is er een goede correlatie tussen de in het bloed en in de lever gemeten VTG (19). In aanhangsel 6 worden de aanbevolen procedures voor monsterneming ten behoeve van VTG-analyse beschreven. Uitrustingen voor het meten van VTG zijn op grote schaal beschikbaar. Dergelijke uitrustingen moeten zijn gebaseerd op een gevalideerde soortspecifieke ELISA-methode.

7. Secundaire geslachtskenmerken van bepaalde soorten mannetjesvissen zijn extern zichtbaar en kwantificeerbaar, en reageren op circulatieniveaus van endogene androgenen. Dit geldt voor de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje, maar niet voor de zebravis, die geen kwantificeerbare secundaire geslachtskenmerken heeft. Vrouwtjes behouden de mogelijkheid om mannelijke secundaire geslachtskenmerken te ontwikkelen wanneer ze worden blootgesteld aan androgene chemicaliën in water. Er bestaan in de wetenschappelijke literatuur verscheidene studies waarin dit type reactie is gedocumenteerd bij de Amerikaanse dikkop-elrits (20) en het Japanse rijstvisje (21). Een afname van de secundaire geslachtskenmerken bij mannetjes moet met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd vanwege het geringe statistische onderscheidingsvermogen en dient te worden gebaseerd op het oordeel van deskundigen en het gewicht van het bewijs. De bruikbaarheid van zebravissen in deze test is beperkt in verband met het ontbreken van kwantificeerbare secundaire geslachtskenmerken die reageren op androgeen werkende chemische stoffen.

8. Bij de Amerikaanse dikkop-elrits is de voornaamste indicator van exogene androgene blootstelling het aantal nuptiale papillen op de bek van het vrouwtje. Bij het Japanse rijstvisje vormt het aantal papillaire uitsteeksels de voornaamste aanwijzing voor exogene blootstelling aan androgene chemicaliën bij de vrouwtjesvis. In aanhangsels 5A en 5B worden de procedures aanbevolen die moeten worden gevolgd voor de evaluatie van geslachtskenmerken bij respectievelijk de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje.

9. Bij deze 21 dagen durende test bij vissen wordt de kwantitatieve eiproductie beoordeeld en worden de geslachtsklieren geconserveerd om de histopathologie optimaal te kunnen onderzoeken. Sommige regelgevingsinstanties kunnen dit aanvullend eindpunt voorschrijven met het oog op een vollediger beoordeling van de voortplantingsgeschiktheid van de proefdieren of in gevallen waarin vitellogenine en secundaire geslachtskenmerken geen respons vertoonden op blootstelling aan de chemische stof. Hoewel sommige eindpunten erg diagnostisch kunnen zijn (bv. VTG-inductie bij mannetjes en papilvorming bij vrouwtjes), zijn niet alle eindpunten in de test (bv. vruchtbaarheid en histopathologie van de geslachtsklieren) bedoeld om specifieke werkingsmechanismen op celniveau onomstotelijk te identificeren. De reeks eindpunten maakt het als geheel veeleer mogelijk om conclusies te formuleren over mogelijke hormoonontregelingen en kan zo richtsnoeren opleveren

▼M7

voor verdere tests. Hoewel de vruchtbaarheid niet specifiek hormoongebonden is, is het vanwege de aangetoonde gevoeligheid voor endocrien actieve chemische stoffen (5) een belangrijk eindpunt om op te nemen in de test. Wanneer de vruchtbaarheid en andere eindpunten niet worden beïnvloed, kan immers met meer vertrouwen worden gesteld dat een verbinding naar alle waarschijnlijkheid niet endocrien actief is. Wordt de vruchtbaarheid echter wel beïnvloed, dan zal dat sterk bijdragen tot conclusies binnen een weight-of-evidence-benadering. Verderop in deze testmethode zijn richtsnoeren beschreven voor de interpretatie van de gegevens en de aanvaarding van de testresultaten.

10. De in deze testmethode gebruikte definities staan in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

11. In deze test worden mannetjes- en vrouwtjesvissen in geslachtsrijpe staat samen blootgesteld in testbakken. Hun volwassen en geslachtsrijpe staat maakt een duidelijk onderscheid naar sekse en daardoor een sekse-afhankelijke analyse van elk eindpunt mogelijk, en waarborgt hun gevoeligheid voor exogene chemische stoffen. Aan het eind van de test wordt het geslacht bevestigd door macroscopisch onderzoek van de geslachtsklieren na opening van het onderlijf aan de buikzijde met een schaar. Een overzicht van de toepasselijke bioassay-omstandigheden staat in aanhangsel 2. De test wordt gewoonlijk begonnen met vissen die als steekproef zijn genomen uit een populatie die tot kuitschieten in staat is; oudere dieren moeten niet worden gebruikt. Richtsnoeren voor de leeftijd van de vissen en hun reproductieve status worden gegeven in het onderdeel over de selectie van vissen. De test wordt uitgevoerd met drie concentraties van blootstelling aan chemicaliën en een controlegroep in water, alsook, indien nodig, een controlegroep in een oplossing. Voor de zebravis worden twee bakken of replicaten per behandeling gebruikt (waarbij elke bak 5 mannetjes en 5 vrouwtjes bevat). Voor de Amerikaanse dikkop-elrits worden vier bakken of replicaten per behandeling gebruikt (waarbij elke bak 2 mannetjes en 4 vrouwtjes bevat). Deze indeling is aangepast aan het territoriumgedrag van het dikkop-elritsmannetje en waarborgt tevens voldoende onderscheidend vermogen. Voor het Japans rijstvisje worden vier bakken of replicaten per behandeling gebruikt (waarbij elke bak 3 mannetjes en 3 vrouwtjes bevat). De blootstelling vindt plaats gedurende 21 dagen en de monsters van de vissen worden genomen op dag 21 van de blootstelling. De kwantitatieve vruchtbaarheid wordt dagelijks bewaakt.

12. Bij de monsterneming op dag 21 worden alle dieren op humane wijze gedood. Secundaire geslachtskenmerken worden gemeten bij de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje (zie aanhangsels 5A en 5B); bloedmonsters worden genomen voor de vaststelling van VTG bij de zebravis en de Amerikaanse dikkop-elrits, als alternatief kan de kop/staart worden genomen voor de vaststelling van VTG bij de zebravis (aanhangsel 6); voor de VTG-analyse van het Japanse rijstvisje wordt de lever uitgenomen (aanhangsel 6); de geslachtsklieren worden in hun geheel of ontleed gefixeerd voor een eventuele histopathologische beoordeling (22).

AANVAARDBAARHEIDSCRITERIA VOOR DE TEST

13. De uitkomsten van de test zijn alleen aanvaardbaar als aan de onderstaande voorwaarden wordt voldaan:

— het sterftecijfer in de controlegroepen in water (oplosmiddel) mag aan het eind van de blootstellingsperiode niet hoger zijn dan 10 procent;

— het gehalte aan opgeloste zuurstof moet gedurende de gehele blootstellingsperiode minimaal 60 procent van de verzadigingswaarde van lucht zijn geweest;

— het verschil in watertemperatuur tussen de testbakken mag op geen enkel moment tijdens de blootstellingsperiode groter zijn dan ± 1,5 °C. Tevens mag de watertemperatuur niet meer dan 2 °C hoger of lager zijn dan het temperatuurbereik dat voor de vissoort wordt gespecificeerd (aanhangsel 2);

— er moet bewijs beschikbaar zijn waaruit blijkt dat de gehalten aan teststof in de oplossing binnen ± 20 % van de gemiddelde gemeten waarden zijn gehouden.

▼M7

— voordat met de blootstelling aan de chemische stof wordt gestart en in de controlereplicaten tijdens de test moeten er aanwijzingen zijn dat de vissen actief kuitschieten in alle replicaten.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

14. Standaardlaboratoriumapparatuur, met name:

a. zuurstof- en pH-meters;

b. apparatuur voor het bepalen van de hardheid en alkaliteit van water;

c. geschikte apparatuur voor de temperatuurregeling en bij voorkeur ook voor continue bewaking;

d. bakken van chemisch inert materiaal met een inhoud die geschikt is voor de aanbevolen densiteit en bezettingsgraad (zie aanhangsel 2);

e. kuitsubstraat voor de Amerikaanse dikkop-elrits en de zebravis (zie aanhangsel 4 voor de nodige details);

f. weegschaal met een toereikende nauwkeurigheid (d.w.z. nauwkeurig tot op ± 0,5 mg).

Water

15. Water waarin de gekozen testsoort langdurig kan overleven en groeien is geschikt als testwater. Gedurende de testperiode moet de waterkwaliteit constant zijn. De pH-waarde moet binnen een bereik van 6,5 tot 8,5 blijven, maar tijdens een test mag deze niet meer dan ± 0,5 pH-eenheden schommelen. Om ervoor te zorgen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexvorming met de teststof), moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd en Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} en SO_4^{2-}), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld het totaalgehalte aan organofosforpesticiden en het totaalgehalte aan organochloorpesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit gedurende ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar. In aanhangsel 3 worden enkele chemische kenmerken van aanvaardbaar verdunningswater vermeld.

Testoplossingen

16. De testoplossingen met de gekozen concentraties worden bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren of met ultrasone trillingen). Voor het maken van een stamoplossing van een passende concentratie kunnen verzadigingskolommen (oplosbaarheidskolommen) worden gebruikt. Het gebruik van een draagvloeistof wordt niet aanbevolen. Indien echter een oplosmiddel noodzakelijk is, moet gelijktijdig een controletest met het oplosmiddel worden uitgevoerd, met dezelfde oplosmiddelconcentratie als voor de chemische behandelingen wordt gebruikt. Voor moeilijk te testen stoffen kan een oplosmiddel uit technisch oogpunt de beste keuze zijn; raadpleeg hiervoor de OESO-leidraad voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (23). De keuze van het juiste oplosmiddel hangt af van de chemische eigenschappen van de stof of het mengsel. In de OESO-leidraad wordt een maximum van 100 µl/l aanbevolen, dat in acht dient te worden genomen. In een recente bespreking (24) worden echter aanvullende bedenkingen geuit over het gebruik van oplosmiddelen voor het testen van endocriene activiteit. Derhalve wordt aanbevolen de oplosmiddelconcentratie, indien nodig, tot het minimum te beperken als dit technisch uitvoerbaar is (afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van de teststof).

▼M7

17. Er moet gebruik worden gemaakt van een doorstroomtestsysteem. Een dergelijk systeem verdeelt en verdunt continu de stamoplossing van de teststof (bijvoorbeeld met een doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning of saturatorsysteem) om ervoor te zorgen dat de testkamers de juiste testconcentratie krijgen toegediend. De stroomsnelheid van de stamoplossingen en het verdunningswater moet regelmatig, bij voorkeur dagelijks, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Er moet goed op worden gelet dat het gebruik van laagwaardige plastic slangen en andere materialen die biologisch actieve chemicaliën kunnen bevatten, worden vermeden. Bij de keuze van het materiaal voor het doorstroomsysteem moet rekening worden gehouden met mogelijke adsorptie van de teststof aan dit materiaal.

Leefomstandigheden van de vis

18. De testvissen moeten worden geselecteerd uit een laboratoriumpopulatie, bij voorkeur van één stam, die bij het begin van de test minimaal twee weken gehouden is onder omstandigheden die qua waterkwaliteit en verlichting overeenkomen met die tijdens de test. Het is van belang dat de densiteit en de bezettingsgraad (zie voor definities aanhangsel 1) worden afgestemd op de gekozen vissoort (zie aanhangsel 2).

19. Na een aanpassingsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast:

— sterfte groter dan 10 % van de populatie in zeven dagen: de hele partij wordt afgekeurd;

— sterfte tussen 5 % en 10 % van de populatie: acclimatisering gedurende nog zeven dagen; als de sterfte gedurende deze zeven dagen hoger dan 5 % is, wordt de gehele partij afgekeurd;

— sterfte minder dan 5 % van de populatie binnen zeven dagen: de gehele partij wordt geaccepteerd.

20. Vissen mogen tijdens de acclimatiseringsperiode, de pre-blootstellingsperiode of de blootstellingsperiode niet worden behandeld voor ziekten.

Pre-blootstellingsperiode en selectie van de vissen

21. Aanbevolen wordt de dieren gedurende een pre-blootstellingsperiode van één à twee weken in bakken te houden die soortgelijk zijn aan de testbakken. De vissen kunnen tijdens deze periode en de blootstellingsfase naar believen worden gevoederd. De blootstellingsfase begint met seksueel dimorfe volwassen vissen uit een laboratoriumaanbod van geslachtsrijpe dieren (bijvoorbeeld met duidelijk zichtbare secundaire geslachtskenmerken bij de Amerikaanse dikkop-elrits en het Japanse rijstvisje) die actief kuitschieten. Slechts als algemene richtsnoer (niet toe te passen zonder aandacht te schenken aan de feitelijke reproductieve status van een gegeven partij vissen) geldt dat Amerikaanse dikkop-elritsen ongeveer 20 (± 2) weken oud moeten zijn, aangenomen dat ze hun hele leven zijn gehouden bij 25 ± 2 °C. Japanse rijstvisjes moeten ongeveer 16 (± 2) weken oud zijn, aangenomen dat ze hun hele leven zijn gehouden bij 25 ± 2 °C. Zebravissen moeten ongeveer 16 (± 2) weken oud zijn, aangenomen dat ze hun hele leven zijn gehouden bij 26 ± 2 °C. De eiproductie moet dagelijks worden beoordeeld tijdens de periode voorafgaand aan de blootstelling. Er wordt aanbevolen om te wachten tot de vissen in alle replicaatbakken kuitschieten, voordat zij in de blootstellingsfase van de test worden opgenomen. Er kan in deze fase geen kwantitatief richtsnoer worden gegeven voor de wenselijke dagelijkse eiproductie, maar gemiddelde broedsels van > 10 eitjes/vrouwtje/per dag zijn relatief gebruikelijk voor alle soorten. Er moet een willekeurige blokopzet volgens de resultaten voor de eiproductie worden gehanteerd om replicaten toe te wijzen aan de verschillende testniveaus.

▼M7

TESTOPZET

22. Er wordt gebruikgemaakt van drie concentraties van de teststof, één controletest (met water) en indien nodig één controletest met oplosmiddel. De gegevens kunnen worden geanalyseerd om statistisch significante verschillen vast te stellen tussen de reacties op behandeling en op de controles. Deze analyses brengen aan het licht of nadere langdurige tests op schadelijke effecten (op het gebied van overleven, ontwikkeling, groei en voortplanting) eerder nodig zijn voor de teststof dan voor gebruik ten behoeve van risicobeoordeling (25).

23. Voor de zebravis worden op dag 21 van het experiment mannetjes en vrouwtjes van elke behandelingsconcentratie (5 mannetjes en 5 vrouwtjes in elk van beide duplo's) en van de controlegroep(en) genomen voor het meten van de vitellogenine. Voor het Japanse rijstvisje worden op dag 21 van het experiment mannetjes en vrouwtjes van elke behandelingsconcentratie (3 mannetjes en 3 vrouwtjes in elk van de vier duplo's) en van de controlegroep(en) genomen voor het meten van de vitellogenine en de secundaire geslachtskenmerken. Voor de Amerikaanse dikkop-elrits worden op dag 21 van de blootstelling mannetjes en vrouwtjes (2 mannetjes en 4 vrouwtjes in elk van de vier duplo's) en van de controlegroep(en) genomen voor het meten van de vitellogenine en de secundaire geslachtskenmerken. Een kwantitatieve beoordeling van de vruchtbaarheid is nodig, en de geslachtsklierweefsels dienen in hun geheel of ontleed te worden gefixeerd voor een eventuele histopathologische beoordeling, indien die noodzakelijk zou zijn.

Selectie van testconcentraties

24. Voor de doeleinden van deze test moet de hoogste testconcentratie worden ingesteld op de laagste van de volgende waarden: de maximale toegelaten concentratie (MTC), die wordt bepaald met een dosisbereikstest of op basis van andere toxiciteitsgegevens, 10 mg/l of de maximale oplosbaarheid in water. De MTC is gedefinieerd als de hoogste testconcentratie van de teststof die tot minder dan 10 % sterfte leidt. In deze benadering wordt ervan uitgegaan dat er empirische gegevens over acute toxiciteit of andere toxiciteitsgegevens bestaan op basis waarvan de MTC kan worden geschat. Omdat de schatting van de MTC onnauwkeurig kan zijn is een deskundig oordeel normaliter noodzakelijk.

25. Drie testconcentraties met een constante tussenliggende factor van maximaal 10, en een verdunningswatercontrole (en indien nodig een oplosmiddelcontrole), zijn verplicht. Aanbevolen wordt een bereik van tussenliggende factoren van 3,2 tot 10.

PROCEDURE

Selectie en weging van de testvissen

26. Het is belangrijk om de variatie in het gewicht van de vissen aan het begin van de test zoveel mogelijk te beperken. In aanhangsel 2 worden geschikte gewichtbereiken aangegeven voor de verschillende vissoorten die worden aanbevolen voor deze test. Voor de gehele partij vissen die in deze test wordt gebruikt, geldt dat het bereik van het afzonderlijke gewicht van mannetjes en vrouwtjes aan het begin van de test indien mogelijk binnen ± 20 % van het rekenkundig gemiddelde van het betreffende geslacht moet worden gehouden. Het verdient aanbeveling om voorafgaande aan de test een steekproef te nemen om het gemiddelde gewicht te bepalen.

Blootstellingsomstandigheden

Duur

27. De test duurt 21 dagen, volgend op een pre-blootstellingsperiode. De aanbevolen pre-blootstellingsperiode is één à twee weken.

Voeding

28. De vissen dienen naar believen voldoende te worden gevoederd met passende voeding (aanhangsel 2) om hun lichamelijke conditie op peil te houden. Bacteriegroei en troebelheid van het water moeten zoveel mogelijk worden voorkomen. Als algemene richtsnoer geldt dat de dagelijkse hoeveelheid voeder kan worden verdeeld in twee of drie gelijke porties voor

▼M7

meer dan één voeding per dag, met ten minste drie uur tijd tussen elke voeding. Eén grotere portie is ook aanvaardbaar, met name tijdens weekeinden. De vissen dienen niet gevoederd te worden gedurende de 12 uur voorafgaande aan de monsterneming/necropsie.

29. Het visvoeder dient te worden gecontroleerd op de aanwezigheid van verontreinigende stoffen zoals organochloorpesticiden, polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en polychloorbifenylen (PCB's). Voeder met een verhoogd gehalte aan fyto-oestrogenen die de testreactie op een bekende oestrogeenagonist (bv. 17b-oestradiol) kunnen verstoren, dient te worden vermeden.

30. Ongebruikt voeder en fecaal materiaal moet ten minste tweemaal per week uit de testbakken worden verwijderd, bijvoorbeeld door de bodem van elke tank zorgvuldig te reinigen met een hevel.

Licht en temperatuur

31. De fotoperiode en watertemperatuur moeten worden afgestemd op de gekozen vissoort (zie aanhangsel 2).

Frequentie van de analytische bepalingen en metingen

32. Voor aanvang van de blootstellingsperiode moet de juiste werking van het afgiftesysteem van de teststof zijn gewaarborgd. Alle noodzakelijke analysemethoden moeten zijn vastgesteld, inclusief voldoende kennis over de chemische stabiliteit in het testsysteem. Tijdens de test worden de concentraties van de teststof regelmatig als volgt gemeten: de stroomsnelheid van het verdunningswater en de toxische stamoplossing moet bij voorkeur dagelijks, maar minimaal tweemaal per week, worden gecontroleerd en mag gedurende de gehele test hooguit 10 % afwijken. Het is raadzaam de feitelijke concentraties van de teststof in alle bakken bij aanvang van de test en vervolgens met wekelijkse tussenpozen te meten.

33. Het is wenselijk de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Indien de concentratie van de teststof in de oplossing gedurende de gehele test goed binnen een marge van ± 20 % van de nominale concentratie is gehouden, mogen de resultaten echter worden gebaseerd op nominale of gemeten waarden.

34. Monsters moeten mogelijk worden gefilterd (bijvoorbeeld met een poriëngrootte van 0,45 μm) of gecentrifugeerd. Indien nodig verdient centrifugeren de voorkeur. Als het testmateriaal echter niet aan filters adsorbeert, is filtratie mogelijk een geschikt alternatief.

35. In de loop van de test moet het gehalte aan opgeloste zuurstof, de temperatuur en de pH in alle testbakken ten minste één keer per week worden gemeten. De totale hardheid en alkaliteit moeten ten minste één keer per week worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in één bak met de hoogste concentratie teststof. De temperatuur moet bij voorkeur in ten minste één testbak continu worden gecontroleerd.

Opmerkingen

36. In de loop van de test of na afloop van de test worden een aantal reacties (bijvoorbeeld overleven) en biologische reacties (bijvoorbeeld de VTG-niveaus) bepaald. De kwantitatieve vruchtbaarheid moet dagelijks worden bewaakt. Meting en beoordeling van deze eindpunten worden hierna beschreven.

Overleven

37. De vissen moeten gedurende de test dagelijks worden onderzocht. De sterfte moet worden geregistreerd en de dode vissen moeten zo snel mogelijk worden verwijderd. Dode vissen mogen noch in de controle- noch in de behandelbakken worden vervangen. Het geslacht van de vissen die tijdens de test sterven, moet worden vastgesteld door macroscopisch onderzoek van de geslachtsklieren.

▼M7

Gedrag en uiterlijk

38. Elke vorm van afwijkend gedrag (ten opzichte van de controlegroepen) moet worden genoteerd. Dit kan zich uitstrekken tot tekenen van algemene toxiciteit waaronder hyperventilatie, ongecoördineerd zwemmen, evenwichtsverlies en atypisch(e) onbeweeglijkheid of eetgedrag. In aanvulling hierop moeten ook externe afwijkingen (zoals bloedingen, ontkleuring) worden genoteerd. Dergelijke tekenen van toxiciteit dienen bij de interpretatie van de gegevens zorgvuldig in beschouwing te worden genomen, omdat ze kunnen duiden op concentraties waarbij biomerkers van endocriene activiteit niet meer betrouwbaar zijn. Dergelijke gedragswaarnemingen kunnen ook bruikbare kwalitatieve informatie opleveren voor mogelijke vistestvoorschriften in de toekomst. Zo is bijvoorbeeld agressief territoriumgedrag waargenomen bij normale mannetjes of gemasculiniseerde vrouwtjes van Amerikaanse dikkop-elritsen bij blootstelling aan androgenen; bij zebravissen wordt het kenmerkende paar- en paaigedrag na zonsopgang verminderd of verstoord door blootstelling aan oestrogenen of antiandrogenen.

39. Omdat sommige aspecten van het uiterlijk (vooral de kleur) bij behandeling snel kunnen veranderen, is het van belang dat kwalitatieve waarnemingen worden genoteerd voordat dieren uit het testsysteem worden gehaald. De ervaringen die tot nu toe met Amerikaanse dikkop-elritsen zijn opgedaan, duiden erop dat sommige endocrien actieve stoffen in eerste instantie veranderingen in de volgende externe kenmerken teweeg kunnen brengen: lichaamskleur (licht of donker), kleurpatronen (aanwezigheid van verticale banen) en lichaamsvorm (kop en borstregio). Er dienen derhalve tijdens de test en aan het einde van het onderzoek waarnemingen te worden genoteerd over het fysieke voorkomen van de vissen.

Vruchtbaarheid

40. Er moeten dagelijks kwantitatieve waarnemingen worden geregistreerd per replicaat. De eiproductie moet worden geregistreerd als aantal eitjes/overlevend vrouwtje/dag, per replicaat. De eitjes worden dagelijks uit de testkamers gehaald. Voor de Amerikaanse dikkop-elrits en de zebravis moeten de kuitsubstraten in de testkamer worden geplaatst, opdat de vissen in normale omstandigheden kuit kunnen schieten. Aanhangsel 4 bevat meer informatie over de aanbevolen kuitsubstraten voor de zebravis (aanhangsel 4A) en de Amerikaanse dikkop-elrits (aanhangsel 4B). Voor het Japanse rijstvisje wordt het niet noodzakelijk geacht om in een kuitsubstraat te voorzien.

Op humane wijze doden van de vissen

41. Op dag 21, d.w.z. bij beëindiging van de blootstelling, dienen de vissen te worden geëuthanaseerd met passende hoeveelheden tricaïne (tricaïne-methaansulfonaat, metacaïne, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l gebufferd met 300 mg/l $NaHCO_3$ (natriumbicarbonaat, CAS.144-55-8)) ter vermindering van slijmvliesirritatie; vervolgens worden bloed- of weefselmonsters genomen om het VTG-niveau te bepalen, zoals toegelicht in het onderdeel over vitellogenine.

Waarneming van secundaire geslachtskenmerken

42. Sommige endocrien actieve stoffen kunnen tot veranderingen leiden in bepaalde secundaire geslachtskenmerken (aantal nuptiale papillen bij het mannetje van de Amerikaanse dikkop-elrits, papillaire uitsteeksels bij het mannetje van het Japanse rijstvisje). Met name stoffen met bepaalde werkingsmechanismen kunnen een abnormaal optreden van secundaire geslachtskenmerken veroorzaken bij dieren van de andere sekse. Zo kunnen androgene receptoragonisten, zoals trenbolon, methyltestosteron en dihydrotestosteron, tot gevolg hebben dat vrouwelijke dikkop-elritsen geprononceerde nuptiale papillen ontwikkelen of dat vrouwelijke rijstvisjes papillaire uitsteeksels ontwikkelen (11, 20, 21). Ook is beschreven dat oestrogene receptoragonisten het aantal nuptiale papillen en de grootte van de dorsale nekverdikking bij volwassen mannetjes van de Amerikaanse dikkop-elrits kunnen verminderen (26, 27). Dergelijke morfologische waarnemingen kunnen bruikbare kwalitatieve en kwantitatieve informatie opleveren voor mogelijke vistestvoorschriften in de toekomst. Het aantal en de grootte van nuptiale papillen bij Amerikaanse dikkop-elritsen en papillaire uitsteeksels bij Japanse rijstvisjes

▼M7

kunnen hetzij direct, hetzij meer praktisch bij geconserveerde specimina worden gekwantificeerd. De aanbevolen procedures voor de beoordeling van secundaire geslachtskenmerken bij Amerikaanse dikkop-elritsen en Japanse rijstvisjes zijn respectievelijk beschikbaar in aanhangsel 5A en aanhangsel 5B.

Vitellogenine (VTG)

43. Er wordt bloed afgenomen uit de staartader of -slagader met een geheparineerd microhematocriet capillair buisje, of door een hartpunctie met een injectiespuit. Afhankelijk van de grootte van de vissen lopen de af te nemen hoeveelheden bloed gewoonlijk uiteen van 5 tot 60 µl per stuk voor Amerikaanse dikkop-elritsen en van 5 tot 15 µl per stuk voor zebravissen. Het plasma wordt van het bloed gescheiden door middel van centrifuge en bij -80 °C bewaard met een proteaseremmer totdat het wordt onderzocht op VTG. Als alternatief wordt bij Japanse rijstvisjes de lever gebruikt en kan bij zebravissen het kop-/staarthomogenaat worden gebruikt als weefselbron voor de bepaling van VTG (aanhangsel 6). De VTG-meting moet zijn gebaseerd op een gevalideerde homologe ELISA-methode met homologe VTG-norm en homologe antilichamen. Aanbevolen wordt een methode te gebruiken waarmee VTG-niveaus kunnen worden gemeten van slechts een paar ng/ml plasma (of ng/mg weefsel), dat wil zeggen het basisniveau bij niet-blootgestelde mannetjesvissen.

44. De kwaliteitscontrole van de VTG-analyse wordt verricht door het gebruik van normen, blanco-bepalingen en ten minste analyse in duplo. Voor elke ELISA-methode moet het matrixeffect (effect van de verdunning van het monster) worden getest om de minimale verdunningsfactor per monster te bepalen. Elke ELISA-plaat die voor VTG-analyses wordt gebruikt, dient de volgende kwaliteitscontrolemonsters te bevatten: ten minste 6 kalibratienormen die het bereik van de verwachte VTG-concentraties bestrijken en ten minste één assayblanco met niet-specifieke binding (in duplo geanalyseerd). De absorptie van deze blanco's moet minder bedragen dan 5 % van de maximale absorptie volgens de kalibratienorm. Er worden ten minste twee aliquots (tankduplicaten) van elk verdunningsmonster geanalyseerd. Tankduplicaten die meer dan 20 % verschillen, dienen opnieuw te worden geanalyseerd.

45. De correlatiecoëfficiënt (R^2) voor kalibratiecurves moet groter zijn dan 0,99. Een hoge correlatie is echter niet voldoende om een toereikende voorspelling van de concentratie in het gehele bereik te waarborgen. Behalve dat de correlatie voor de kalibratiecurve voldoende hoog moet zijn, moet de concentratie van elke norm, zoals berekend vanuit de kalibratiecurve, altijd tussen 70 en 120 % van de nominale concentratie van die norm vallen. Als de nominale concentraties gaan afwijken van de kalibratieregressielijn (bijvoorbeeld bij lagere concentraties), kan het noodzakelijk zijn de kalibratiecurve te splitsen in een laag en een hoog bereik of een non-lineair model toe te passen dat past bij de absorptiegegevens. Als de curve wordt gesplitst, moet voor beide lijnsegmenten gelden dat $R^2 > 0{,}99$.

46. De detectiegrens wordt gedefinieerd als de concentratie van de laagste analysenorm en de kwantificeringsgrens als de concentratie van de laagste analysenorm vermenigvuldigd met de laagste verdunningsfactor.

47. Op elke dag dat er VTG-tests worden uitgevoerd, wordt een verrijkt monster geanalyseerd dat is gemaakt volgens een testonafhankelijke referentienorm (aanhangsel 7). De verhouding tussen de verwachte concentratie en de gemeten concentratie wordt gerapporteerd samen met de resultaten van elke set tests die op die dag is uitgevoerd.

Evaluatie van de histopathologie van de geslachtsklieren

48. De regelgevingsinstanties kunnen voorschrijven dat een histopathologisch onderzoek van de geslachtsklieren wordt verricht om het doelorgaan op de HPG-as te bestuderen na blootstelling aan de chemische stof. Daartoe worden de geslachtsklieren in hun geheel of ontleed gefixeerd. Als er een histopathologisch onderzoek nodig is, zal bij de beoordeling van de endocriene

▼M7

activiteit van de teststof worden gekeken naar specifieke hormoongebonden effecten op de geslachtsklieren. Voorbeelden van deze diagnostische responsen zijn de aanwezigheid van testisoöcyten, hyperplasie van de cellen van Leydig, verminderde dooiervorming, verhoogde spermatogonia en perifolliculaire hyperplasie. Andere letsels van de geslachtsklieren, zoals atresie van de oöcyten, degeneratie van de testes en stadiaveranderingen, kunnen verschillende oorzaken hebben. De leidraad voor het histopathologisch onderzoek van de geslachtsklieren van vissen bevat procedures die worden gebruikt bij de ontleding, fixatie, verdeling en histopathologische beoordeling van de geslachtsklieren (22).

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Evaluatie van biomerkerreacties door variantieanalyse

49. Om mogelijke activiteit van een stof te constateren, worden de reacties van behandel- en controlegroepen vergeleken met behulp van variantieanalyse. Wanneer een oplosmiddelcontrole wordt gebruikt, moet een passende statistische test worden uitgevoerd op het verdunningswater en de oplosmiddelcontroles voor elk eindpunt. Richtsnoeren voor de behandeling van gegevens over verdunningswater en oplosmiddelcontroles in de daaropvolgende statistische analyse zijn te vinden in het OESO-document over actuele benaderingen van de statistische analyse van milieugiftigheidsgegevens (OESO 2006c) (28). Alle gegevens over biologische reacties moeten worden geanalyseerd en gerapporteerd naar geslacht. Als niet wordt voldaan aan de vereiste voorwaarden voor parametermethoden — niet-normale verdeling (bijvoorbeeld de test van Shapiro-Wilk) of heterogene variantie (test van Barlett of test van Levene) — moet worden overwogen om de gegevens te transformeren om varianties te homogeniseren alvorens de variantieanalyse of een gewogen variantieanalyse uit te voeren. De (parametrische) test van Dunnett op meerdere paarsgewijze vergelijkingen of een (niet-parametrische) Mann-Whitneytest met Bonferroni-correctie kan worden gebruikt voor een niet-monotone dosisrespons. Andere statistische tests zijn mogelijk (bijvoorbeeld die van Jonckheere-Terpstra of van Williams) als de dosisrespons bij benadering monotoon is. In aanhangsel 8 wordt een statistisch stroomdiagram gepresenteerd dat kan helpen bij de keuze voor het gebruik van de meest geschikte statistische test. Aanvullende informatie is ook te vinden in het OESO-document over actuele benaderingen van de statistische analyse van milieugiftigheidsgegevens (28).

Rapportage van testresultaten

50. Het onderzoeksrapport moet de volgende gegevens bevatten:

Testfaciliteit:

— verantwoordelijke medewerkers en hun verantwoordelijkheden in het onderzoek;

— elk laboratorium dient aantoonbare bekwaamheid in het gebruik van een aantal representatieve chemische stoffen te hebben.

Teststof:

— karakterisering van de teststof;

— fysische aard en relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— methode en frequentie van bereiding van testconcentraties;

— informatie over stabiliteit en biologische afbreekbaarheid.

Oplosmiddel:

— karakterisering van oplosmiddel (kenmerken, gebruikte concentratie);

— motivering van de keuze van het oplosmiddel (wanneer dat geen water is).

▼**M7**

Proefdieren:

— soort en stam;

— leverancier en diens specifieke faciliteit;

— leeftijd van vissen bij aanvang test en reproductie-/paaistatus;

— gegevens over acclimatiseringsprocedure voor de dieren;

— lichaamsgewicht van vissen bij aanvang blootstelling (van een substeekproef uit totaal aantal vissen).

Testomstandigheden:

— gebruikte testprocedure (testtype, densiteit, bezettingsgraad, enz.);

— bereidingswijze van stamoplossingen en testconcentraties;

— de nominale testconcentraties, wekelijks gemeten concentraties van de testoplossingen en gebruikte analysemethode, gemiddelden van de gemeten waarden en standaarddeviaties in de testbakken, en bewijs dat de metingen betrekking hebben op de concentraties van de teststof in ware oplossing;

— karakteristieken van verdunningswater (waaronder pH-graad, hardheid, alkaliteit, temperatuur, opgeloste zuurstofconcentratie, chloorresiduen, totaalgehalte aan organische koolstof, zwevende deeltjes en andere metingen die zijn gedaan);

— de waterkwaliteit in testbakken: pH-graad, hardheid, temperatuur en opgeloste zuurstofconcentratie;

— gedetailleerde informatie over voeding (e.g. soort voeding, oorsprong, toegediende hoeveelheid en frequentie, en indien beschikbaar analyses van relevante verontreinigende stoffen (bijvoorbeeld PCB's, PAK's en organochloorpesticiden).

Resultaten:

— bewijs dat de controles voldoen aan de aanvaardbaarheidscriteria van de test;

— gegevens over de sterftecijfers in de testconcentraties en de controlegroepen;

— de gebruikte statistische analysetechnieken, behandeling van gegevens en motivering van toegepaste technieken;

— gegevens over biologische waarnemingen van de morfologie, waaronder secundaire geslachtskenmerken, eiproductie en VTG;

— resultaten van data-analyses, bij voorkeur in de vorm van tabellen en diagrammen;

— gevallen van abnormale reacties van vissen en zichtbare effecten die zijn veroorzaakt door de teststof.

▼M7

RICHTSNOEREN VOOR INTERPRETATIE EN AANVAARDING VAN DE TESTRESULTATEN

51. Dit hoofdstuk bevat een aantal overwegingen die in aanmerking dienen te worden genomen bij de interpretatie van testresultaten voor de verschillende gemeten eindpunten. De resultaten moeten zorgvuldig worden geïnterpreteerd wanneer de teststof klaarblijkelijk openlijke toxiciteit veroorzaakt of gevolgen heeft voor de algemene conditie van het proefdier.

52. Teneinde een zinvolle interpretatie van de gegevens mogelijk te maken, moet bij de vaststelling van het bereik van testconcentraties erop worden toegezien dat de maximale toegelaten concentratie niet wordt overschreden. Het is van belang dat er ten minste één behandeling is zonder tekenen van toxische effecten. Tekenen van ziekte en van toxische effecten dienen grondig te worden beoordeeld en gerapporteerd. Mogelijk wordt de productie van VTG bij vrouwtjes bijvoorbeeld ook beïnvloed door algemene toxiciteit en niet-endocriene toxische werkingsmechanismen, zoals hepatotoxiciteit. De interpretatie van effecten kan echter worden versterkt door andere behandelniveaus die niet zijn verstoord door systemische toxiciteit.

53. Er zijn enkele aspecten die in aanmerking moeten worden genomen bij de aanvaarding van testresultaten. Als richtsnoer geldt dat de VTG-niveaus in controlegroepen van mannetjes en vrouwtjes zich van elkaar moeten onderscheiden met ongeveer een factor drie bij de Amerikaanse dikkop-elritsen en de zebravissen en met ongeveer een factor één bij de Japanse rijstvisjes. Voorbeelden van het waardenbereik dat wordt aangetroffen in controle- en behandelgroepen zijn beschikbaar in de validatierapporten (1, 2, 3, 4). Hoge VTG-waarden bij controlemannetjes zouden ten koste kunnen gaan van de gevoeligheid van de test en het vermogen om zwakke oestrogene agonisten te detecteren. Lage VTG-waarden bij controlevrouwtjes zouden ten koste kunnen gaan van de gevoeligheid van de test en het vermogen om aromataseremmers en oestrogene antagonisten te detecteren. Dit richtsnoer is gebaseerd op de validatiestudies.

54. De kwantificering van de eiproductie is onderhevig aan grote variaties [de variatiecoëfficiënt (VC) kan schommelen tussen 20 en 60 %] die het vermogen van de test hinderen om een significante toename van de eiproductie met minder dan 70 % te detecteren naarmate de VC 50 % of meer nadert. Wanneer de VC beperkt is tot lagere waarden (rond 20-30 %) is de test voldoende in staat (80 %) om een afname van de eiproductie met 40-50 % te detecteren. De testopzet die wordt gebruikt voor de Amerikaanse dikkop-elrits, met 4 replicaten per dosisniveau, zou beter in staat moeten zijn om het vruchtbaarheidseindpunt te beoordelen dan een testopzet met slechts 2 replicaten.

55. Als een laboratorium de test niet eerder heeft uitgevoerd of als er sprake is van materiële wijzigingen (bijvoorbeeld een verandering van visstam of leverancier), wordt aanbevolen een technische bekwaamheidsstudie uit te voeren. Het verdient aanbeveling stoffen te gebruiken die uiteenlopende werkingsmechanismen of effecten op een aantal van de testeindpunten bestrijken. In de praktijk wordt elk laboratorium aangemoedigd zijn eigen historische controlegegevens voor mannetjes en vrouwtjes samen te stellen en een positieve controlestof te gebruiken voor oestrogene activiteit (bijvoorbeeld met 100 ng/l 17β-estradiol, of een bekende zwakke agonist) die resulteert in een verhoogde VTG-waarde bij mannetjesvissen, alsmede een positieve controlestof voor aromataseremming (bijvoorbeeld 300 µg/l fadrozool of prochloraz) die resulteert in een verlaagde VTG-waarde bij vrouwtjesvissen, en een positieve controlestof voor androgene activiteit (bijvoorbeeld 5 µg/l 17β-trenbolon) die leidt tot de inductie van secundaire geslachtskenmerken bij vrouwelijke Amerikaanse dikkop-elritsen en Japanse rijstvisjes. Al deze gegevens kunnen worden vergeleken met beschikbare gegevens uit de validatiestudies (1, 2, 3) om de bekwaamheid van het laboratorium te waarborgen.

56. In het algemeen moeten VTG-metingen als positief worden beschouwd als er een statistisch significante toename van de VTG-waarde bij mannetjes optreedt ($p < 0,05$), of een statistisch significante afname bij vrouwtjes ($p < 0,05$),

▼M7

althans bij de hoogste geteste dosis, in vergelijking met de controlegroep, en in afwezigheid van tekenen van algemene toxiciteit. Een positief resultaat wordt verder ondersteund doordat een biologisch plausibele relatie tussen de dosis en de responscurve wordt aangetoond. Zoals vermeld, is de daling van de VTG-waarde mogelijk niet geheel van endocriene oorsprong. Toch dient een positief resultaat in het algemeen te worden opgevat als bewijs van endocriene activiteit in vivo en normaal gesproken te leiden tot maatregelen voor verdere opheldering.

57. De regelgevingsinstanties kunnen een histopathologisch onderzoek van de geslachtsklieren voorschrijven om de voortplantingsgeschiktheid van de proefdieren te bepalen en de testresultaten op basis van hun bewijskracht te beoordelen. In gevallen waarin VTG of secundaire geslachtskenmerken positief zijn (d.w.z. bij een afname of toename van VTG of inductie van secundaire geslachtskenmerken), hoeft er mogelijk geen histopathologisch onderzoek van de geslachtsklieren te worden verricht.

LITERATUUR

(1) OESO (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, Parijs.

(2) OESO (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, Parijs.

(3) OESO (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, Parijs.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (bekeken 18.9.2008).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 blz.

(6) OESO (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, Parijs.

(7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OESO (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr. 123, Parijs.

(23) OESO (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment nr. 23. Parijs

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; blz. 69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts", not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OESO (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, OESO, Parijs.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, gedateerd 30 januari 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 blz.

(30) OESO (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr. 150, OESO, Parijs.

▼**M7**

Aanhangsel 1

AFKORTINGEN EN DEFINITIES

Bezettingsgraad: het aantal vissen per volume water.

Chemische stof: een stof of mengsel

Densiteit: het natte gewicht van de vissen per volume water

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

HPG-as: hypothalamus-hypofyse-gonade-as

MTC: maximale toegelaten concentratie, dat wil zeggen circa 10 % van de LC_{50}

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen of mengsels.

VC: variatiecoëfficiënt

VTG: vitellogenine is een fosfolipoglycoproteïneprecursor van eidooierproteïne die gewoonlijk voorkomt bij seksueel actieve vrouwtjes van alle ovipare soorten.

▼M7

Aanhangsel 2

PROEFVOORWAARDEN VOOR DE ENDOCRIENE SCREENINGTEST BIJ VISSEN

1. Aanbevolen soort	Amerikaanse dikkop-elrits (*Pimephales promelas*)	Japans rijstvisje (*Oryzias latipes*)	Zebravis (*Danio rerio*)
2. Type test	Doorstroomtest	Doorstroomtest	Doorstroomtest
3. Watertemperatuur	25 ± 2 °C	25± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Verlichting	Fluorescentielampen (breed spectrum)	Fluorescentielampen (breed spectrum)	Fluorescentielampen (breed spectrum)
5. Lichtsterkte	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, of 50-100 ft-c (laboratoriumomgeving)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, of 50-100 ft-c (laboratoriumomgeving)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, of 50-100 ft-c (laboratoriumomgeving)
6. Fotoperiode (overgangen naar zonsopgang/-ondergang zijn optioneel, maar worden niet noodzakelijk geacht)	16 uur licht, 8 uur donker	12-16 uur licht, 12-8 uur donker	12-16 uur licht, 12-8 uur donker
7. Densiteit	< 5 g per l	< 5 g per l	< 5 g per l
8. Inhoud testkamer	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Hoeveelheid testoplossing	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Verwisselingen van testoplossingen	Minimaal 6 per dag	Minimaal 5 per dag	Minimaal 5 per dag
11. Leeftijd van testorganismen	Zie punt 21	Zie punt 21	Zie punt 21
12. Het natte gewicht van volwassen vis bij benadering (g)	Vrouwtjes: 1,5 ± 20 % Mannetjes: 2,5 ± 20 %	Vrouwtjes: 0,35 ± 20 % Mannetjes: 0,35 ± 20 %	Vrouwtjes: 0,65 ± 20 % Mannetjes: 0,4 ± 20 %
13. Aantal vissen per testbak	6 (2 mannetjes, 4 vrouwtjes)	6 (3 mannetjes, 3 vrouwtjes)	10 (5 mannetjes, 5 vrouwtjes)
14. Aantal behandelingen	= 3 (plus afdoende controles)	= 3 (plus afdoende controles)	= 3 (plus afdoende controles)
15. Aantal bakken per behandeling	Minimum 4	Minimum 4	Minimum 2
16. Aantal vissen per testconcentratie	16 volwassen vrouwtjes en 8 mannetjes (4 vrouwtjes en 2 mannetjes in elke replicaatbak)	12 volwassen vrouwtjes en 12 mannetjes (3 vrouwtjes en 3 mannetjes in elke replicaatbak)	10 volwassen vrouwtjes en 10 mannetjes (5 vrouwtjes en 5 mannetjes in elke replicaatbak)
17. Voederregime	Levende of bevroren volwassen of larvale pekelkreeftjes twee of drie maal daags (naar believen), in de handel verkrijgbaar voedsel, of een combinatie van beide	Larvale pekelkreeftjes twee of drie maal daags (naar believen), in de handel verkrijgbaar voedsel, of een combinatie van beide	Larvale pekelkreeftjes twee of drie maal daags (naar believen), in de handel verkrijgbaar voedsel, of een combinatie van beide

▼M7

18. Beluchting	Geen, tenzij concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % van de verzadigingswaarde van de lucht komt	Geen, tenzij concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % van de verzadigingswaarde van de lucht komt	Geen, tenzij concentratie opgeloste zuurstof onder 60 % van de verzadigingswaarde van de lucht komt
19. Verdunningswater	Schoon oppervlakte- of bronwater, synthetisch water of ontchloord kraanwater	Schoon oppervlakte- of bronwater, synthetisch water of ontchloord kraanwater	Schoon oppervlakte- of bronwater, synthetisch water of ontchloord kraanwater
20. Pre-blootstellingsperiode	7-14 dagen aanbevolen	7-14 dagen aanbevolen	7-14 dagen aanbevolen
21. Duur van de blootstelling	21-d	21-d	21-d
22. Biologische eindpunten	— overleving — gedrag — vruchtbaarheid — sec. gesl.kenmerken — VTG — gonade histopathologie (indien van toepassing)	— overleving — gedrag — vruchtbaarheid — sec. gesl.kenmerken — VTG — gonade histopathologie (indien van toepassing)	— overleving — gedrag — vruchtbaarheid — VTG — gonade histopathologie (indien van toepassing)
23. Aanvaardbaarheid van de test	Opgeloste zuurstof $\geq$ 60 % van verzadigingswaarde; gem. temperatuur van 25 ± 2 °C; 90 % overlevende vissen in de controlegroepen; gemeten testconcentraties binnen 20 % van gemiddelde gemeten waarden per behandelingsniveau.	Opgeloste zuurstof $\geq$ 60 % van verzadigingswaarde; gem. temperatuur van 25 ± 2 °C; 90 % overlevende vissen in de controlegroepen; gemeten testconcentraties binnen 20 % van gemiddelde gemeten waarden per behandelingsniveau.	Opgeloste zuurstof $\geq$ 60 % van verzadigingswaarde; gem. temperatuur van 26 ± 2 °C; 90 % overlevende vissen in de controlegroepen; gemeten testconcentraties binnen 20 % van gemiddelde gemeten waarden per behandelingsniveau.

▼**M7**

Aanhangsel 3

ENKELE CHEMISCHE KENMERKEN VAN AANVAARDBAAR VERDUNNINGSWATER

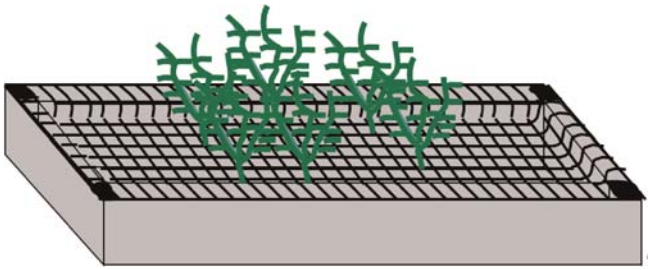
ONDERDEEL	CONCENTRATIES
Vaste deeltjes	< 20 mg/l
Totaalgehalte aan organische koolstof	< 2 mg/l
Niet-geïoniseerde ammonia	< 1 µg/l
Restchloorgehalte	< 10 µg/l
Totale hoeveelheid organofosfaat-bestrijdingsmiddelen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organochloor-pesticiden en polychloorbifenylen	< 50 ng/l
Totaalgehalte aan organisch chloor	< 25 ng/l

▼M7

Aanhangsel 4A

KUITSUBSTRAAT VOOR DE ZEBRAVIS

Paaiblad: geheel glazen instrumentenschaal, bijvoorbeeld van 22 × 15 × 5,5 cm (l × b × d), bedekt met verwijderbaar roestvrijstalen gaas (met openingen van 2 mm breed). Het gaas moet de opening van de instrumentenschaal bedekken op een niveau dat onder de rand ligt.



Op het gaas dient kuitsubstraat te worden bevestigd. Het moet de vissen een structuur bieden die ze kunnen binnengaan. Kunstmatige aquariumplanten van groen kunststofmateriaal zijn hiervoor bijvoorbeeld geschikt. (N.B. Houd rekening met mogelijke adsorptie van de teststof aan het kunststofmateriaal.) Het kunststofmateriaal moet gedurende voldoende tijd worden uitgeloogd in een ruime hoeveelheid warm water om te waarborgen dat geen chemische stoffen kunnen worden afgegeven aan het testwater. Bij het gebruik van glasmateriaal moet erop worden toegezien dat de vissen niet gewond of beklemd raken tijdens hun krachtige bewegingen.

De afstand tussen het blad en de glazen wanden dient ten minste 3 cm te bedragen om te waarborgen dat het paaien niet buiten het blad plaatsvindt. De op het blad gelegde eitjes vallen door het gaas; 45-60 minuten na het begin van de belichting kunnen er monsters van worden genomen. De transparante eitjes kleven niet en kunnen gemakkelijk worden geteld met behulp van transversaal licht. Wanneer 5 vrouwtjes per bak worden gebruikt, kunnen aantallen tot 20 per dag als laag, tot 100 per dag als gemiddeld en boven de 100 per dag als hoog worden beschouwd. Zo laat mogelijk in de avond of zo vroeg mogelijk in de ochtend moet het paaiblad worden verwijderd om de eitjes te verzamelen en vervolgens het paaiblad weer aan te brengen in de testbak. De tijd tussen het verwijderen en weer aanbrengen van het blad mag niet langer dan 1 uur bedragen omdat anders de komst van het kuitsubstraat kan leiden tot afzonderlijk paren en paaien op een ongebruikelijk tijdstip. Als de situatie met zich meebrengt dat het paaiblad later moet worden aangebracht, dient dit ten minste 9 uur na het begin van de belichting te geschieden. Op zo'n laat tijdstip wordt geen paaigedrag meer uitgelokt.

▼M7

Aanhangsel 4B

KUITSUBSTRAAT VOOR DE AMERIKAANSE DIKKOP-ELRITS

In elk van de testkamers worden twee of drie gecombineerde paaibuizen en -bladen van kunststof/keramiek/glas of roestvrij staal geplaatst, bijvoorbeeld een grijze halfronde buis van 80 mm lengte op een blad met opstaande rand van 130 mm lengte (zie afbeelding). Goed geacclimatiseerde buizen van pvc of keramiek zijn aantoonbaar geschikt als kuitsubstraat (Thorpe et al., 2007).

Aanbevolen wordt geschuurde buizen te gebruiken om de adhesie te verbeteren. Ook moet het blad worden afgeschermd om te voorkomen dat de vissen de gevallen eitjes bereiken, tenzij de adhesiewerking voor het gebruikte kuitsubstraat is aangetoond.



De bladbodem is zo ontworpen dat deze alle eitjes bevat die zich niet aan het buisoppervlak hechten en anders op de bodem van de bak zouden vallen (en de eitjes die rechtstreeks op de platte kunststofbodem worden gelegd). Alle kuitsubstraten moeten voor gebruik minimaal 12 uur worden uitgeloogd in verdunningswater.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

Aanhangsel 5A

BEOORDELING VAN SECUNDAIRE GESLACHTSKENMERKEN BIJ AMERIKAANSE DIKKOP-ELRITSEN VOOR DE OPSPORING VAN BEPAALDE ENDOCRIEN ACTIEVE CHEMISCHE STOFFEN

Overzicht

Potentieel belangrijke kenmerken van het fysieke voorkomen van volwassen Amerikaanse dikkop-elritsen tijdens tests met hormoonontregelaars zijn de lichaamskleur (licht/donker), kleurpatronen (aan- of afwezigheid van verticale banen), lichaamsvorm (vorm van de kop en borstregio, zwelling van de buik) en speciale secundaire geslachtskenmerken (aantal en grootte van nuptiale papillen, grootte van de nekverdikking en de legbuis).

Nuptiale papillen bevinden zich op de kop (nekverdikking) van seksueel actieve mannetjes van de Amerikaanse dikkop-elrits, gewoonlijk in een tweezijdig symmetrisch patroon (Jensen *et al.* 2001). Controlevrouwtjes en jonge mannetjes en vrouwtjes vertonen geen papillaire ontwikkeling (Jensen *et al.* 2001). Er kunnen zich tot acht afzonderlijke papillen rond de ogen en tussen de neusgaten van de mannetjes bevinden. De meeste en de grootste papillen worden in twee evenwijdige lijnen direct onder de neusgaten en boven de bek aangetroffen. Veel vissen hebben groepen papillen onder de onderkaak. Die welke het dichtst bij de bek zitten, vormen meestal één paar, terwijl de reeks dichter bij de buik kan bestaan uit maximaal vier papillen. Het feitelijke aantal papillen is zelden meer dan 30 (bereik van 18-28; Jensen *et al*. 2001). De overheersende papillen (in aantal) zijn aanwezig als een enkele, relatief ronde structuur met een hoogte die ongeveer gelijk is aan de diameter. De meeste seksueel actieve mannetjes hebben ook ten minste een aantal papillen die zo vergroot en geprononceerd zijn dat ze niet als afzonderlijke structuren te onderscheiden zijn.

Sommige soorten hormoonontregelende stoffen kunnen leiden tot abnormaal optreden van bepaalde secundaire geslachtskenmerken bij de andere sekse. Zo kunnen androgene receptoragonisten, zoals 17α-methyltestosteron of 17β-trenbolon, tot gevolg hebben dat vrouwelijke dikkop-elritsen geprononceerde nuptiale papillen ontwikkelen (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), terwijl oestrogene receptoragonisten het aantal of de grootte van nuptiale papillen bij mannetjes kunnen verkleinen (Miles-Richardson *et al*. 1999; Harries *et al*. 2000).

Hierna volgt een beschrijving van de kenmerken van nuptiale papillen bij Amerikaanse dikkop-elritsen op basis van procedures die worden gebruikt in het laboratorium van het Amerikaanse Environmental Protection Agency in Duluth (Minnesota). Specifieke producten en/of apparaten kunnen worden vervangen door vergelijkbare beschikbare materialen.

De beste weergave wordt bereikt met behulp van een verlicht vergrootglas of 3x vergrotende verlichte ontleedmicroscoop. Geef de vis dorsaal en met de kop naar voren (in de richting van de kijker) weer.

— Plaats de vis op een petrischaaltje (bv. 100 mm doorsnee), met de kop naar voren en de buikzijde omlaag. Stel de zoeker scherp om identificatie van papillen mogelijk te maken. Rol de vis langzaam en voorzichtig van zijde naar zijde om gebieden met papillen te identificeren. Tel en beoordeel de papillen.

— Herhaal de waarneming op het ventrale kopoppervlak door de vis met de rug naar voren op het petrischaaltje te leggen.

— De waarnemingen moeten per vis binnen 2 minuten voltooid zijn.

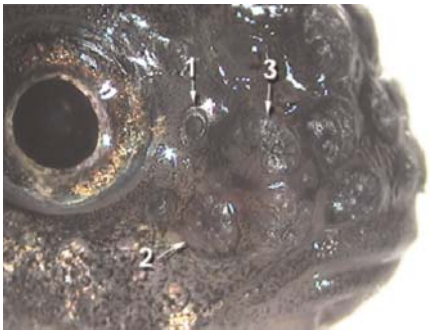
▼M7

Tellen en beoordelen van de papillen

Er zijn zes specifieke gebieden aangewezen die moeten worden beoordeeld op aanwezigheid en ontwikkeling van papillen bij volwassen Amerikaanse dikkopelritsen. Er is een sjabloon ontwikkeld om de locatie en de hoeveelheid papillen in kaart te brengen (zie einde van dit aanhangsel). Het aantal papillen wordt genoteerd, waarbij de grootte per organisme als volgt kan worden aangegeven: 0-afwezig, 1-aanwezig, 2-vergroot en 3-geprononceerd (fig. 1).

De score 0-afwezig betekent dat geen enkele papil aanwezig is. De score 1-aanwezig wordt toegekend aan elke papil die uit één punt bestaat waarvan de hoogte bijna gelijk is aan de diameter. De score 2-vergroot wordt toegekend aan weefsel dat eruitziet als een asterisk, gewoonlijk met een brede ronde basis met groeven of sporen die vanuit het midden lopen. De papilhoogte is meestal grilliger maar kan soms enigszins afgerond zijn. De score 3-geprononceerd geldt voor een tamelijk grote, afgeronde papil met een minder duidelijk gedefinieerde structuur. Soms komen deze papillen samen zodat ze één geheel vormen op één of meer gebieden (B, C en D, hierna beschreven). Kleur en vorm zijn soortgelijk aan score 2 maar af en toe tamelijk ongedifferentieerd. Toepassing van dit beoordelingssysteem leidt in het algemeen tot een totale papilscore van < 50 bij een normaal controlemannetje met 18 tot 20 papillen (Jensen *et al.* 2001).

Figuur 1



Het werkelijke aantal papillen kan bij sommige vissen groter zijn dan het aantal vakjes in de sjablonen voor een bepaald gebied. Als dit het geval is, kunnen extra scorecijfers worden genoteerd in of naast het kader. De sjabloon hoeft derhalve geen symmetrie te vertonen. Een aanvullende methode om papillen in kaart te brengen die paarsgewijs of verticaal verbonden langs het horizontale vlak van de bek voorkomen, is het noteren van dubbele scores voor twee papillen in één vakje.

In kaart te brengen gebieden:

A — Papillen rond het oog. Van dorsaal naar ventraal getekend rond de voorste oograng. Gewoonlijk meerdere bij volwassen controlemannetjes, niet aanwezig bij controlevrouwtjes, in het algemeen in paren (één bij elk oog) of één bij vrouwtjes die zijn blootgesteld aan androgenen.

B-Papillen tussen de neusgaten, (zintuigkanaalporiën). Normaal in paren bij controlemannetjes met hogere scores (2-vergroot of 3-geprononceerd). Niet aanwezig bij controlevrouwtjes, wel enige incidentie en ontwikkeling bij vrouwtjes die zijn blootgesteld aan androgenen.

C — Papillen onmiddellijk voor de neusgaten, evenwijdig aan de bek. Gewoonlijk vergroot of geprononceerd bij volwassen controlemannetjes. Aanwezig of vergroot bij minder ontwikkelde mannetjes of met androgenen behandelde vrouwtjes.

▼M7

D — Papillen evenwijdig aan de beklijn. In het algemeen ontwikkeld bij controlemannetjes. Afwezig bij controlevrouwtjes maar aanwezig bij vrouwtjes die zijn blootgesteld aan androgenen.

E — Papillen op de onderkaak, dicht bij de bek, meestal klein en gewoonlijk in paren. Verschillend bij controlemannetjes of behandelde mannetjes, en bij behandelde vrouwtjes.

F — Papillen aan de buikzijde van E. Gewoonlijk klein en in paren. Aanwezig bij controlemannetjes en aan androgenen blootgestelde vrouwtjes.

VERWIJZINGEN

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Papillensjabloon:

ID_____

Datum_____

Totale score _____

Numerieke score

1-aanwezig

2-vergroot

3-geprononceerd

	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

Aanhangsel 5B

BEOORDELING VAN SECUNDAIRE GESLACHTSKENMERKEN BIJ JAPANSE RIJSTVISJES VOOR DE OPSPORING VAN BEPAALDE ENDOCRIEN ACTIEVE CHEMISCHE STOFFEN

Hierna volgt een beschrijving van het meten van de papillaire uitsteeksels ([1]) die de secundaire geslachtskenmerken van het Japanse rijstvisje (*Oryzias latipes*) vormen.

1) Na de excisie van de lever (aanhangsel 6) wordt het karkas in een conische reageerbuis met ongeveer 10 ml 10 % neutraal gebufferde formaline geplaatst (hoofd boven, staart beneden). Als de geslachtsklier is ingespoten met een andere oplossing dan 10 % neutraal gebufferde formaline, wordt met een scheermes het karkas dwars doorgesneden tussen de regio vóór de anaalvin en de anus, waarbij zorgvuldig dient te worden vermeden dat de geslachtsopening en de geslachtsklier zelf beschadigd raken (fig. 3). Plaats de craniale zijde van de vis in de fixeeroplossing om de geslachtsklier te conserveren en de staartzijde van de vis in de 10 % neutraal gebufferde formaline zoals hierboven beschreven.

2) Houd, nadat de vis in 10 % neutraal gebufferde formaline is geplaatst, het voorste deel van de anaalvin met een pincet ongeveer 30 seconden omgevouwen om de anaalvin open te houden. Wanneer u de anaalvin met een pincet beetpakt, pakt u voorzichtig een paar vinstralen in het voorste gedeelte beet om geen krassen op de papillaire uitsteeksels te veroorzaken.

3) Nadat u de anaalvin ongeveer 30 seconden open hebt gehouden, bewaart u het karkas van de vis bij kamertemperatuur in 10 % neutraal gebufferde formaline totdat de papillaire uitsteeksels worden gemeten (ten minste 24 uur na de fixatie).

Meting

1) Nadat het karkas van de vis ten minste 24 uur is gefixeerd in de 10 % neutraal gebufferde formaline, haalt u het uit de conische reageerbuis en veegt u de formaline af op het filterpapier (of keukenpapier).

2) Leg de vis met de buik naar boven. Knip de anaalvin met een kleine ontleedschaar voorzichtig af (bij voorkeur met een kleine hoeveelheid ondersteunend been).

3) Neem het voorste deel van de afgesneden anaalvin met een pincet en leg het op een glasplaatje met een aantal druppels water. Bedek de anaalvin vervolgens met een dekglaasje. Pas op dat u de papillaire uitsteeksels niet bekrast wanneer u de anaalvin met het pincet oppakt.

4) Bepaal het nummer van de verbindingsplaat met papillaire uitsteeksels met behulp van de teller onder een biologische microscoop (staande microscoop of omgekeerde microscoop). De papillaire uitsteeksels zijn herkenbaar wanneer een kleine uitstulping zichtbaar is op de achterrand van de verbindingsplaat. Noteer het nummer van de verbindingsplaat en het aantal papillaire uitsteeksels voor elke vinstraal in het werkblad (bijvoorbeeld eerste vinstraal: 0, tweede vinstraal: 10, derde vinstraal: 12, enz.) en voer het totaal van deze

([1]) Papillaire uitsteeksels komen gewoonlijk alleen voor bij volwassen mannetjes en worden aangetroffen op de vinstralen van de tweede tot en met zevende of achtste vin, gerekend vanaf het achtereinde van de anaalvin (fig. 1 en 2). De uitsteeksels komen echter zelden voor op de eerste vinstraal vanaf het achtereinde van de anaalvin. Deze operationele standaardprocedure (Standard Operating Procedure - SOP) heeft betrekking op het meten van uitsteeksels op de eerste vinstraal (het nummer van de vinstraal verwijst in deze SOP naar de volgorde vanaf het achtereinde van de anaalvin).

▼M7

aantallen voor elke afzonderlijke vis in in het Excel-spreadsheet. Indien nodig kunt u een foto van de anaalvin maken en het aantal verbindingsplaten met papillaire uitsteeksels op de foto tellen.

5) Na de meting bewaart u de anaalvin in de bij (1) genoemde conische reageerbuis.

Fig. 1.

Diagram met verschillen naar geslacht in vorm en grootte van de anaalvin. A = mannetje; B = vrouwtje. 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.

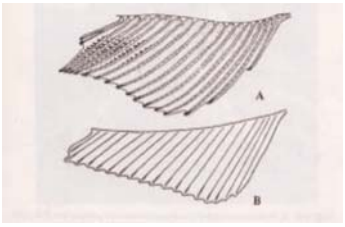


Fig. 2.

A. Uitsteeksels op verbindingsplaten van anaalvinstralen. = verbindingsplaat; A.S. = axiale ruimte; P. = uitsteeksel. B. Distaal uiteinde van vinstraal. Actinotrichia (Act.) bevinden zich aan de punt. 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.

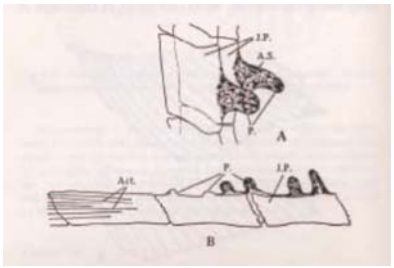
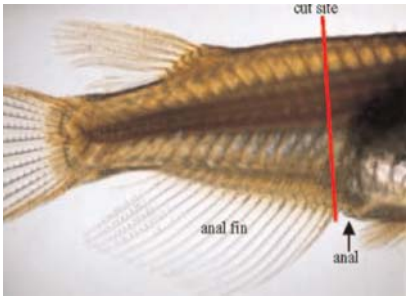


Fig. 3.

Foto van vis met de plaats van de snede voor het fixeren van de geslachtsklier in een andere fixeeroplossing dan 10 % neutraal gebufferde formaline. In dat geval wordt het karkas doorgesneden met een scheermes tussen de regio vóór de anaalvin en de anus (rode streep), en wordt de kopzijde van de vis in de fixeeroplossing voor de geslachtsklier en de staartzijde van de vis in de 10 % neutraal gebufferde formaline geplaatst.



▼M7

Aanhangsel 6

AANBEVOLEN PROCEDURES VOOR MONSTERNEMING TEN BEHOEVE VAN VITELLOGENINE-ANALYSE

Er moet zorgvuldig worden voorkomen dat kruisbesmetting tussen VTG-monsters van mannetjes en vrouwtjes optreedt.

Procedure 1A: Amerikaanse dikkop-elrits: bloedafname uit de staartader of -slagader

Na anesthesering wordt de staartwortel gedeeltelijk afgesneden met een ontleedmesje en wordt bloed afgenomen uit de staartader of -slagader met een geheparineerd microhematocriet capillair buisje. Na de bloedafname wordt het plasma snel geïsoleerd door middel van centrifugeren gedurende 3 minuten bij 15 000 *g* (of gedurende 10 minuten bij 15 000 *g* en een temperatuur van 4 °C). Indien gewenst kan na het centrifugeren het hematocrietpercentage worden bepaald. Het plasmadeel wordt vervolgens uit het microhematocriet buisje genomen en in een centrifugebuis met 0,13 eenheden aprotinine (een proteaseremmer) bewaard bij -80 °C totdat de VTG-bepaling kan plaatsvinden. Afhankelijk van de grootte van de Amerikaanse dikkop-elrits (die sekse-afhankelijk is) lopen de af te nemen hoeveelheden plasma meestal uiteen van 5 tot 60 microliter per vis (Jensen *et al.* 2001).

Procedure 1B: Amerikaanse dikkop-elrits: bloedafname uit het hart

Als alternatief kan ook bloed worden afgenomen door middel van een hartpunctie met een geheparineerde injectiespuit (1000 eenheden heparine per ml). Het bloed wordt overgebracht naar eppendorfbuizen (op ijs bewaard) en vervolgens gecentrifugeerd (5 minuten bij 7 000 *g* en kamertemperatuur). Het plasma moet daarna worden overgebracht naar schone eppendorfbuizen (in aliquots als de hoeveelheid plasma dit mogelijk maakt) en onmiddellijk worden bevroren en bewaard bij -80 °C totdat het wordt geanalyseerd (Panter *et al.* 1998).

Procedure 2A: Japans rijstvisje: excisie van de lever

De testvissen uit de testkamer scheppen

1) Testvissen moeten uit de testkamer worden gehaald met een klein schepnet. Pas op dat u de vissen niet in andere testkamers laat vallen.

2) In principe moeten de testvissen in deze volgorde worden opgeschept: controle, oplosmiddelcontrole (indien van toepassing), laagste concentratie, middelste concentratie, hoogste concentratie en positieve controle. Bovendien moeten alle mannetjes uit één testkamer worden geschept voordat de vrouwtjes uit die testkamer worden opgeschept.

3) Het geslacht van elke vis wordt vastgesteld op basis van uitwendige secundaire geslachtskenmerken (bijvoorbeeld de vorm van de anaalvin).

4) Zet de testvissen in een transportbak en breng deze naar het werkstation voor excisie van de lever. Controleer voor de zekerheid de labels van de testkamer en de transportbak om te verifiëren dat zowel het aantal testvissen dat uit de testkamer is verwijderd als het aantal vissen dat in de testkamer overblijft, het verwachte aantal is.

5) Als het geslacht niet kan worden bepaald aan de hand van het uiterlijk van de vissen, verwijdert u alle vissen uit de testkamer. In dat geval moet het geslacht worden vastgesteld door waarneming van de geslachtsklier of secundaire geslachtskenmerken onder een stereoscopische microscoop.

Excisie van de lever

1) Breng de testvis van de transportbak over naar de anesthetische oplossing met het kleine schepnet.

▼M7

2) Leg de testvis, nadat deze is verdoofd, op het filterpapier (of keukenpapier) met een gewoon pincet. Grijp met het pincet de testvis bij de kop om te voorkomen dat de staart breekt.

3) Dep het water op het oppervlak van de testvis op met het filterpapier (of keukenpapier).

4) Leg de vis met de buik naar boven. Breng met een ontleedschaar een kleine dwarsincisie aan ergens tussen de nekregio aan de buikzijde en het midden van de buikregio.

5) Steek de ontleedschaar in de kleine incisie en snij de buik in vanaf een punt aan de staartzijde van de kieuwmantel tot de craniale zijde van de anus langs de middellijn van de buik. Pas op dat u de ontleedschaar niet te diep inbrengt om te voorkomen dat de lever en de geslachtsklier beschadigd raken.

6) Voer de volgende handelingen uit onder de stereoscopische microscoop.

7) Leg de testvis met de buikzijde omhoog op het keukenpapier (een glazen petrischaaltje en glasplaatje zijn ook beschikbaar).

8) Trek de wanden van de buikholte met een precisiepincet opzij en breng de inwendige organen naar buiten. Indien nodig mogen de inwendige organen ook naar buiten worden gebracht door één zijde van de buikholtewand te verwijderen.

9) Leg het onderling verbonden deel van de lever en de galblaas bloot met behulp van nog een precisiepincet. Neem vervolgens het galkanaal en snij de galblaas af. Wees voorzichtig, zodat de galblaas niet breekt.

10) Neem de slokdarm en snij op dezelfde wijze het spijsverteringskanaal los van de lever. Wees voorzichtig, zodat de inhoud niet uit het spijsverteringskanaal lekt. Snij het staarteinde van het spijsverteringskanaal los van de anus en verwijder het kanaal uit de buikholte.

11) Snij de vetmassa en andere weefsels rond de lever weg. Wees voorzichtig, zodat er geen krassen op de lever komen.

12) Pak de leverpoort met het precisiepincet en verwijder de lever uit de buikholte.

13) Leg de lever op het glasplaatje. Gebruik het precisiepincet om zo nodig al het extra vet en uitwendig weefsel (bv. buikranden) van het leveroppervlak te verwijderen.

14) Bepaal het gewicht van de lever, met een microbuisje van 1,5 ml als tarra, met behulp van een elektronische precisiebalans. Noteer de waarde op het werkblad (nauwkeurigheid: 0,1 mg). Verifieer de identificatiegegevens op het label van het microbuisje.

15) Sluit het kapje van het microbuisje met de lever. Bewaar de buis in een koel- of ijsrek.

16) Reinig de incisie-instrumenten na het uitnemen van één lever of vervang ze door schone exemplaren.

▼M7

17) Verwijder op bovenvermelde wijze de lever uit alle vissen in de transportbak.

18) Nadat de lever is verwijderd uit elk van de vissen in de transportbak (d.w.z. alle mannetjes of vrouwtjes uit een testkamer), worden alle levermonsters in een buizenrek met een identificatielabel geplaatst en in een vriezer bewaard. Wanneer de levers kort na de excisie beschikbaar worden gesteld voor voorbehandeling, worden de monsters in een koel- of ijsrek naar het volgende werkstation gebracht.

Na de leverexcisie is het karkas beschikbaar voor het meten van de histologie van de geslachtsklier en de secundaire geslachtskenmerken.

Monsters

Bewaar de uit de testvissen genomen levermonsters bij ≤ -70 °C als ze niet kort na de excisie worden gebruikt voor de voorbehandeling.

Fig. 1.

Net voor de borstvinnen wordt een snede aangebracht met een schaar.

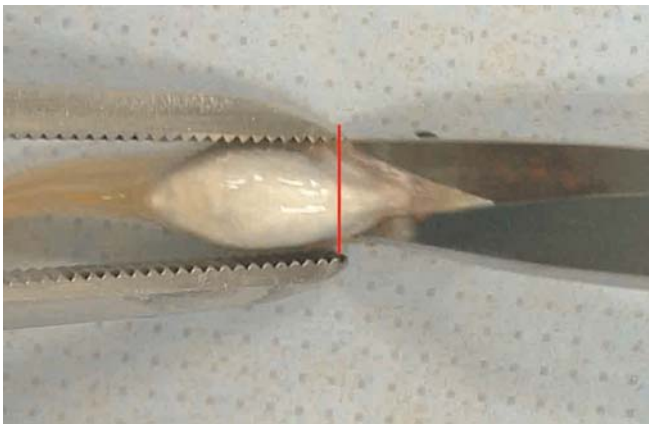


Fig. 2.

De middellijn van de buik wordt met een schaar opengesneden tot ongeveer 2 mm van de craniale zijde van de anus.



▼M7

Fig. 3.

De buikwanden worden gespreid met een tang om de lever en andere inwendige organen bloot te leggen.

(Als alternatief kunnen de buikwanden lateraal worden vastgezet).

De pijl wijst de lever aan.

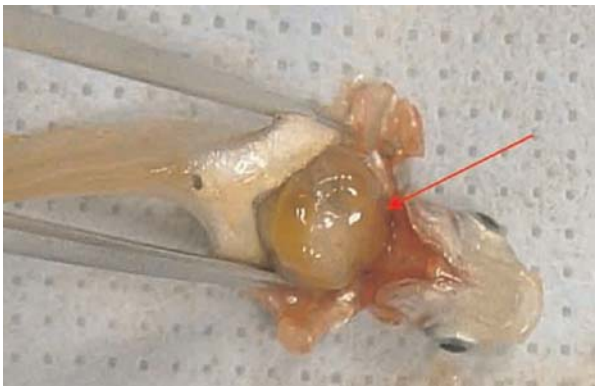


Fig. 4.

De lever wordt grofweg ontleed en uitgenomen met een tang.

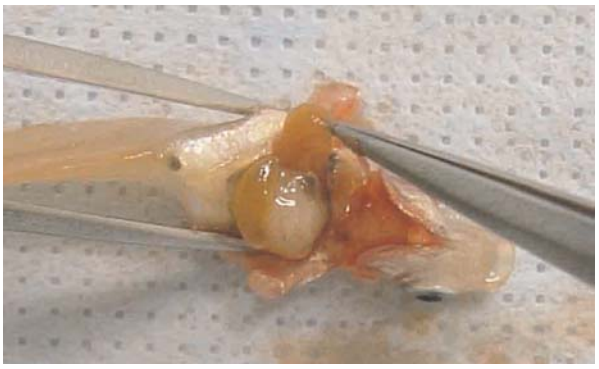
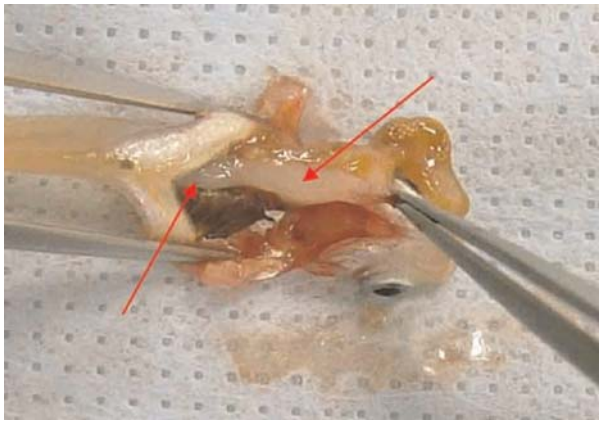


Fig. 5.

De ingewanden worden voorzichtig opzij getrokken met een tang.



▼M7

Fig. 6.

Beide uiteinden van de ingewanden en alle mesenterische aanhechtingen worden doorgesneden met een schaar.

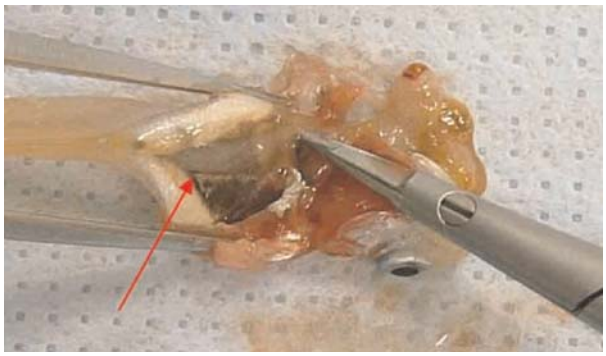


Fig. 7 (vrouwtje).

De procedure is identiek voor de vrouwtjesvis.

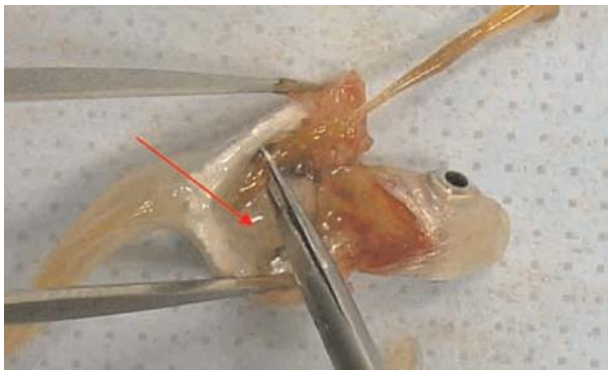


Fig. 8.

De procedure is afgerond.



▼M7

Procedure 2B: Japans rijstvisje (*Oryzias latipes*): voorbehandeling van de lever ten behoeve van vitellogenineanalyse

Neem de fles homogenaatbuffer uit de ELISA-uitrusting en koel deze met gemalen ijs (temperatuur van de oplossing: ≤ 4 °C). Als gebruik wordt gemaakt van homogenaatbuffer van het EnBio ELISA-systeem, ontdooit u de oplossing bij kamertemperatuur en koelt u de fles vervolgens met gemalen ijs.

Bereken het volume homogenaatbuffer voor de lever op basis van het gewicht van de lever (voeg 50 µl homogenaatbuffer per mg levergewicht toe). Als het gewicht van de lever bijvoorbeeld 4,5 mg is, bedraagt het volume homogenaatbuffer voor die lever 225 µl. Stel een lijst op van de volumes homogenaatbuffer voor alle levers.

De lever prepareren voor de voorbehandeling

1) Neem het microbuisje van 1,5 ml met de lever vlak voor de voorbehandeling uit de vriezer.

2) De voorbehandeling van de levers van mannetjes moet worden uitgevoerd voor die van de vrouwtjes om vitellogeninebesmetting te voorkomen. Bovendien moet de voorbehandeling voor de testgroepen in deze volgorde worden uitgevoerd: controle, oplosmiddelcontrole (indien van toepassing), laagste concentratie, middelste concentratie, hoogste concentratie en positieve controle.

3) Het aantal microbuisjes van 1,5 ml met levermonsters dat op een gegeven moment uit de vriezer wordt genomen, mag niet groter zijn dan het aantal dat op dat moment kan worden gecentrifugeerd.

4) Plaats de microbuisjes van 1,5 ml met levermonsters op het ijsrek in de volgorde van de monsternummers (het is niet nodig de lever te ontdooien).

De voorbehandeling uitvoeren

1) Toevoeging van de homogenaatbuffer

   Controleer in de lijst het volume homogenaatbuffer dat moet worden gebruikt voor een bepaald levermonster en stel de micropipet (volumebereik: 100-1000 µl) in op het juiste volume. Bevestig een schone tip aan de micropipet.

   Neem de homogenaatbuffer uit de fles met reagens en voeg de buffer toe aan het microbuisje van 1,5 ml dat de lever bevat.

   Voeg volgens de hierboven beschreven procedure de homogenaatbuffer toe aan alle microbuisjes van 1,5 ml die een lever bevatten. Het is niet nodig de tip van de micropipet te vervangen door een nieuwe. Als de tip echter besmet of mogelijk besmet is, moet de tip wel worden vervangen.

2) Homogenisatie van de lever

   — Bevestig een nieuwe homogenisatiestamper aan de homogenisator van het microbuisje.

   — Steek de stamper in het microbuisje van 1,5 ml. Neem de homogenisator van het microbuisje in de hand en druk de lever fijn tussen het oppervlak van de stamper en de binnenwand van het microbuisje van 1,5 ml.

   — Gebruik de homogenisator van het microbuisje gedurende 10 tot 20 seconden. Koel tijdens deze handeling het microbuisje van 1,5 ml met gemalen ijs.

▼M7

— Til de stamper uit het microbuisje van 1,5 ml en laat hem ongeveer 10 seconden rusten. Voer vervolgens een visuele inspectie van de staat van de suspensie uit.

— Als er stukjes lever in de suspensie worden waargenomen, herhaalt u de bewerkingen (3) en (4) om een bevredigend leverhomogenaat te bereiden.

— Koel het gesuspendeerde leverhomogenaat op het ijsrek tot het centrifugeren.

— Vervang de stamper voor elk homogenaat door een nieuwe.

— Homogeniseer alle levers met homogenaatbuffer volgens de hierboven beschreven procedure.

3) Centrifugeren van het gesuspendeerde leverhomogenaat

— Verifieer dat de temperatuur in de gekoelde centrifugekamer $\leq$ 5 °C. is.

— Plaats de microbuisjes van 1,5 ml met het gesuspendeerde leverhomogenaat in de gekoelde centrifuge (pas indien nodig de balans aan).

— Centrifugeer het gesuspendeerde leverhomogenaat bij 13 000 *g* en $\leq$ 5 °C. gedurende 10 minuten. Als de supernatantia goed gescheiden zijn, kunnen de centrifugale kracht en tijdsduur indien nodig worden aangepast.

— Controleer na het centrifugeren of de supernatantia voldoende gescheiden zijn (oppervlakte: vet, tussenlaag: supernatans, onderlaag: leverweefsel). Als de scheiding ontoereikend is, centrifugeert u de suspensie opnieuw onder dezelfde omstandigheden.

— Neem alle monsters uit de gekoelde centrifuge en plaats ze op monsternummer op het ijsrek. Pas op dat elk van de gescheiden lagen niet opnieuw wordt gesuspendeerd na het centrifugeren.

4) Afname van het supernatans

— Zet vier microbuisjes van 0,5 ml in het rek om er het supernatans in op te slaan.

— Neem 30 µl van elk supernatans (gescheiden als tussenlaag) met behulp van de micropipet en druppel dit in één microbuisje van 0,5 ml. Pas op dat er geen vet van het oppervlak of leverweefsel uit de onderlaag wordt meegenomen.

— Neem het supernatans en druppel het in twee andere microbuisjes van 0,5 ml op de hierboven beschreven wijze.

— Verzamel de rest van het supernatans met de micropipet (indien mogelijk: $\geq$ 100 µl). Druppel dit supernatans in het resterende microbuisje van 0,5 ml. Pas op dat er geen vet van het oppervlak of leverweefsel uit de onderlaag wordt meegenomen.

— Sluit het kapje van dit microbuisje van 0,5 ml en noteer het volume van het supernatans op het label. Koel de microbuisjes vervolgens onmiddellijk op het ijsrek.

— Vervang de tip van de micropipet voor elk supernatans door een nieuwe. Als zich een grote hoeveelheid vet aan de tip hecht, moet u deze meteen door een nieuwe vervangen om te voorkomen dat het leverextract door het vet verontreinigd raakt.

▼M7

— Druppel al het gecentrifugeerde supernatans in vier microbuisjes van 0,5 ml volgens de hierboven beschreven procedure.

— Zodra het supernatans is verdeeld over de microbuisjes van 0,5 ml, plaatst u deze allemaal in het buizenrek met het identificatielabel en bevriest ze vervolgens onmiddellijk in de vriezer. Als de VTG-concentraties onmiddellijk na de voorbehandeling worden gemeten, houdt u één microbuisje van 0,5 ml (met 30 µl supernatans) gekoeld in het buizenrek en brengt u dit over naar het werkstation waar de ELISA-test wordt uitgevoerd. In dat geval plaatst u de overige microbuisjes in de buizenrekken en bevriest u deze in de vriezer.

— Gooi na het verzamelen van het supernatans het residu op passende wijze weg.

Opslag van de monsters

Bewaar de microbuisjes van 0,5 ml met het supernatans van het leverhomogenaat bij een temperatuur van ≤ -70 °C totdat ze voor de ELISA-test worden gebruikt.

Procedure 3A: Zebravis: bloedafname uit de staartader of -slagader

Na anesthesering wordt de staartwortel overdwars afgesneden en wordt bloed afgenomen uit de staartader of -slagader met een geheparineerd microhematocriet capillair buisje. De hoeveelheden bloed lopen uiteen van 5 tot 15 microliter, afhankelijk van de visgrootte. Er wordt een gelijke hoeveelheid aprotininebuffer (6 microgram/ml in PBS) aan het microcapillaire buisje toegevoegd en het plasma wordt van het bloed gescheiden door middel van centrifugeren (5 minuten bij 600 *g*). Het plasma wordt verzameld in de reageerbuisjes en bewaard bij –20 °C totdat het wordt geanalyseerd op vitellogenine of andere belangwekkende proteïnen.

Procedure 3B: Zebravis: bloedafname door middel van hartpunctie

Om coagulatie van het bloed en proteïneafbraak te voorkomen, worden de monsters verzameld in een fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) die heparine (1 000 eenheden/ml) en de proteaseremmer aprotinine (2 TIU/ml) bevat. Als ingrediënten voor de buffer worden heparine, ammoniumzout en gevriesdroogde aprotinine aanbevolen. Voor de bloedafname wordt een injectiespuit (1 ml) met een vaste dunne naald (bijvoorbeeld Braun Omnikan-F) aanbevolen. De spuit moet vooraf gevuld zijn met de buffer (ongeveer 100 microliter) om de kleine hoeveelheden bloed volledig uit de vissen te wassen. De bloedmonsters worden afgenomen door middel van een hartpunctie. Eerst moet de vis worden geanesthesieerd met MS-222 (100 mg/l). Met het juiste anesthesieniveau kan de gebruiker de hartslag van de zebravis onderscheiden. Houd tijdens de hartpunctie de zuiger van de injectiespuit onder lichte druk. De af te nemen hoeveelheden bloed lopen uiteen van 20 tot 40 microliter. Na de hartpunctie moet het mengsel van bloed en buffer in de reageerbuis worden gespoten. Het plasma wordt van het bloed gescheiden door middel van centrifuge (20 minuten bij 5 000 *g*) en moet bij een temperatuur van -80 °C worden bewaard totdat het nodig is voor analyse.

Procedure 3C: SOP: zebravis: homogenisatie van kop en staart

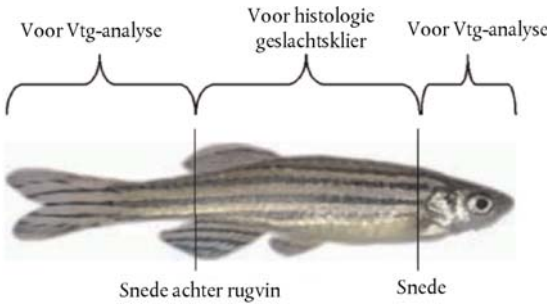
1. De vissen worden verdoofd en geëuthanaseerd volgens de testbeschrijving.

2. De kop en de staart worden van de vis afgesneden volgens figuur 1.

Belangrijk: *alle ontleedinstrumenten en de snijplank moeten goed worden gespoeld en gereinigd (bijvoorbeeld met 96 % ethanol) na de bewerking van elke vis om 'vitellogenine-vervuiling' van vrouwtjes of paaiende mannetjes op niet-paaiende mannetjes te voorkomen.*

▼**M7**

Figuur 1



3. Het totaalgewicht van de kop en staart wordt per vis tot op 1 mg nauwkeurig gemeten.

4. Nadat ze zijn gewogen worden de lichaamsdelen in geschikte buisjes gedaan (bijvoorbeeld eppendorfbuizen van 1,5 ml) en bevroren bij -80 °C tot ze worden gehomogeniseerd, of onmiddellijk gehomogeniseerd op ijs met twee plastic stampers. (Er kunnen andere methoden worden toegepast, mits uitgevoerd op ijs en mits het resultaat een homogene massa is.) Belangrijk: *de buisjes moeten correct worden genummerd zodat de koppen en staarten van de vissen kunnen worden gerelateerd aan hun respectieve lichamen die worden gebruikt voor de histologie van de geslachtsklier.*

5. Wanneer een homogene massa is bereikt, wordt 4 x het weefselgewicht van de ijskoude **homogenisatiebuffer** ([1]) toegevoegd. Blijf de stampers bewegen totdat het mengsel homogeen is. Belangrijke opmerking: *Voor elke vis worden nieuwe stampers gebruikt.*

6. De monsters worden op ijs bewaard totdat ze gedurende 30 minuten bij **4 °C** en 50 000 *g* worden gecentrifugeerd.

7. Gebruik een pipet om porties van 20 µl supernatans in **ten minste twee** buisjes te druppelen door de tip van de pipet onder de vetlaag aan de oppervlakte te houden en het supernatans zorgvuldig zonder vet- of pelletdeeltjes op te zuigen.

8. De buisjes worden tot gebruik bewaard bij een temperatuur van -80 °C.

([1]) Homogenisatiebuffer:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaseremmende cocktail (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7.4 + 120 µl proteaseremmende cocktail.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) bijvoorbeeld van Bie & Berntsen, Denemarken.
— Proteaseremmende cocktail: van Sigma (voor zoogdierweefsel), productnummer P 8340.
WAARSCHUWING: de homogenisatiebuffer moet worden gebruikt op de dag van samenstelling. Tijdens gebruik op ijs plaatsen.

▼M7

Aanhangsel 7

VERRIJKTE VITELLOGENINEMONSTERS EN TESTONAFHANKELIJKE REFERENTIENORM

Op elke dag dat er VTG-tests worden uitgevoerd, wordt een verrijkt monster geanalyseerd dat is gemaakt volgens een testonafhankelijke referentienorm. De VTG die wordt gebruikt voor de testonafhankelijke referentienorm is afkomstig uit een andere partij dan die welke is gebruikt om kalibratienormen samen te stellen voor de test die wordt uitgevoerd.

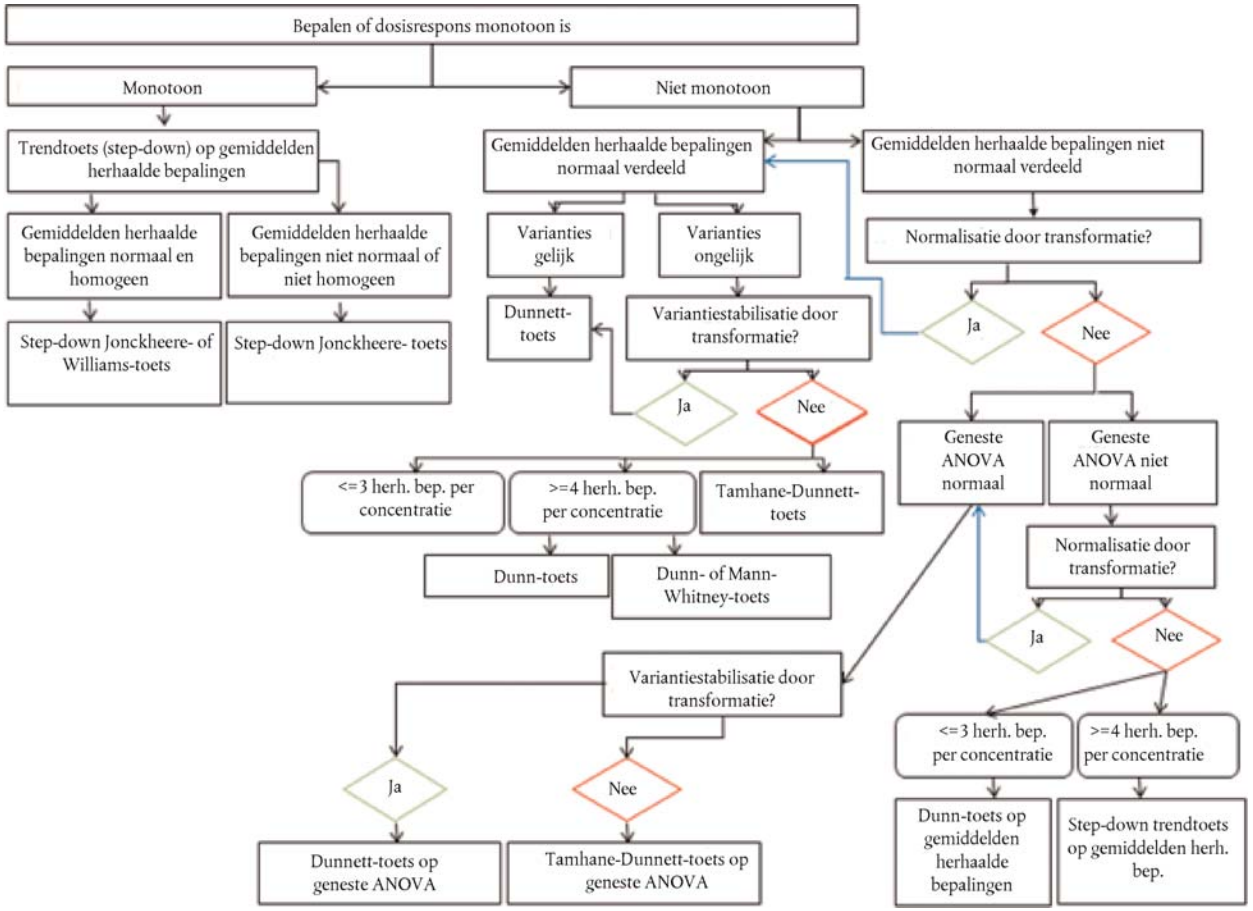
Het verrijkte monster wordt gemaakt door toevoeging van een bekende hoeveelheid van de testonafhankelijke referentienorm aan een plasmamonster van controlemannetjes. Het monster wordt verrijkt om een VTG-concentratie te bereiken die 10 tot 100 maal zo groot is als de verwachte vitellogenineconcentratie in de controlemannetjes. Het plasmamonster van controlemannetjes dat wordt verrijkt, mag afkomstig zijn van één vis of van meerdere vissen.

Een submonster van het nog niet verrijkte plasmamonster van controlemannetjes wordt ten minste in duplo geanalyseerd. Het verrijkte monster wordt eveneens ten minste in duplo geanalyseerd. De gemiddelde hoeveelheid VTG in de twee niet verrijkte plasmamonsters van controlemannetjes wordt opgeteld bij de berekende hoeveelheid VTG die is toegevoegd aan de verrijkte monsters om een verwachte concentratie te bepalen. De verhouding tussen deze verwachte concentratie en de gemeten concentratie wordt gerapporteerd samen met de resultaten van elke set tests die op die dag is uitgevoerd.

▼M7

Aanhangsel 8

BESLISDIAGRAM VOOR DE STATISTISCHE ANALYSE



▼M7

C.49. ACUTE TOXICITEITSTEST BIJ VISEMBRYO'S (FET, FISH EMBRYO ACUTE TOXICITY TEST)

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 236 (2013) van de OESO. Hierin wordt een acute toxiciteitstest bij embryo's van de zebravis (*Danio rerio*) beschreven. Deze test is opgezet om de acute toxiciteit van chemische stoffen in de embryonale stadia van vissen te bepalen. De FET-test is gebaseerd op studies en valideringsactiviteiten uitgevoerd op zebravissen (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). De FET-test is met succes toegepast op een breed scala aan chemische stoffen met verschillende werkingsmechanismen en een verschillende oplosbaarheid, vluchtigheid en hydrofobiciteit (beoordeeld in 15 en 16).

2. De in deze testmethode gebruikte definities staan in aanhangsel 1.

PRINCIPE VAN DE TEST

3. Net bevruchte eitjes van zebravissen worden gedurende 96 uur blootgesteld aan de teststof. Elke 24 uur worden tot maximaal apicale waarnemingen geregistreerd als indicatoren voor de letaliteit (6): i) coagulatie van bevruchte eitjes, ii) uitblijven van somietvorming, iii) staartknop die niet loskomt van de dooierzak en iv) geen hartslag. Aan het einde van de blootstellingsperiode wordt de acute toxiciteit bepaald aan de hand van een positief resultaat voor een van de vier geregistreerde apicale waarnemingen en wordt de LC_{50} berekend.

INLEIDENDE OVERWEGINGEN

4. De volgende informatie over stofspecifieke eigenschappen kan nuttig zijn: de structuurformule, het molecuulgewicht, de zuiverheid, de stabiliteit in water en licht, pK_a en K_{ow}, de oplosbaarheid in water en de dampspanning, evenals resultaten van een test op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid (TM C.4 (17) of TM C.29 (18)). De oplosbaarheid in water en de dampspanning kunnen worden gebruikt om de constante van de Wet van Henry te berekenen die aangeeft of verliezen vanwege verdamping van de teststof gedurende de testperiode mogelijk zijn. Er moet een betrouwbare, analytische methode, met een bekende en gerapporteerde nauwkeurigheid en detectiegrens, beschikbaar zijn voor de kwantitatieve bepaling van de stof in de testoplossingen.

5. Indien de testmethode wordt gebruikt voor het testen van een mengsel, moet de samenstelling van het mengsel in de mate van het mogelijke worden gekarakteriseerd, bv. aan de hand van de chemische identiteit van de bestanddelen, hun kwantitatieve aandeel in het mengsel en hun stofspecifieke eigenschappen (zie punt 4). Voordat de testmethode wordt gebruikt om een mengsel te testen voor regelgevingsdoeleinden, dient te worden overwogen of zij aanvaardbare resultaten zal opleveren voor het beoogde regelgevingsdoel.

6. Voor stoffen die geactiveerd kunnen worden door metabolisme bestaan er aanwijzingen dat embryo's van zebravissen inderdaad in staat zijn tot biotransformatie (19)(20)(21)(22). Het metabole vermogen van embryonale vissen is echter niet altijd vergelijkbaar met dat van jonge of volwassen vissen. Zo is de protoxische stof allylalcohol (9) bijvoorbeeld al over het hoofd gezien bij de FET. Als er aanwijzingen zijn dat metabolieten of andere relevante transformatieproducten mogelijk toxischer zijn dan de ouderverbinding, is het daarom aanbevolen om de test met die metabolieten/transformatieproducten te verrichten en om die resultaten ook te gebruiken om conclusies te formuleren over de toxiciteit van de teststof, of om een andere test te verrichten waarin meer rekening wordt gehouden met het metabolisme.

7. Voor stoffen met een molecuulgewicht van $\geq$ 3kDa, een erg omvangrijke moleculaire structuur, en stoffen die het uitkomen vertragen, waardoor er mogelijk geen of minder blootstelling plaatsvindt na het uitkomen, wordt niet verwacht dat de embryo's gevoelig zullen zijn vanwege de beperkte biobeschikbaarheid van de stof. In die gevallen kunnen andere toxiciteitstests geschikter zijn.

▼M7

GELDIGHEID VAN DE TEST

8. De uitkomsten van de test zijn alleen geldig als aan de onderstaande criteria wordt voldaan:

a) Het totale bevruchtingspercentage van alle verzamelde eitjes dient ≥ 70 % te zijn in de geteste partij.

b) De watertemperatuur in de testkamers moet gedurende de volledige test op 26 ± 1 °C worden gehouden.

c) De totale overleving van embryo's in de negatieve (verdunningswater)controle en, indien van toepassing, in de oplosmiddelcontrole, dient ≥ 90 % te zijn tot aan het eind van de blootstellingsperiode van 96 uur.

d) Blootstelling aan de positieve controle (bv. 4.0 mg/l 3,4-dichlooraniline voor zebravissen) moet tot een minimale sterfte van 30 % aan het eind van de blootstelling gedurende 96 uur leiden.

e) Het percentage uitgekomen eitjes in de negatieve controle (en de oplosmiddelcontrole, indien van toepassing), dient ≥ 80 % te zijn aan het einde van de blootstelling gedurende 96 uur.

f) Aan het einde van de blootstelling gedurende 96 uur moet het gehalte opgeloste zuurstof in de negatieve controle en de hoogste testconcentratie ≥ 80 % van de verzadiging bedragen.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

9. Aanhangsel 2 bevat een overzicht van de aanbevelingen om de vissen te houden en de aanbevolen testomstandigheden..

Apparatuur

10. De volgende uitrusting is nodig:

a) aquaria van chemisch inert materiaal (bv. glas) met een inhoud die geschikt is voor de aanbevolen densiteit (zie „Houden van broedvissen”, punt 14);

b) omgekeerde microscoop en/of binoculair met het vermogen om minimaal 80 keer te vergroten. Als de ruimte die wordt gebruikt om de waarnemingen te registeren niet op 26 ± 1 °C kan worden gebracht, kan een kruistafel met temperatuurregeling of een andere methode om de temperatuur te handhaven nodig zijn;

c) testkamers, bv. standaard-24-wells-platen met een diepte van ongeveer 20 mm (zie „testkamers”, punt 11);

d) bv. met zelfklevende folie om de 24-wells-platen te af te dekken;

e) een incubator of een ruimte met klimaatregeling en temperatuurregeling, waardoor een temperatuur van 26 ±1 °C kan worden gehandhaafd in de wells (of de testkamers);

f) pH-meter;

g) zuurstofmeter;

h) apparatuur om de hardheid van water en de geleidbaarheid te bepalen;

i) kuitbak: instrumentschalen in glas, roestvrij staal of andere inerte materialen; gaas (afmetingen van de openingen 2 ± 0,5 mm) in roestvrij staal of een ander inert materiaal om de eitjes te beschermen zodra ze zijn gelegd; kuitsubstraat (bv. imitatieplanten van inert materiaal) (TM C.48, aanhangsel 4a (23));

j) pipetten met een bredere opening om de eitjes te verzamelen;

▼M7

k) glazen recipiënten voor het bereiden van verschillende testconcentraties en verdunningswater (glazen, maatkolven, maatcilinders, meetpipetten) of om eitjes van zebravissen te verzamelen (bv. glazen, kristallisatieschaaltjes);

l) als er alternatieve blootstellingssystemen worden gebruikt, zoals doorstroming (24) of passieve dosering (25) om de test uit te voeren, zijn passende voorzieningen en uitrusting nodig.

Testkamers

11. Er moeten testkamers van glas of polystyreen worden gebruikt (bv. 24-wellsplaten met een vulcapaciteit van 2,5-5 ml per well). Als adsorptie aan polystyreen wordt vermoed (bv. voor apolaire, planaire stoffen met een hoge K_{OW}), moeten inerte materialen (glas) worden gebruikt om verliezen door adsorptie te voorkomen (26). De testkamers moeten willekeurig in de incubator worden geplaatst.

Water en testomstandigheden

12. Er wordt aanbevolen om het water waarin de vissen worden gehouden te verdunnen tot de hardheidsniveaus die kenmerkend zijn voor uiteenlopende oppervlaktewateren. Het verdunningswater moet worden bereid op basis van synthetisch water (27). De daaruit voortvloeiende hardheid moet gelijk zijn aan 100-300 mg/l $CaCO_3$ om te voorkomen dat er te veel calciumcarbonaat zou neerslaan. Ander terdege gekarakteriseerd oppervlakte- of bronwater mag worden gebruikt. Het synthetische water mag worden aangepast aan water waarin vissen worden gehouden dat een lage hardheid heeft door het te verdunnen met gedeïoniseerd water, tot een verhouding van 1:5 en een minimale hardheid van 30-35 mg/l $CaCO_3$. Het water wordt belucht tot het is verzadigd met zuurstof voordat de teststof wordt toegevoegd. De temperatuur moet gedurende de volledige test op 26 ± 1°C worden gehouden in de wells. De pH moet tussen 6,5 en 8,5 liggen en mag in de loop van de test niet met meer dan 1,5 eenheid schommelen. Als de pH naar verwachting niet binnen dit bereik zal blijven, moet de pH voordat de test wordt gestart, worden gecorrigeerd. De aanpassing van de pH moet zodanig gebeuren dat de concentratie van de stamoplossing niet in significante mate verandert en dat dit niet leidt tot een chemische reactie of neerslaan van de teststof. Er wordt aanbevolen om waterstofchloride (HCl) en natriumhydroxide (NaOH) te gebruiken om de pH in de oplossingen de teststof te corrigeren.

Testoplossingen

13. Testoplossingen van de geselecteerde concentraties kunnen bijvoorbeeld worden bereid door verdunning van een stamoplossing. De stamoplossingen wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater met mechanische middelen (bijvoorbeeld door te roeren en/of met ultrasone trillingen). Indien de teststof moeilijk oplosbaar is in water, moeten de procedures worden gevolgd die zijn beschreven in OESO-leidraad nr. 23 voor het omgaan met moeilijke stoffen en mengsels (28). Het gebruik van oplosmiddelen moet worden vermeden, maar kan in bepaalde gevallen nodig zijn om een stamoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Wanneer een oplosmiddel wordt gebruikt om te helpen bij het bereiden van de stamoplossing, mag de uiteindelijke concentratie ervan niet meer dan 100 µl/l bedragen en moet deze in alle testbakken gelijk zijn. Wanneer een oplosmiddel wordt gebruikt, moet een aanvullende oplosmiddel controle worden uitgevoerd.

Houden van broedvissen

14. Er moet een paaibestand van niet blootgestelde zebravissen van een natuurlijke stam met goed gedocumenteerde bevruchtingspercentages van eitjes worden gebruikt voor de productie van de eitjes. De vissen mogen geen macroscopisch waar te nemen symptomen van infecties of ziekten vertonen en mogen geen behandeling met (acute of profylactische) geneesmiddelen hebben ondergaan gedurende 2 maanden voor het kuitschieten. De broedvissen worden gehouden in aquaria met een aanbevolen densiteit van 1 l water

▼M7

per vis en een vaste fotoperiode van 12 — 16 uur (29)(30)(31)(32)(33). Het filterdebiet moet worden gecorrigeerd tot een optimaal debiet; een te hoog filterdebiet dat het water sterk verstoort, moet worden vermeden. Zie aanhangsel 2 voor de voederomstandigheden. Overtollig voederen moet worden vermeden en de waterkwaliteit en properheid van de aquaria moeten regelmatig worden gemonitord en indien nodig terug in de oorspronkelijke staat worden gebracht.

Bekwaamheidstoetsing

15. Als referentiestof moet 3,4-dichlooraniline (gebruikt bij de validatiestudies (1)(2)) worden getest in een volledig concentratie-responsbereik om de gevoeligheid van de gebruikte visstam te controleren, bij voorkeur twee maal per jaar. Elk laboratorium dat dit onderzoek voor het eerst opstelt, dient gebruik te maken van de referentiestof. Een laboratorium kan deze stof gebruiken om zijn technische bekwaamheden met betrekking tot het uitvoeren van de test aan te tonen vooraleer gegevens indient voor regelgevingsdoeleinden.

Eiproductie

16. Eitjes van de zebravis kunnen worden geproduceerd via kuitschieten in groepen (in aparte bakken) of massaal kuitschieten (in de aquaria). Wanneer voor kuitschieten in groepen wordt gekozen, worden de mannetjes en vrouwtjes (bv. in een verhouding van 2:1) in een kweekgroep enkele uren voordat het licht wordt gedoofd op de dag voor de test in aparte bakken gezet. Aangezien groepen zebravissen soms niet zullen kuitschieten, wordt aanbevolen om ten minste drie aparte bakken te gebruiken. Om genetische vertekening te voorkomen, worden eitjes uit ten minste drie kweekgroepen verzameld, gemengd en willekeurig geselecteerd.

17. Om de eitjes te verzamelen, worden voordat het licht wordt gedoofd op de dag voor de test of voordat het licht wordt aangedaan op de dag van de test, kuitbakken in alle paaibakken en aquaria geplaatst om het broedsel op te vangen. Om te voorkomen dat volwassen zebravissen de eitjes zouden opeten, worden de kuitbakken afgedekt met een inert gaas met een passende maaswijdte (ongeveer 2 ± 0,5 mm). Als dit nodig wordt geacht, kunnen als stimulans nepplanten uit inert materiaal (zoals kunststof of glas) aan het gaas worden bevestigd (3)(4)(5)(23)(35). Er dienen verweerde kunststofmaterialen te worden gebruikt die niet logen (bv. ftalaten). Het paren, het kuitschieten en de bevruchting vinden plaats binnen 30 minuten nadat het licht is aangedaan, en de kuitbakken met de verzamelde eitjes kunnen zorgvuldig worden weggenomen. Er wordt aanbevolen om de eitjes met synthetisch water te spoelen nadat deze uit de kuitbakken zijn gehaald.

Differentiatie van eitjes

18. Bij 26 °C ondergaan de bevruchte eitjes de eerste splitsing na ongeveer 15 min en vormen de opeenvolgende splitsingen 4, 8, 16 en 32 celblastomeren (zie aanhangsel 3)(35). In deze stadia kunnen bevruchte eitjes duidelijk worden herkend aan de ontwikkeling van een blastula.

PROCEDURE

Blootstellingsomstandigheden

19. Er worden twintig embryo's per concentratie (een embryo per well) blootgesteld aan de teststof. De blootstelling moet zo verlopen dat ± 20 % van de nominale concentratie van de chemische stof wordt gehandhaafd gedurende de test. Als dat niet mogelijk is in een statisch systeem, moet een regelbaar semistatisch verversingsinterval worden toegepast (bv. verversing om de 24 uur). In die gevallen moeten de blootstellingsconcentraties ten minste in de hoogste en laagste testconcentratie worden gecontroleerd aan het begin en het eind van elk blootstellingsinterval (zie punt 36). Als er geen blootstellingsconcentratie van ± 20 % van de nominale concentraties kan worden gehandhaafd, moeten alle testconcentraties worden gemeten aan het begin en het eind van elk blootstellingsinterval (zie punt 36). Bij het verversen moet ervoor worden gezorgd dat de embryo's bedekt blijven met een kleine hoeveelheid oude testoplossing om uitdrogen te voorkomen. De testopzet kan

▼M7

worden aangepast om aan de testvereisten van specifieke stoffen te voldoen (bv. doorstromings- (24) of passievedoseringssystemen (25) voor gemakkelijk afbreekbare of bijzonder adsorptieve stoffen (29), of andere systemen voor vluchtige stoffen (36)(37)). Hoe dan ook moet zorgvuldig te werk worden gegaan om stress voor de embryo's zoveel mogelijk te beperken. De testkamers moeten ten minste 24 uur worden behandeld met de testoplossing voordat de test wordt gestart. De testomstandigheden zijn samengevat in aanhangsel 2.

Testconcentraties

20. Normaal gezien zijn er vijf concentraties van de teststof met een constante tussenliggende factor van maximaal 2,2 nodig om aan de statistische vereisten te voldoen. Als er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet een motivering worden gegeven. De hoogste geteste concentratie moet bij voorkeur tot 100 % letaliteit leiden, en de laagste geteste concentratie moet bij voorkeur geen waarneembaar effect opleveren, zoals vastgelegd in punt 28. Met een bereikbepalingstest kan voor de definitieve test een passend concentratiebereik worden vastgesteld. De bereikbepaling wordt gewoonlijk uitgevoerd met tien embryo's per concentratie. Onderstaande instructies hebben betrekking op het uitvoeren van de test in 24-wells-platen. Als er verschillende testkamers (bv. kleine petrischaaltjes) worden gebruikt of er meer concentraties worden getest, moeten de instructies dienovereenkomstig worden aangepast.

21. Meer informatie en visuele instructies voor het toewijzen van de concentraties aan de 24-wells-platen zijn te vinden in punt 27 en aanhangsel 4, figuur 1.

Controles

22. Er zijn verdunningswatercontroles nodig als negatieve controle en als interne plaatcontrole. Als er meer dan 1 dood embryo wordt waargenomen bij de interne plaatcontrole, wordt de plaat afgekeurd, waardoor het aantal concentraties dat wordt gebruikt om de LC_{50} af te leiden, daalt. Als een volledige plaat wordt afgekeurd, kan het moeilijker worden om waargenomen effecten te beoordelen en te onderscheiden, in het bijzonder als de afgekeurde plaat de plaat met de oplosmiddelcontrole is, of een plaat waarin ook behandelde embryo's zitten. In het eerste geval moet de test worden overgedaan. In het tweede geval kan het verlies van een volledige dosisgroep vanwege interne controlesterfte het vermogen aantasten om effecten te beoordelen en LC_{50}-waarden te bepalen.

23. Voor elke partij eitjes die wordt gebruikt voor het testen, wordt een positieve controle bij een vaste concentratie van 4 mg/l 3,4-dichlooraniline verricht.

24. Als er een oplosmiddel wordt gebruikt, wordt een extra groep van 20 embryo's aan het oplosmiddel blootgesteld op een afzonderlijke 24-wells-plaat om zo als oplosmiddelcontrole te dienen. Om de test als aanvaardbaar te kunnen beschouwen, moet van het oplosmiddel worden aangetoond dat het geen significante effecten heeft op de tijd tot het uitkomen en de overleving en dat het geen schadelijke effecten heeft op de embryo's (zie punt 8c).

Start van de blootstelling en duur van de test

25. De test wordt zo snel mogelijk na de bevruchting van de eitjes gestart en wordt beëindigd na 96 uur blootstelling. De embryo's dienen voor het splitsen van de blastodiscus begint of uiterlijk tegen het 16-celstadium te worden ondergedompeld in de testoplossing. Om de blootstelling zo snel mogelijk te kunnen starten, worden uiterlijk 90 minuten na de bevruchting ten minste twee keer zoveel eitjes als nodig zijn per dosisgroep willekeurig geselecteerd en overgeplaatst naar de respectieve concentraties en controles (bv. in kristallisatieschaaltjes van 100 ml; de eitjes moeten volledig onderstaan).

26. De levensvatbare bevruchte eitjes moeten van de niet-bevruchte eitjes worden gescheiden en worden overgeplaatst naar 24-wells-platen die gedurende

▼M7

24 uur zijn voorbehandeld en opnieuw zijn gevuld met 2 ml vers bereide testoplossing per well, en dat binnen 180 minuten na de bevruchting. Met behulp van een stereoscoop (bij voorkeur met een vergroting van ≥ 30) worden bevruchte eitjes geselecteerd die aan het splitsen zijn en tijdens het splitsen geen duidelijke onregelmatigheden (bv. asymmetrie, vorming van zaadblaasjes) of letsels van het chorion vertonen. Voor het verzamelen en scheiden van de eitjes, zie aanhangsel 3, figuren 1 en 3, en aanhangsel 4, figuur 2.

Verdeling van de eitjes over de 24-wells-platen

27. De eitjes worden in de volgende aantallen over de wells-platen verdeeld (zie ook aanhangsel 4, fig. 1):

— 20 eitjes op één plaat voor elke testconcentratie;

— 20 eitjes op één plaat als oplosmiddelcontrole (indien nodig);

— 20 eitjes op één plaat als positieve controle;

— 4 eitjes in verdunningswater als interne plaatcontrole voor elk van bovenstaande platen;

— 24 eitjes in verdunningswater op één plaat als negatieve controle.

Waarnemingen

28. Voor elk getest embryo moeten onder meer de volgende waarnemingen worden gedaan: coagulatie van embryo's, uitblijven van somietvorming, staartknop die niet loskomt van de dooierzak, en afwezigheid van een hartslag (tabel 1). Deze waarnemingen worden gebruikt om de letaliteit te bepalen: een positief resultaat voor een van deze waarnemingen betekent dat het zebravisembryo dood is. Daarnaast wordt het uitkomen in de dosis- en controlegroepen dagelijks geregistreerd vanaf 48 uur. De waarnemingen worden elke 24 uur genoteerd tot aan het eind van de test.

Tabel 1

Apicale waarnemingen van acute toxiciteit bij zebravisembryo's 24-96 uur na de bevruchting

	Duur van de blootstelling			
	24 uur	48 uur	72 uur	96 uur
Gecoaguleerde embryo's	+	+	+	+
Uitblijven van somietvorming	+	+	+	+
Niet loskomen van de staart	+	+	+	+
Afwezigheid van een hartslag		+	+	+

29. *Coagulatie van het embryo*: Gecoaguleerde embryo's zijn melkwit en lijken donker onder de microscoop (zie aanhangsel 5, fig. 1). Het aantal gecoaguleerde embryo's wordt bepaald na 24, 48, 72 en 96 uur.

30. *Uitblijven van somietvorming*: Bij 26 ± 1 °C zijn er in een zebravisembryo dat zich normaal ontwikkelt, na 24 uur zo'n 20 somieten gevormd (zie aanhangsel 5, figuur 2). Een normaal ontwikkeld embryo vertoont spontane bewegingen (zijdelingse samentrekkingen). Spontane bewegingen wijzen op de vorming van somieten. De afwezigheid van somieten wordt geregistreerd na 24, 48, 72 en 96 uur. Als er na 24 uur geen somieten zijn gevormd, kan dat te wijten zijn aan een algemeen vertraagde ontwikkeling. Ten laatste na 48 uur moeten er zich somieten hebben ontwikkeld. Is dat niet het geval, dan worden de embryo's als dood beschouwd.

31. *Niet loskomen van de staart*: In een zebravisembryo dat zich normaal ontwikkelt, komt de staart los van de dooier (zie aanhangsel 5, figuur 3) na de

▼M7

elongatie van de posterieure cellen van het embryo. Het uitblijven van het loskomen van de staart wordt geregistreerd na 24, 48, 72 en 96 uur.

32. *Afwezigheid van een hartslag*: Bij 26 ± 1 °C wordt de hartslag in een zebravisembryo dat zich normaal ontwikkelt zichtbaar na 48 uur (zie aanhangsel 5, figuur 4). Bij de registratie van dit eindpunt moet bijzonder zorgvuldig te werk worden gegaan, aangezien een onregelmatige (grillige) hartslag *niet* als letaal mag worden geregistreerd. Bovendien wordt een zichtbare hartslag zonder circulatie in de aorta abdominalis als niet-letaal beschouwd. Voor de registratie van dit eindpunt moeten embryo's die geen hartslag vertonen, ten minste een minuut onder een minimale vergroting van 80x worden geobserveerd. De afwezigheid van een hartslag wordt geregistreerd na 48, 72 en 96 uur.

33. Het percentage uitgekomen eitjes van alle dosis- en controlegroepen moet worden geregistreerd en gerapporteerd vanaf 48 uur. Hoewel het uitkomen geen eindpunt is dat voor de berekening van de LC_{50} wordt gebruikt, zorgt het uitkomen er wel voor dat het embryo wordt blootgesteld zonder dat het chorion potentieel als barrière werkt, en helpt het als dusdanig om de gegevens te interpreteren.

34. De aanhangsels 3 en 5 bevatten gedetailleerde beschrijvingen van de normale (35) en voorbeelden van een abnormale ontwikkeling van zebravisembryo's.

Analytische bepalingen

35. Aan het begin en aan het eind van de test worden de pH, de totale hardheid en de geleidbaarheid in de controles en in de hoogste concentratie van de teststof gemeten. In semistatische verversingssystemen dient de pH voor en na het verversen van het water te worden gemeten. Het gehalte opgeloste zuurstof wordt aan het eind van de test gemeten in de negatieve controles en de hoogste testconcentratie met levensvatbare embryo's en dient daarin te voldoen aan de geldigheidscriteria van de test (zie punt 8f). Als er bezorgdheid bestaat over eventuele temperatuurschommelingen over de 24-wellsplaten, wordt de temperatuur gemeten in drie willekeurig gekozen bakken. De temperatuur moet bij voorkeur voortdurend worden geregistreerd tijdens de test, of ten minste een keer per dag.

36. In een statisch systeem moet de concentratie van de teststof aan het begin en het eind van de test worden gemeten in ten minste de hoogste en de laagste testconcentratie, maar bij voorkeur in alle doses. In semistatische (verversings)tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting binnen ± 20 % van de nominale waarde zal blijven, wordt aanbevolen om ten minste de hoogste en de laagste testconcentratie te testen bij de verse bereiding en onmiddellijk voorafgaand aan de verversing. Bij tests waarbij de concentratie van de teststof naar verwachting niet binnen ± 20 % van de nominale waarde zal blijven, moeten alle testconcentraties zowel bij de verse bereiding als onmiddellijk voorafgaand aan de verversing worden geanalyseerd. Wanneer het volume ontoereikend is voor een analyse, kan het nuttig zijn om testoplossingen samen te voegen of om surrogaatkamers van hetzelfde materiaal en met hetzelfde volume in verhouding tot de oppervlakte als de 24-wells-platen te gebruiken. Het is ten zeerste aanbevolen de resultaten te baseren op gemeten concentraties. Wanneer de concentraties niet binnen 80-120 % van de nominale concentratie blijven, moeten de effectconcentraties worden uitgedrukt in verhouding tot het geometrische gemiddelde van de gemeten concentraties; raadpleeg voor meer informatie hoofdstuk 5 van de OESO-leidraad voor het testen op aquatische toxiciteit bij moeilijke stoffen en mengsels (28).

LIMIETTEST

37. Er kan volgens de in deze testmethode beschreven procedures een limiettest worden uitgevoerd bij 100 mg teststof/l of (indien dit lager is) de oplosbaarheidsgrens in het testmedium om aan te tonen dat de LC_{50} hoger is dan deze concentratie. De limiettest moet worden verricht met 20 embryo's in de

▼M7

dosisgroep, de positieve controle en –indien nodig– in de oplosmiddelcontrole, en 24 embryo's in de negatieve controle. Als het percentage letaliteit bij de geteste concentratie de sterfte in de negatieve controle (of de oplosmiddelcontrole) met 10 % overschrijdt, moet er een volledige studie worden uitgevoerd. Eventuele waargenomen effecten moeten worden genoteerd. Als de sterfte in de negatieve controle (of de oplosmiddelcontrole) meer dan 10 % bedraagt, is de test ongeldig en moet hij worden overgedaan.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Verwerking van de resultaten

38. In deze test worden de afzonderlijke wells als onafhankelijke duplo's beschouwd voor de statistische analyse. Het percentage embryo's waarvoor ten minste een apicale waarneming positief is na 48 en/of na 96 uur, wordt uitgezet tegen de testconcentraties. Om de hellingen van de curve, de LC_{50}-waarden en de betrouwbaarheidslimieten (95 %) te berekenen moeten passende statistische methoden worden toegepast (38) en dient de OESO-leidraad inzake actuele benaderingen van de statistische analyse van milieugiftigheidsgegevens („Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application") te worden geraadpleegd (39).

Testverslag

39. In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen:

Teststof:

Stof die uit één component bestaat

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz. (met inbegrip van het gehalte aan organische koolstof, indien van toepassing).

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Testorganismen:

— wetenschappelijke naam, stam, bron en verzamelmethode van de bevruchte eitjes en daaropvolgende behandeling.

Testomstandigheden:

— gebruikte testprocedure (bv. semistatische verversing);

— fotoperiode;

— testopzet (bv. aantal testkamers, types controles);

— kwaliteitskenmerken van het water waarin de vissen worden gehouden (bv. pH, hardheid, temperatuur, geleidbaarheid, opgeloste zuurstof);

— gehalte opgeloste zuurstof, pH, totale hardheid, temperatuur en geleidbaarheid van de testoplossingen aan het begin en na 96 uur;

— bereidingswijze van stamoplossingen en testconcentraties, en verversingsfrequentie;

▼M7

— motivering voor het gebruik van het oplosmiddel en voor de keuze ervan, indien een ander oplosmiddel dan water wordt gebruikt;

— de nominale testconcentraties en de resultaten van alle analyses ter bepaling van de concentratie van de teststof in de testvaten; de recovery van de methode en de bepaalbaarheidsgrens moeten ook worden gerapporteerd;

— bewijs dat de controles aan het geldigheidscriterium voor de totale overleving voldeden;

— percentage bevruchte eitjes;

— percentage uitgekomen eitjes in dosis- en controlegroepen.

Resultaten:

— maximale testconcentratie die binnen de duur van de test geen sterfte veroorzaakte;

— minimale testconcentratie die binnen de duur van de test 100 % sterfte veroorzaakte;

— cumulatieve sterfte voor elke concentratie op de aanbevolen waarnemingstijdstippen;

— de LC_{50}-waarden na 96 uur (en eventueel na 48 uur) voor de sterfte binnen de betrouwbaarheidsgrenzen van 95 %, indien mogelijk;

— een grafiek van de concentratie-sterftecurve aan het eind van de test;

— sterfte in de controles (negatieve controles, interne plaatcontroles, positieve controle en eventuele oplosmiddelcontrole);

— gegevens over de resultaten voor elk van de vier apicale waarnemingen;

— incidentie en beschrijving van de morfologische en fysiologische afwijkingen, indien van toepassing (zie de voorbeelden in aanhangsel 5, figuur 2);

— incidenten in de loop van de test die gevolgen kunnen hebben gehad voor de resultaten;

— statistische analyse en behandeling van gegevens (probitanalyse, logistisch regressiemodel en geometrisch gemiddelde voor LC_{50});

— helling en betrouwbaarheidsgrenzen van de regressie van de (getransformeerde) concentratie/responscurve.

Alle afwijkingen van de testmethode en de relevante toelichting.

Bespreking en interpretatie van de resultaten.

LITERATUUR

(1) OESO (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment nr. 157, OESO, Parijs.

(2) OESO (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment nr. 179, OESO, Parijs.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼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) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Proefschrift, Technische Universität Dresden, Duitsland.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196 – 209.

(17) Hoofdstuk C.4 van deze bijlage: Gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.

(18) Hoofdstuk C.29 van deze bijlage: Gemakkelijke biologische afbreekbaarheid — CO_2 in gesloten vaten.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Hoofdstuk C.48 van deze bijlage: Test voor kortetermijneffecten op de voortplanting van vissen. Zie aanhangsel 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: Flow-through method. Beschikbaar op: [http://www.iso.org].

(28) OESO (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment nr. 23, OESO, Parijs.

(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*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, VS.

(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) Europese Commissie (2007) Aanbeveling van de Commissie van 18 juni 2007 betreffende richtsnoeren voor de huisvesting en verzorging van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (Kennisgeving geschied onder nummer C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:NL:PDF]

(33) Europese Unie (2010) Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. Publicatieblad van de Europese Unie PB L 276 van 20.10.2010, blz. 33-79

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:NL:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼M7

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Hoofdstuk C.2 van deze bijlage: *Daphnia* sp., acute immobilisatietest.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978.

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Beschikbaar op: [http://www.iso.org].

(39) OESO (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment nr. 54. OESO, Parijs.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 Umweltbundesamt Duitsland, Berlijn. 298 blz.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Apicaal eindpunt: veroorzaakt een effect op het niveau van de populatie.

Blastula: een celformatie rond de dierlijke pool die een bepaald deel van de dooier bedekt.

Chemische stof: een stof of mengsel.

Doorstroomtest: een test waarbij de testoplossingen constant door het testsysteem stromen gedurende de blootstellingsduur.

Epibolie: een massieve proliferatie van hoofdzakelijk epidermale cellen in het gastrulatiestadium van het embryo en de verplaatsing ervan van de dorsale naar de ventrale zijde, waarmee entodermale cellagen worden geïnternaliseerd tijdens een soort invaginatieproces en de dooier wordt opgenomen in het embryo.

Interne plaatcontrole: een interne controle bestaande uit 4 wells met verdunningswater per 24-wells-plaat met het oog op de identificatie van potentiële verontreiniging van de platen door de fabrikant of de onderzoeker gedurende de procedure en eventuele effecten van de plaat die van invloed kunnen zijn op de resultaten van de test (bv. temperatuurgradiënt).

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Letale-concentratiemediaan (LC_{50}): de concentratie van een teststof waarvan geraamd wordt dat zij binnen de testduur 50 % van de blootgestelde testorganismen doodt.

Semistatische (verversings) test: een test waarbij de testoplossing regelmatig wordt ververst na een bepaalde periode (bv. elke 24 uur).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Somiet: in de ontwikkeling van embryo's van gewervelde dieren zijn somieten massa's mesoderm die verdeeld zijn aan weerszijden van de neurale buis, waaruit zich uiteindelijk de dermis (dermatoom), het skeletspierweefsel (myotoom) en de wervels (sclerotoom) zullen ontwikkelen.

Statische proef: een test waarbij de testoplossingen gedurende de test ongewijzigd blijven.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

UVCB: stof met een onbekende of variabele samenstelling, complexe reactieproducten en biologische materialen.

Water waarin de vissen worden gehouden: het water waarin de dierhouderij van de volwassen vissen plaatsvindt.

▼M7

Aanhangsel 2

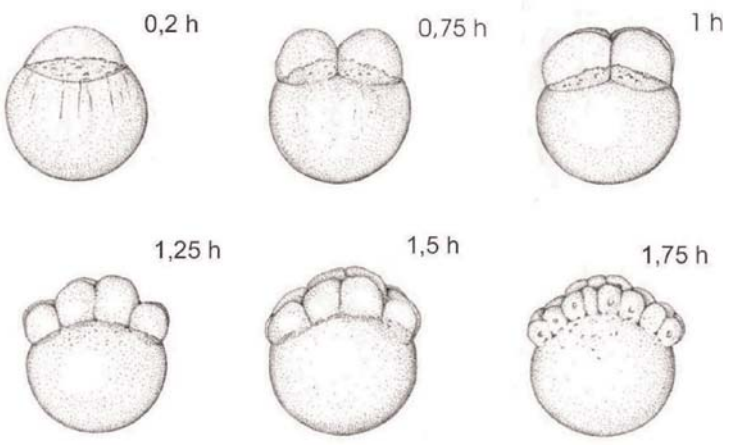
TESTOMSTANDIGHEDEN, DUUR EN OVERLEVINGSCRITERIA VOOR AANBEVOLEN VISSOORTEN

		Zebravis (*Danio rerio*)
Herkomst van de soort		India, Birma, Malakka, Sumatra
Seksuele dimorfie		Vrouwtjes: uitstekende buik wanneer zij eitjes dragen Mannetjes: slanker, oranje schijn tussen blauwe lengtestrepen (in het bijzonder zichtbaar bij de anaalvin)
Voederregime		Droge voedervlokken (max. 3 % van het gewicht van de vissen per dag) 3-5 keer per dag; aanvullend pekelkreeftjes (*Artemia* spec.) *nauplii* en/of kleine watervlooien van de juiste grootte, verkregen uit een niet-verontreinigde bron. Levend voedsel vormt een bron van milieuverrijking, daarom dient waar mogelijk steeds levend voedsel te worden gegeven. Om een optimale waterkwaliteit te garanderen moeten overtollig voedsel en fecaal materiaal ongeveer een uur na het voederen worden verwijderd.
Gemiddeld gewicht van volwassen vissen		Vrouwtjes: 0,65 ± 0,13 g Mannetjes: 0,5 ± 0,1 g
Houden van oudervissen	Verlichting	Fluorescentielampen (breed spectrum); 10-20 µE/M^2/s, 540-1080 lux, of 50-100 ft-c (laboratoriumomgeving); fotoperiode van 12-16 uur
	Watertemperatuur	26 ± 1 °C
	Waterkwaliteit	O_2 ≥ 80 % verzadiging, hardheid: bv. ~30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48mg/l, NH_4^+ en NO_2^-: < 0,001 mg/l, restchloorgehalte < 10 µg/l, totaalgehalte aan organisch chloor < 25 ng/l, pH = 6,5 — 8,5
	Aanvullende criteria voor de waterkwaliteit	Deeltjes < 20 mg/l, totaalgehalte organische koolstof < 2 mg/l, totaalgehalte organofosforpesticiden < 50 ng/l, totaalgehalte organochloorpesticiden en polychloorbifenylen < 50 ng/l
	Grootte van het aquarium waarin de vissen worden gehouden	bv. 180 l, 1 vis/l
	Waterzuivering	Voortdurend (met koolstof gefilterd); andere mogelijkheden zijn combinaties van semistatische verversing of een doorstroomsysteem met constante waterverversing
	Aanbevolen verhouding mannetjes tot vrouwtjes voor het kweken	2:1 (of massaal kuitschieten)
Bakken voor het kuitschieten		bv. bakken van 4 l met een stalen rooster onderin en nepplanten om het kuitschieten aan te moedigen; externe verwarmingsmatten, of massaal kuitschieten in het aquarium waarin de vissen worden gehouden
Structuur en uitzicht van de eitjes		Stabiel chorion (d.w.z. erg transparant, niet kleverig, diameter ~ 0,8-1,5 mm)
Snelheid van het kuitschieten		Een volwassen vrouwtje produceert ten minste 50-80 eitjes per dag. Naargelang van de belasting, kunnen de snelheden van het kuitschieten aanzienlijk hoger liggen. Het bevruchtingspercentage dient ≥ 70 % te bedragen. Bij vissen die voor het eerst kuitschieten, kan het bevruchtingspercentage van de eitjes lager liggen bij de eerste paar broedsels.
Type test		Statisch, semistatische verversing, doorstroming, 26 ± 1 °C, testkamers die 24 uur zijn voorbehandeld (bv. 24-wellsplaten 2,5-5 ml per holte)

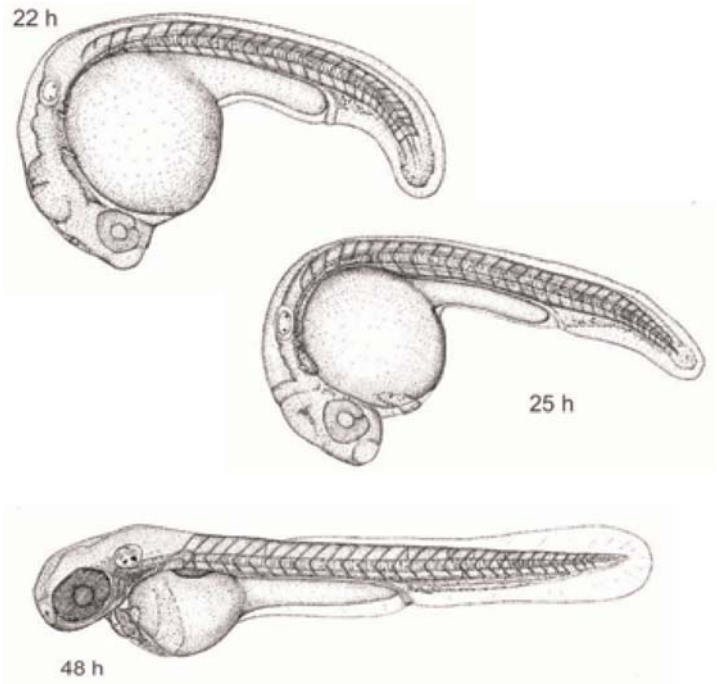
▼M7

Aanhangsel 3

NORMALE ONTWIKKELING VAN DE ZEBRAVIS BIJ 26 °C

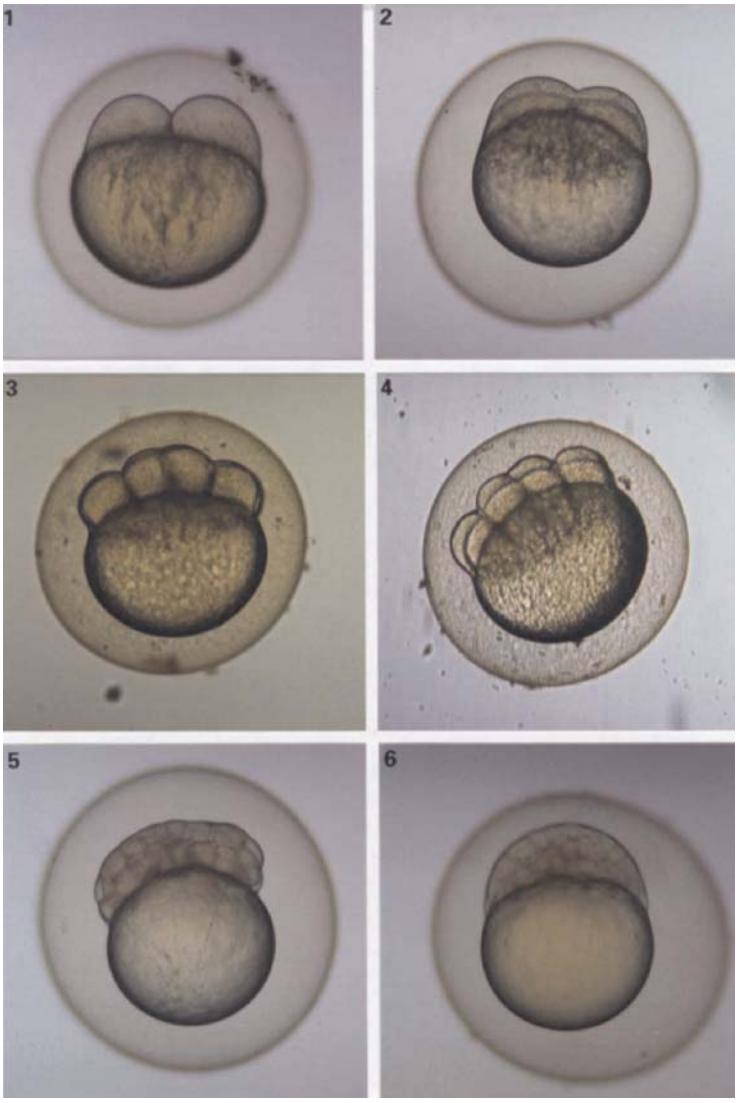


Figuur 1: Geselecteerde stadia van een vroege ontwikkeling van de zebravis (Danio rerio): 0,2 — 1,75 uur na de bevruchting (uit Kimmel *et al*., 1995 (35)). De tijdsorde van de normale ontwikkeling kan worden gehanteerd om zowel de bevruchting als de levensvatbaarheid van de eitjes te bepalen (zie punt 26: selectie van bevruchte eitjes).



Figuur 2: Geselecteerde stadia van een late ontwikkeling van de zebravis (Danio rerio) (eitjes die van het chorion zijn ontdaan om de zichtbaarheid te optimaliseren): 22 — 48 uur na de bevruchting (uit Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7



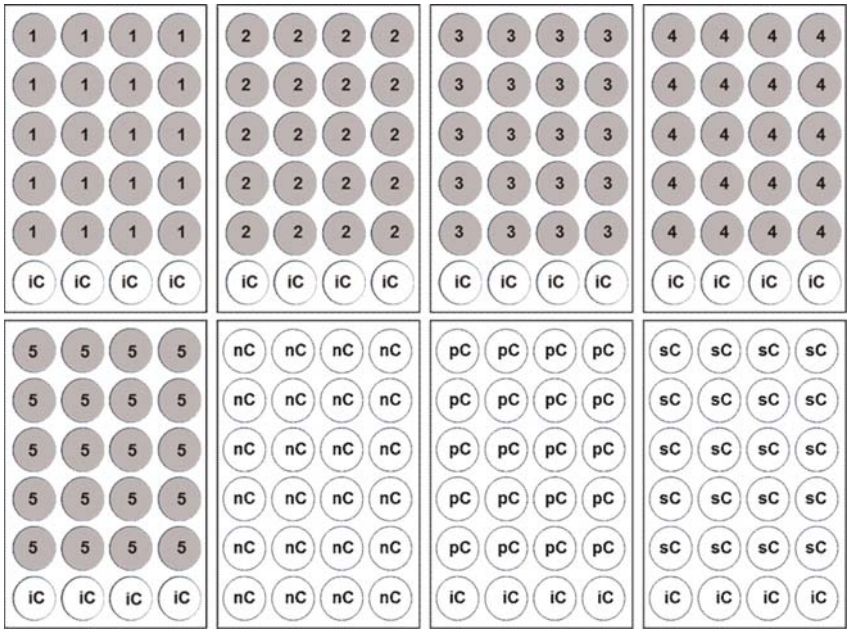
Figuur 3: Normale ontwikkeling van embryo's van de zebravis (Danio rerio): (1) 0,75 uur 2-cellig stadium; (2) 1 uur, 4-cellig stadium; (3) 1,2 uur, 8-cellig stadium; (4) 1,5 uur, 16-cellig stadium; (5) 4,7 uur, beginnende epibolie; (6) 5,3 uur, ong. 50 % epibolie (uit Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

Aanhangsel 4

Figuur 1:

Indeling van 24-wells-platen



1-5 = vijf testconcentraties / chemische stof;

nc = negatieve controle (verdunningswater);

iC = interne plaatcontrole (verdunningswater);

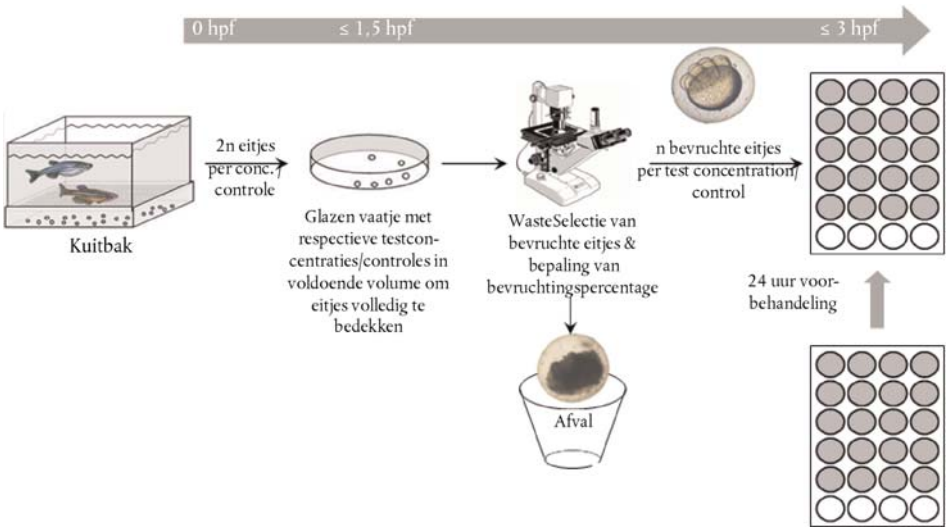
pC = positieve controle (3,4-DCA 4mg/l);

sC = oplosmiddelcontrole

▼M7

Figuur 2:

Schematische weergave van de procedure voor de acute toxiciteitstest bij zebravisembryo's (van links naar rechts): eiproductie, verzamelen van de eitjes, pre-blootstelling meteen na bevruchting in glazen bakken, selectie van bevruchte eitjes met een omgekeerde microscoop of binoculair en verdeling van bevruchte eitjes over 24-wells-platen die zijn voorbereid met de respectieve testconcentraties/controles, n = benodigd aantal eitjes per testconcentratie/controle (hier 20), hpf = uren na bevruchting.



▼M7

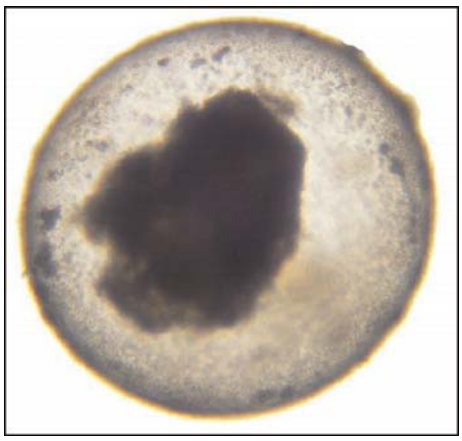
Aanhangsel 5

ATLAS VAN LETALE EINDPUNTEN VOOR DE ACUTE TOXICITEITSTEST BIJ ZEBRAVISEMBRYO'S

De volgende apicale eindpunten wijzen op acute toxiciteit en bijgevolg op de dood van de embryo's: *coagulatie van het embryo, niet loskomen van de staart, uitblijven van somietvorming en afwezigheid van een hartslag*. Om die eindpunten te illustreren werden de volgende microfoto's geselecteerd.

Figuur 1

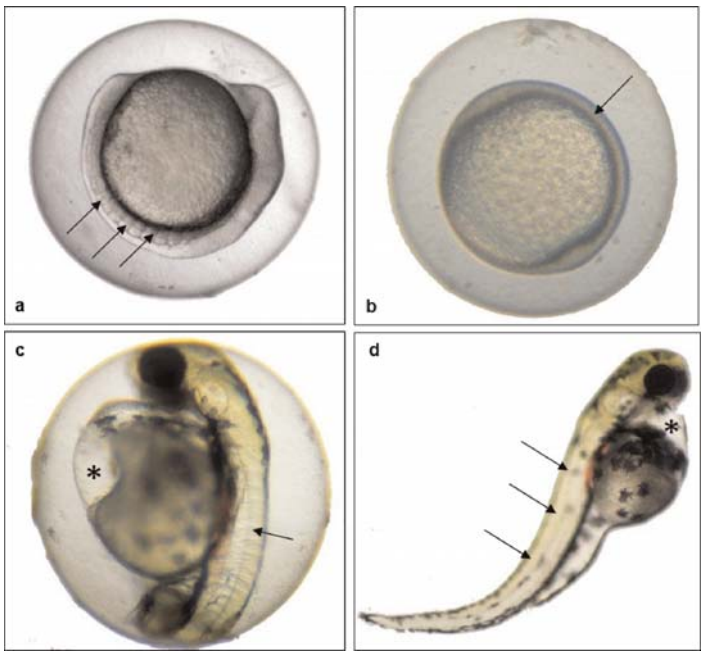
Coagulatie van het embryo:



Onder felle verlichting vertonen gecoaguleerde zebravisembryo's verschillende ondoorzichtige inclusies.

Figuur 2

Uitblijven van somietvorming:

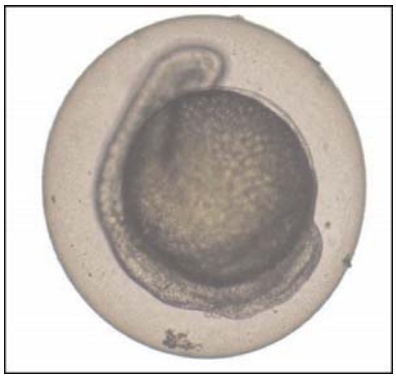


▼M7

Hoewel de ontwikkeling van het zebravisembryo met ong. 10 uur vertraagd is, vertoont het embryo van 24 uur oud in (a) goed ontwikkelde somieten (→), terwijl het embryo in (b) geen tekenen van somietvorming vertoont (→). Hoewel het zebravisembryo een uitgesproken oedeem van de dooierzak vertoont, vertoont het embryo van 48 uur oud in (c) duidelijk gevormde somieten (→), terwijl het embryo van 96 uur oud in (d) geen tekenen van somietvorming vertoont (→). Let ook op de kromming van de ruggengraat (scoliose) en het pericardiale oedeem (*) in het embryo dat te zien is in (d).

Figuur 3

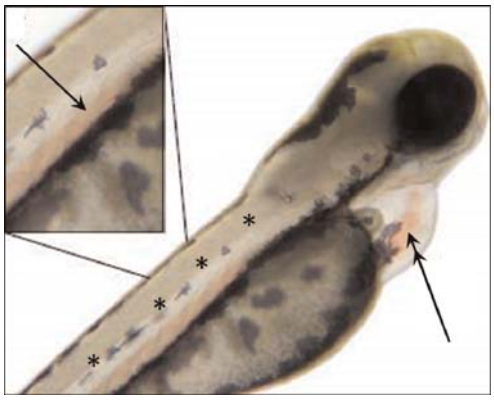
Niet loskomen van de staartknop in zijaanzicht



(a: →; zebravisembryo van 96 uur oud). Let ook op de afwezigheid van de oogknop (*).

Figuur 4

De afwezigheid van een hartslag



De afwezigheid van een hartslag is per definitie moeilijk te illustreren op een microfoto. De afwezigheid van een hartslag is te merken aan het feit dat het hart niet samentrekt (dubbele pijl). De onbeweeglijkheid van bloedcellen in bijvoorbeeld de aorta abdominalis (→ in tussenvoegsel) is geen indicator voor de afwezigheid van een hartslag. Let ook op het gebrek aan somietvorming in dit embryo (*, de spierweefsels zien er eerder homogeen dan gesegmenteerd uit). De observatietijd om de afwezigheid van een hartslag te registreren, dient ten minste een minuut te bedragen, met een minimale vergroting van 80×.

▼M7

C.50. TOXICITEITSTEST OP *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ZONDER SEDIMENT

INLEIDING

1. Deze testmethode (TM) is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 238 (2014) van de OESO. Ze is opgezet om de toxiciteit van chemische stoffen voor *Myriophyllum spicatum* te beoordelen, tweezaadlobbige waterplant uit de vederkruidfamilie. De testmethode is gebaseerd op een bestaande ASTM-testmethode (1) die werd aangepast aan een testsysteem zonder sediment (2) om de intrinsieke ecotoxiciteit van teststoffen te ramen (los van het verspreidingsgedrag van de teststof tussen water en sediment). Een testsysteem zonder sediment is eenvoudiger te analyseren (enkel in de waterfase), en de resultaten kunnen worden geanalyseerd parallel aan en/of via een vergelijking met de resultaten verkregen in de test op *Lemna sp.* (3); bovendien maken de voorgeschreven steriele omstandigheden het mogelijk om de effecten van micro-organismen en algen (opname/afbraak van chemische stoffen enz.) zo laag mogelijk te houden. Deze test is geen vervanging van andere aquatische toxiciteitstests, maar eerder een aanvulling erop, om een volledigere beoordeling van de gevaren en risico's voor waterplanten mogelijk te maken. De testmethode is door middel van een rondzendproef gevalideerd (4).

2. Tests met verversing (semistatisch) en zonder verversing (statisch) van de testoplossing worden in detail beschreven. Afhankelijk van de doelstellingen van de test en de voorschriften in de regelgeving wordt aanbevolen om een semistatische methode te gebruiken, bijvoorbeeld voor stoffen die ten gevolge van verdamping, adsorptie, afbraak onder invloed van licht, hydrolyse, neerslaan of biologische afbraak snel uit de oplossing verdwijnen. Zie (5) voor een nadere leidraad. Deze testmethode is van toepassing op stoffen waarvoor de testmethode is gevalideerd (zie details in het verslag over de rondzendproef (4)) en op formuleringen of bekende mengsels; als een mengsel wordt getest, moeten de bestanddelen ervan in de mate van het mogelijke worden geïdentificeerd en gekwantificeerd. De testmethode op *Myriophyllum spicatum* zonder sediment vormt een aanvulling op de toxiciteitstest *op Myriophyllum spicatum* in water en sediment (6). Voordat de testmethode wordt gebruikt om een mengsel te testen om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

PRINCIPE VAN DE TEST

3. Men laat constant groeiende plantenculturen van het geslacht *Myriophyllum spicatum* (enkel in gemodificeerd medium van Andrews, zie aanhangsel 2) gedurende 14 dagen als monocultuur in een testsysteem zonder sediment groeien in aanwezigheid van verschillende concentraties van de teststof. Het doel van de test is om op basis van bepalingen van gekozen meetvariabelen de effecten van de chemische stof op de vegetatieve groei gedurende deze periode kwantitatief te bepalen. De meetvariabelen zijn de groei van de scheutlengte of de zijtakken en wortels, de ontwikkeling van het vers- en drooggewicht en de toename van het aantal kransen. Daarnaast wordt rekening gehouden met kenmerkende kwalitatieve veranderingen in de testorganismen, zoals misvorming of chlorose of necrose, te merken aan een gele of wit en bruine verkleuring. Om de effecten van de stof te kwantificeren, wordt de groei in de testoplossingen vergeleken met de groei van de controles en wordt de concentratie bepaald die een specifiek percentage remming van de groeisnelheid veroorzaakt; deze wordt uitgedrukt als de EC_x; „x” kan elke waarde aannemen, naargelang van de regelgevingsvoorschriften, bv. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Er zij op gewezen dat ramingen van de EC_{10}- en EC_{20}-waarden enkel betrouwbaar en passend zijn in tests waarin de variatiecoëfficiënten in de controleplanten onder het geraamde effectniveau vallen, d.w.z. dat de variatiecoëfficiënten < 20 % moeten zijn om EC_{20} op een betrouwbare manier te kunnen ramen.

4. Zowel de gemiddelde specifieke groeisnelheid (geraamd op basis van beoordelingen van de lengte van de hoofdscheut en drie andere meetvariabelen) als de opbrengst (geraamd op basis van de toename van de lengte van de

▼M7

hoofdscheut en drie andere meetvariabelen) van de onbehandelde en behandelde planten moet worden bepaald. De specifieke groeisnelheid (r) en opbrengst (y) worden vervolgens gebruikt om respectievelijk de E_rC_x (bv E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) en de E_yC_x (bv. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) te bepalen.

5. Daarnaast kunnen langs statistische weg de laagste concentratie met waargenomen effecten (LOEC) en de concentratie zonder waargenomen effecten (NOEC) worden bepaald.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

6. Er moet een analysemethode beschikbaar zijn met een afdoende gevoeligheid voor kwantitatieve bepaling van de teststof in het testmedium. Gegevens over de teststof die nuttig kunnen zijn om de testomstandigheden vast te stellen, zijn bijvoorbeeld de structuurformule, zuiverheid, oplosbaarheid in water, stabiliteit in water en licht, de dissociatieconstante in zuur (pK_a), de octanol-waterverdelingscoëfficiënt (K_{ow}), de dampspanning en de biologische afbreekbaarheid. De oplosbaarheid in water en de dampspanning kunnen gebruikt worden om de constante van de Wet van Henry te berekenen, die aangeeft of tijdens de testperiode significante verliezen van de teststof te verwachten zijn. Mede op grond hiervan kan worden bepaald of er specifieke maatregelen moeten worden genomen om dergelijke verliezen te beperken. Wanneer de informatie over de oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof onzeker is, wordt aanbevolen deze eigenschappen te bepalen onder de omstandigheden van de test, d.w.z. in het groeimedium, bij de temperatuur en met het lichtregime zoals die in de test worden gebruikt.

7. De regulering van de pH van het testmedium is van bijzonder belang, bijvoorbeeld bij het testen van metalen of stoffen die instabiel voor hydrolyse zijn. Nadere richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysischchemische eigenschappen dat ze moeilijk te testen zijn, worden gegeven in een OESO-leidraad (5).

GELDIGHEID VAN DE TEST

8. Voor een geldige test moet de tijd waarin de lengte van de hoofdscheut verdubbelt, minder dan 14 dagen bedragen. Bij gebruik van de in deze testmethode beschreven media en testomstandigheden kan met een statisch of semistatisch testregime aan dit criterium worden voldaan.

9. De gemiddelde variatiecoëfficiënt voor de opbrengst op basis van metingen van het versgewicht van de scheuten (d.w.z. van in het begin van de test tot aan het eind van de test) en de andere meetvariabelen (zie punt 37) in de controleculturen mag niet meer dan 35 % bedragen tussen de duplo's.

10. Meer dan 50 % van de duplo's van de controlegroep wordt gedurende de blootstellingsperiode van 14 dagen steriel gehouden, wat betekent dat zij geen zichtbare verontreiniging door andere organismen zoals algen, schimmels en bacteriën mogen vertonen (heldere oplossing). *Noot*: Richtsnoeren voor het beoordelen van de steriliteit zijn te vinden in het verslag van de rondzendproef (4).

REFERENTIESTOF

11. Referentiestoffen, zoals 3,5-dichloorfenol gebruikt bij de rondzendproef (4), kunnen worden getest om de testprocedure te controleren; op basis van de gegevens van de rondzendproef moeten de gemiddelde EC_{50}-waarden van 3,5-DCP voor de verschillende responsvariabelen (zie punten 37-41 van deze testmethode) tussen 3,2 mg/l en 6,9 mg/l liggen (zie het verslag over de rondzendproef voor meer informatie over het betrouwbaarheidsinterval voor deze waarden). Het is raadzaam om een referentiestof ten minste twee keer per jaar of, wanneer de test minder frequent wordt uitgevoerd, tegelijk met de bepaling van de toxiciteit van een teststof te testen.

▼M7

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Apparatuur

12. Alle apparatuur die in aanraking komt met de testmedia, moet van glas of een ander chemisch inert materiaal gemaakt zijn. Glaswerk dat voor de culturen en de test wordt gebruikt, moet worden ontdaan van chemische verontreinigingen die in het medium terecht kunnen komen en moet steriel zijn. De testvaten moeten lang genoeg zijn opdat de scheut in de controlebakken in de waterfase kan groeien zonder dat hij het oppervlak van het testmedium bereikt tegen het einde van de test. Er wordt aanbevolen om dikwandige reageerbuizen in boorsilicaatglas zonder rand te gebruiken, met een binnendiameter van ongeveer 20 mm, een lengte van ongeveer 250 mm en een aluminium dop.

13. Aangezien het gewijzigde medium van Andrews sucrose bevat (dat de groei van schimmels en bacteriën bevordert), moeten de testoplossingen onder steriele omstandigheden worden bereid. Alle vloeistoffen en uitrusting moeten voor gebruik worden gesteriliseerd. De sterilisatie gebeurt via behandeling met verhitte lucht (210 °C) gedurende 4 uur of in de autoclaaf gedurende 20 minuten op 121 °C. Daarnaast moeten alle kolven, schaaltjes, kommen enz. en andere uitrusting vlak voor gebruik op een steriele werkbank in een open vlam worden gehouden.

14. De culturen en de testvaten mogen niet samen worden bewaard. Hiervoor kan het best worden gezorgd door aparte klimaatkasten, incubators of klimaatkamers te gebruiken. De verlichting en de temperatuur moeten kunnen worden gereguleerd en moeten constant worden gehouden.

Testorganisme

15. *Myriophyllum spicatum* — een tweezaadlobbige waterplant — een soort uit de vederkruidfamilie. Tussen juni en augustus steken onopvallende rozewitte bloemen boven het wateroppervlak uit. De planten zijn in de grond geworteld via een systeem van robuuste rizomen en komen in het gehele noordelijke halfrond voor in eutrofe maar niet verontreinigde en meer kalkhoudende stilstaande wateren met een moddersubstraat. *Myriophyllum spicatum* verkiest zoet water, maar is ook te vinden in brak water.

16. Voor de toxiciteitstest zonder sediment zijn steriele planten nodig. Als het testlaboratorium geen gewone *Myriophyllum spicatum*-culturen heeft, kan steriel plantenmateriaal worden verkregen van een ander laboratorium of kan (niet-steriel) plantenmateriaal uit het veld worden gehaald of worden aangeleverd door een commerciële leverancier. Als de planten uit het veld komen, moet de taxonomie van de soort worden gecontroleerd. Als de planten uit het veld worden gehaald of door een commerciële leverancier worden aangeleverd, moeten ze worden gesteriliseerd (1) en ten minste gedurende acht weken vóór gebruik in hetzelfde medium in cultuur worden gehouden als voor de test wordt gebruikt. Op de plaatsen die voor het verzamelen van de beginculturen worden gebruikt, mogen er geen zichtbare bronnen van verontreiniging zijn. Er moet bijzonder zorgvuldig te werk worden gegaan om ervoor te zorgen dat de juiste soort wordt verkregen wanneer *Myriophyllum spicatum* uit het veld wordt gehaald, in het bijzonder in gebieden waar deze plant zich kan vermengen met andere *Myriophyllum*-soorten. Als ze van een ander laboratorium worden betrokken, moeten ze op dezelfde manier gedurende minimaal drie weken in cultuur worden gehouden. De herkomst van het plantenmateriaal en de voor de test gebruikte soort moeten altijd worden gerapporteerd.

17. De kwaliteit en uniformiteit van de voor de test gebruikte planten zullen een significante invloed hebben op het resultaat van de test en de planten moeten dan ook met zorg worden gekozen. Er moeten jonge, snel groeiende planten worden gebruikt zonder zichtbare beschadigingen en zonder verkleuring (chlorose). Aanhangsel 4 bevat een gedetailleerde beschrijving van hoe het testorganisme moet worden geprepareerd.

Teelt

18. Om de onderhoudsfrequentie van culturen te beperken (bv. wanneer er gedurende enige tijd geen *Myriophyllum*-tests gepland zijn), kunnen de culturen onder beperkte verlichting en bij verlaagde temperatuur (50 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, 20 ± 2 °C) worden bewaard. Aanhangsel 3 bevat een gedetailleerde beschrijving van deze werkwijze.

▼M7

19. Ten minste 14 tot 21 dagen vóór de test worden voldoende testorganismen aseptisch overgezet naar vers steriel medium en gedurende 14 tot 21 dagen onder de testomstandigheden gekweekt als voorcultuur. Aanhangsel 4 bevat een gedetailleerde beschrijving voor de bereiding van een voorcultuur.

Testmedium

20. Er is slechts een nutriëntmedium aanbevolen voor *Myriophyllum spicatum* in een testsysteem zonder sediment, zoals beschreven in aanhangsel 2. Er wordt aanbevolen om het medium van Andrews te wijzigen voor het telen en testen van *Myriophyllum spicatum*, zoals beschreven in (1). Het gewijzigde medium van Andrews wordt gevormd op basis van vijf afzonderlijk bereide nutriëntstamoplossingen waaraan 3 % sucrose wordt toegevoegd. Aanhangsel 2 bevat een gedetailleerde beschrijving voor de bereiding van het medium.

21. Er is een tienvoudig geconcentreerd gewijzigd medium van Andrews nodig om de testoplossing te verkrijgen (indien nodig door verdunning). In aanhangsel 2 wordt de samenstelling van dit medium vermeld.

Testoplossingen

22. De testoplossingen worden meestal bereid door een stamoplossing te verdunnen. Stamoplossingen van de teststof worden doorgaans bereid door de stof op te lossen in gedemineraliseerd (d.w.z. gedistilleerd of gedeïoniseerd) water. De nutriënten worden toegevoegd met behulp van het tienvoudig geconcentreerde, gewijzigde medium van Andrews.

23. De stamoplossingen van de teststof kunnen worden gesteriliseerd met de autoclaaf op 121 °C gedurende 20 minuten, of met behulp van steriele filtratie, voor zover de gebruikte sterilisatietechniek de teststof niet denatureert. Testoplossingen kunnen ook worden bereid in steriel, gedemineraliseerd water of medium, onder steriele omstandigheden. Bij de selectie van de procedure om de stamoplossingen van de teststof te steriliseren, moet rekening worden gehouden met de thermische stabiliteit en de adsorptie op verschillende oppervlakken. Daarom wordt aanbevolen om de stamoplossingen te bereiden onder steriele omstandigheden, d.w.z. dat steriel materiaal wordt gebruikt om de teststof onder steriele omstandigheden (bv. vlamsterilisatie, afzuigkappen enz.) op te lossen in steriel water. Deze techniek voor het bereiden van steriele stamoplossingen is geldig voor zowel stoffen als mengsels.

24. De hoogste geteste concentratie van de teststof mag normaal gesproken niet hoger zijn dan de wateroplosbaarheid ervan onder de testomstandigheden. Voor slecht in water oplosbare teststoffen kan het nodig zijn om met een organisch oplosmiddel of dispergeermiddel een geconcentreerde stamoplossing of dispersie van de stof te maken, om nauwkeurige hoeveelheden teststof aan het testmedium te kunnen toevoegen en het dispergeren en oplossen ervan te bevorderen. Al het mogelijke moet worden gedaan om gebruik van dergelijke materialen te vermijden. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen als hulpstof mag niet tot fytotoxiciteit leiden. Vaak gebruikte oplosmiddelen die bij concentraties tot 100 µl/l geen fytotoxiciteit veroorzaken zijn bijvoorbeeld aceton en dimethylformamide. Wanneer een oplosmiddel of dispergeermiddel wordt gebruikt, moet de eindconcentratie worden gerapporteerd en tot een minimum worden beperkt (≤ 100 µl/l) en moeten alle test- en controleoplossingen dezelfde concentratie oplosmiddel of dispergeermiddel bevatten. Zie (5) voor nadere richtsnoeren voor het gebruik van dispergeermiddelen.

Dosis- en controlegroepen

25. Wanneer er vooraf iets bekend is over de toxiciteit van de teststof voor *Myriophyllum spicatum*, bijvoorbeeld uit een oriënterende test, kan dit nuttig zijn bij het kiezen van geschikte testconcentraties. Bij de definitieve toxiciteitstest

▼M7

moeten normaal gesproken ten minste vijf (zoals bij de groeiremmingstest bij Lemna-soorten, hoofdstuk C.26 van deze bijlage) tot zeven testconcentraties worden gebruikt die een meetkundige reeks vormen; de concentraties moeten zo worden gekozen dat het concentratiebereik de NOEC- en EC_{50}-waarden omvat (zie hieronder). De rede van de reeks mag bij voorkeur niet hoger zijn dan 3,2; bij een vlakke concentratie/responscurve mag echter een hogere waarde worden gebruikt. Wanneer er minder dan vijf concentraties worden gebruikt, moet een motivering worden gegeven. Voor elke testconcentratie moeten ten minste vijf replicaten worden gebruikt.

26. Bij de bepaling van het bereik van de testconcentraties (voor een oriënterende en/of de definitieve toxiciteitstest) moet rekening worden gehouden met de volgende overwegingen:

Als een EC_x wordt bepaald, moet de EC_x-waarde binnen het bereik van de testconcentraties vallen om een adequaat betrouwbaarheidsniveau te waarborgen. Als bijvoorbeeld de EC_{50} wordt bepaald, moet de hoogste testconcentratie hoger dan de EC_{50} zijn. Als de EC_{50} buiten het bereik van de testconcentraties ligt, zullen de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen groot zijn en zal een correcte bepaling van de statistische fit van het model wellicht niet mogelijk zijn.

Als het de bedoeling is de LOEC/NOEC te bepalen, moet de laagste testconcentratie zo laag zijn dat de groei niet significant lager is dan die van de controle. Bovendien moet de hoogste testconcentratie dan zo hoog zijn dat de groei significant lager is dan die van de controle. Als dit niet het geval is, moet de test met een ander concentratiebereik worden herhaald (tenzij de hoogste concentratie samenvalt met de oplosbaarheidsgrens of de hoogste grensconcentratie die vereist is, bv. 100 mg/l).

27. In elke test moeten controles worden opgenomen waarbij het nutriëntmedium, het testorganisme (plantenmateriaal dat zo homogeen mogelijk is, verse zijtakken van voorculturen, ingekort tot 2,5 cm van de voet), de milieuomstandigheden en de procedures identiek zijn aan die van de testvaten, maar zonder de teststof. Als er een oplosmiddel of dispergeermiddel als hulpstof wordt gebruikt, moet een extra controle worden opgenomen die dezelfde concentratie oplosmiddel/dispergeermiddel bevat als de vaten met de teststof. Het aantal controleduplo's (en, indien van toepassing, oplosmiddelduplo's) moet ten minste gelijk zijn aan tien.

28. Als de NOEC niet behoeft te worden bepaald, kan de testopzet zodanig worden aangepast dat het aantal concentraties wordt opgevoerd en het aantal duplo's per concentratie wordt verlaagd. Er moeten in elk geval echter minimaal tien controleduplo's worden gebruikt.

Blootstelling

29. Verse zijtakken, ingekort tot 2,5 cm vanaf de voet, worden vanuit de voorcultuur onder aseptische omstandigheden op aselecte wijze overgezet naar de testvaten; elk testvat dient een zijtak van 2,5 cm te bevatten die aan een uiteinde een meristeemtop moet hebben. Het gekozen plantenmateriaal moet in elk testvat van dezelfde kwaliteit zijn.

30. Wat de locatie van de testvaten in de incubator betreft, moet een aselecte opzet worden gehanteerd om de invloed van plaatselijke verschillen in lichtintensiteit of temperatuur zo veel mogelijk te beperken. Een blokopzet of aselecte verplaatsing van de vaten bij het doen van observaties (of frequenter verplaatsen) is ook vereist.

31. Als uit een oriënterende stabiliteitstest is gebleken dat de concentratie van de teststof in de loop van de test (14 dagen) niet op peil blijft (d.w.z. dat de gemeten concentratie lager wordt dan 80 % van de gemeten beginconcentratie), wordt een semistatische testopzet aanbevolen. In dat geval moeten de planten ten minste een keer in de loop van de test (bijvoorbeeld op dag 7)

▼M7

aan vers bereide test- en controleoplossingen worden blootgesteld. De frequentie van blootstelling aan vers medium is afhankelijk van de stabiliteit van de teststof; bij zeer instabiele of vluchtige stoffen kan een hogere frequentie nodig zijn om de concentratie nagenoeg constant te houden.

32. Blootstelling door aanbrengen op het blad (spuiten) komt in deze testmethode niet aan de orde.

Testomstandigheden

33. Er moet warm witte of koud witte fluorescerende belichting worden gebruikt om te zorgen voor een bestralingssterkte binnen het bereik 100-150 µE m^{-2} s^{-1}, gemeten binnen het voor fotosynthese effectieve golflengtebereik (400-700 nm) op punten op dezelfde afstand van de lichtbron als de bodem van het testvat (dit komt overeen met 6000 tot 9000 lux), met een licht-donker-cyclus van 16:8 uur. De methode waarmee het licht wordt gedetecteerd en gemeten, met name het type sensor, zal de gemeten waarde beïnvloeden. De voorkeur wordt gegeven aan sferische sensoren (die reageren op licht uit alle hoeken boven en onder het meetvlak) en „cosinus"-sensoren (die reageren op licht uit alle hoeken boven het meetvlak) in plaats van unidirectionele sensoren, aangezien deze een hogere uitslag geven voor een meerpuntslichtbron van het hier beschreven type.

34. De temperatuur in de testvaten moet 23 ± 2 °C zijn. In speciale gevallen, bijvoorbeeld wanneer instabiele stoffen of metalen worden getest, moet extra aandacht aan pH-verschuiving worden besteed; de pH moet binnen een bereik van 6-9 blijven. Zie (5) voor nadere richtsnoeren.

Duur

35. De test wordt 14 dagen na het overzetten van de planten naar de testvaten beëindigd.

Metingen en analyses

36. Bij de start van de test bedraagt de lengte van de hoofdscheut van het testorganisme 2,5 cm (zie punt 29); deze lengte wordt gemeten met een liniaal (zie aanhangsel 4) of met behulp van fotografie en beeldanalyse. Of de lengte van de hoofdscheut van het testorganisme normaal of abnormaal lijkt, moet worden nagegaan aan het begin van de test, ten minste één maal tijdens de blootstellingsperiode van 14 dagen en aan het einde van de test. Noot: Wie niet over beeldanalyse beschikt, kan een steriele liniaal gebruiken om aan het begin van de test en tijdens de test de lengte van de hoofdscheut te meten, voor zover de werkbank wordt gesteriliseerd voor de planten aan de testvaten worden toegevoegd. Veranderingen in de ontwikkeling van de plant, bv. qua vervorming van de scheuten, uiterlijk, verschijnselen van necrose, chlorose, breken of verlies van drijfvermogen en lengte en uiterlijk van de wortels) moeten worden geregistreerd. Ook significante kenmerken van het testmedium (bv. aanwezigheid van onopgelost materiaal, algen-, schimmel- of bacteriële groei in het testvat) moeten worden geregistreerd.

37. Naast bepalingen van de lengte van de hoofdscheut gedurende de test, moeten ook de effecten van de teststof op drie (of meer) van de volgende meetvariabelen worden bepaald:

i. totale lengte van de zijtakken

ii. totale lengte van de scheuten

iii. totale lengte van de wortels

iv. versgewicht

v. drooggewicht

vi. aantal kransen

▼M7

Aantekening 1: De waarnemingen die worden gedaan tijdens de bereikbepalingstest kunnen helpen om uit de zes variabelen die hierboven zijn opgesomd, relevante aanvullende metingen te selecteren.

Aantekening 2: Het is erg wenselijk om het vers- en het drooggewicht (parameters iv en v) te bepalen.

Aantekening 3: Doordat sucrose en licht (blootstelling van de wortels aan licht in de loop van de test) van invloed kunnen zijn op dragers die de auxines (plantenhormonen) transporteren, en doordat sommige chemische stoffen een soortgelijke werking kunnen hebben als auxines, is de opname van eindpunten voor de wortels (parameter iii) twijfelachtig.

Aantekening 4: De resultaten van de rondzendproef leveren hoge variatiecoëfficiënten (> 60 %) op voor de totale lengte van de zijtakken (parameter i). De totale lengte van de zijtakken valt in elk geval binnen de meting van de totale lengte van de scheuten (parameter ii), die een meer aanvaardbare variatiecoëfficiënt van < 30 % vertoont.

Aantekening 5: Bovenstaande overwegingen leveren de volgende aanbevolen eindpunten voor de belangrijkste metingen op: totale scheutlengte, versgewicht en drooggewicht (parameters ii, iv en v); parameter vi — aantal kransen — wordt overgelaten aan het oordeel van de onderzoeker.

38. De lengte van de hoofdscheut en het aantal kransen bieden het voordeel dat zij voor elk testvat en controlevat aan het begin, gedurende en aan het eind van de test kunnen worden bepaald met behulp van fotografie en beeldanalyse, hoewel ook een (steriele) liniaal kan worden gebruikt.

39. Aan het einde van de blootstelling kunnen met een liniaal de totale lengte van de zijtakken, de totale lengte van de wortels (als een som van alle zijtakken en wortels) en de totale lengte van de scheuten (als een som van de lengte van de hoofdscheut en de totale lengte van de zijtakken).

40. Het vers- en/of drooggewicht moet aan het begin van de test worden bepaald bij een monster van de voorcultuur dat representatief is voor wat er wordt gebruikt om de test te starten, en aan het eind van de test bij het plantenmateriaal van elk testvat en controlevat.

41. De totale lengte van de zijtakken, de totale lengte van de scheuten, de totale lengte van de wortels, het versgewicht, het drooggewicht en het aantal kransen worden als volgt bepaald:

i. Totale lengte van de zijtakken: De lengte van de zijtakken kan worden bepaald door aan het eind van de blootstelling alle zijtakken te meten met een liniaal. De totale lengte van de zijtakken is de som van alle zijtakken van elk testvat en elk controlevat.

ii. Totale lengte van de scheuten: De lengte van de hoofdscheut kan worden bepaald via beeldanalyse of met behulp van een liniaal. De totale lengte van de scheuten is de som van de totale lengte van de zijtakken en de lengte van de hoofdscheut van elk testvat en elk controlevat aan het eind van de blootstelling.

iii. Totale lengte van de wortels: De lengte van de wortels kan worden bepaald door alle wortels aan het eind van de blootstelling met een liniaal te meten. De totale lengte van de wortels is de som van alle wortels van elk testvat en elk controlevat.

iv. Versgewicht: Het versgewicht kan worden bepaald door de testorganismen te wegen aan het einde van de blootstelling. Alle plantenmaterialen

▼M7

van elk testvat en elk controlevat worden gespoeld met gedistilleerd water en afgevloeid met cellulosepapier. Na deze voorbereiding wordt het versgewicht bepaald door de plantenmaterialen te wegen. De biomassa aan het begin (versgewicht) wordt bepaald op basis van een monster van testorganismen genomen uit de batch die voor het beënten van de testvaten wordt gebruikt.

v. Drooggewicht: Na de voorbereidingen voor het bepalen van het versgewicht worden de testorganismen op 60 °C gedroogd tot constant gewicht. Deze massa is het drooggewicht. De biomassa aan het begin (drooggewicht) wordt bepaald op basis van een monster van testorganismen genomen uit de batch die voor het beënten van de testvaten wordt gebruikt.

vi. Aantal kransen: Alle kransen langs de hoofdscheut worden geteld.

Frequentie van de metingen en analyses

42. Als een statische testopzet wordt gebruikt, moet de pH van elke dosisgroep aan het begin en het eind van de test worden gemeten. Als een semistatische testopzet wordt gebruikt, moet de pH vóór elke verversing worden gemeten in elke batch „verse" testoplossing en ook in de corresponderende „gebruikte" oplossingen.

43. De lichtintensiteit moet in de klimaatkast, incubator of klimaatkamer worden gemeten op punten op dezelfde afstand van de lichtbron als de testorganismen. De metingen dienen ten minste eenmaal gedurende de test te worden uitgevoerd. De temperatuur van het medium moet ten minste eenmaal per dag (of voortdurend met een datalogger) worden gemeten in een speciaal vat dat onder dezelfde omstandigheden in de klimaatkast, incubator of klimaatkamer wordt bewaard.

44. Gedurende de test worden de concentraties van de teststof(fen) op geschikte tijdstippen bepaald. Bij statische tests moeten de concentraties in elk geval aan het begin en aan het eind van de test worden bepaald.

45. In semistatische tests waarbij de concentraties van de teststof(fen) naar verwachting niet binnen ± 20 % van de nominale concentratie zullen blijven, is het nodig om alle vers bereide testoplossingen en dezelfde oplossingen bij elke verversing te analyseren. Wanneer de gemeten beginconcentraties van de teststof(fen) niet binnen ± 20 % van de nominale concentratie liggen, maar afdoende kan worden aangetoond dat de beginconcentraties herhaalbaar en stabiel zijn (d.w.z. binnen het bereik van 80-120 % van de beginconcentratie liggen), hoeven de chemische bepalingen alleen bij de hoogste en laagste testconcentratie te worden uitgevoerd. In alle gevallen volstaat het de bepaling van de testconcentraties vóór verversing op één van de replicaatvaten voor elke testconcentratie uit te voeren (of op de gecombineerde inhoud van de replicaatvaten).

46. Als kan worden aangetoond dat de testconcentratie gedurende de gehele test op afdoende wijze binnen ± 20 % van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, kan de analyse van de resultaten op basis van de nominale of gemeten beginwaarden worden uitgevoerd. Als de afwijking ten opzichte van de nominale of gemeten beginconcentratie groter is dan ± 20 %, moet de analyse van de resultaten worden uitgevoerd op basis van het meetkundige gemiddelde van de concentratie gedurende de blootstelling of op basis van modellen waarmee de afname van de concentratie van de teststof wordt beschreven (5).

Limiettest

47. Onder bepaalde omstandigheden, bijvoorbeeld wanneer een oriënterende test erop wijst dat de teststof in concentraties tot 100 mg/l of tot de oplosbaarheidsgrens in het testmedium of, in het geval van formuleringen, tot de dispergeerbaarheidsgrens geen toxische effecten heeft, kan een limiettest worden uitgevoerd, waarbij de respons in een controlegroep en één dosisgroep

▼M7

(100 mg/ml of een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheidsgrens) wordt vergeleken. Er wordt sterk aanbevolen dit te ondersteunen met een analyse van de blootstellingsconcentratie. Alle in het voorgaande beschreven testomstandigheden en geldigheidscriteria zijn ook van toepassing bij een limiettest, behalve het aantal duplo's in de controlegroep, dat moet worden verdubbeld. De groei in de controlegroep en de dosisgroep kan geanalyseerd worden met behulp van een statistische toets om gemiddelden te vergelijken, bv. een t-toets van Student.

GEGEVENS EN RAPPORTAGE

Responsvariabelen

48. De test is bedoeld om de effecten van een teststof op de vegetatieve groei van *Myriophyllum spicatum* te bepalen. In deze testmethode worden twee responsvariabelen beschreven.

a) Gemiddelde specifieke groeisnelheid: Deze responsvariabele wordt berekend op basis van de logaritmische verandering in de lengte van de hoofdscheut en daarnaast op basis van de logaritmische verandering in andere meetparameters (totale lengte van de scheuten, versgewicht, drooggewicht of aantal kransen) in de loop van de tijd (uitgedrukt per dag) in de controlegroep en elke dosisgroep. Noot: Voor de meetparameters 'totale lengte van de zijtakken' en 'totale lengte van de wortels' kan geen gemiddelde specifieke groeisnelheid worden berekend. Aan het begin van de test heeft het testorganisme geen zijtakken of wortels (op basis van het preparaat uit de voorcultuur); als bij de waarde nul wordt begonnen, is de berekening van de gemiddelde specifieke groeisnelheid niet gedefinieerd.

b) Opbrengst: Deze responsvariabele wordt berekend op basis van veranderingen in de lengte van de hoofdscheut en daarnaast op basis van veranderingen in andere meetparameters (bij voorkeur de totale lengte van de scheuten, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen, en andere parameters die nuttig worden geacht) in de controlegroep en elke dosisgroep tot het einde van de test.

49. Toxiciteitsramingen moeten worden gebaseerd op de lengte van de hoofdscheut en drie andere meetvariabelen (bij voorkeur de totale lengte van de scheuten, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen, zie punt 37 en aantekeningen 2, 4 en 5 bij dit punt), aangezien sommige chemische stoffen bepaalde andere meetvariabelen veel sterker kunnen beïnvloeden dan de lengte van de hoofdscheut. Dit effect zou niet worden gedetecteerd als alleen de lengte van de hoofdscheut zou worden berekend..

Gemiddelde specifieke groeisnelheid

50. De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een bepaalde periode wordt voor elk controlereplicaat en elk dosisreplicaat met de volgende vergelijking berekend als de logaritmische toename van de groeivariabelen — de lengte van de hoofdscheut en drie andere meetvariabelen (totale lengte van de scheuten, versgewicht, drooggewicht of aantal kransen):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

waarbij:

μ_{i-j}: de gemiddelde specifieke groeisnelheid van tijdstip i tot tijdstip j

N_i: de meetvariabele in het test- of controlevat op tijdstip i

N_j: de meetvariabele in het test- of controlevat op tijdstip j

t: de periode van tijdstip i tot tijdstip j

▼M7

Voor elke dosisgroep en controlegroep wordt een gemiddelde waarde voor de groeisnelheid berekend en een waarde voor de variantie.

51. De gemiddelde specifieke groeisnelheid moet voor de volledige testperiode worden berekend (tijdstip „i" in bovenstaande formule is het begin van de test en tijdstip „j" is het einde van de test). Voor elke testconcentratie en controle wordt een gemiddelde waarde voor de gemiddelde specifieke groeisnelheid berekend en een waarde voor de variantie. Daarnaast moet de partiële groeisnelheid worden bepaald om effecten van de teststof gedurende de blootstellingsperiode te evalueren (bv. door inspectie van de log-getransformeerde groeicurves).

52. De procentuele remming van de groeisnelheid (I_r) kan dan voor elke testconcentratie (dosisgroep) worden berekend met de volgende formule:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

waarbij:

% Ir: : procentuele remming van de gemiddelde specifieke groeisnelheid

μC: gemiddelde waarde van μ in de controlegroep

μT: gemiddelde waarde van μ in de dosisgroep

Opbrengst

53. De effecten op de opbrengst worden bepaald op basis van de meetvariabele 'lengte van de hoofdscheut' en drie andere meetvariabelen (bij voorkeur totale lengte van de scheuten, versgewicht, drooggewicht of aantal kransen) in elk testvat aan het begin en aan het eind van de test. Voor het versgewicht of het drooggewicht wordt de biomassa aan het begin bepaald op basis van een monster van testorganismen genomen uit de batch die voor het beënten van de testvaten wordt gebruikt. Voor elke testconcentratie en controle wordt een gemiddelde waarde voor de opbrengst berekend en een waarde voor de variantie. De gemiddelde procentuele remming van de opbrengst (% I_y) kan voor elke dosisgroep als volgt worden berekend:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

waarbij:

% Iy: procentuele remming van de opbrengst

bC: biomassa aan het eind minus biomassa aan het begin in de controlegroep

bT: biomassa aan het eind minus biomassa aan het begin in de dosisgroep

Verdubbelingstijd

54. Om de verdubbelingstijd (T_d) van de lengte van de hoofdscheut te bepalen en na te gaan of aan dit geldigheidscriterium wordt voldaan (zie punt 8), wordt op de gegevens van de controlevaten de volgende formule toegepast:

$T_d = \ln 2/\mu$

Hierbij is μ de gemiddelde specifieke groeisnelheid, bepaald zoals beschreven in de punten 50-52.

▼M7

Uitzetting van de concentratie/responscurves

55. Uitzetting van de gemiddelde procentuele remming van de responsvariabele (I_r, of I_y, berekend volgens punt 53) tegen de logaritme van de concentratie van de teststof levert concentratie/responscurves op.

Schatting van de EC_x

56. De EC_x moet worden geschat op basis van zowel de gemiddelde specifieke groeisnelheid (E_rC_x) als de opbrengst (E_yC_x), in beide gevallen op basis van de totale lengte van de scheuten en eventuele andere meetvariabele (bij voorkeur de totale lengte van de scheuten, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen). De reden hiervoor is dat sommige teststoffen de lengte van de hoofdscheut anders beïnvloeden dan andere meetvariabelen. De gewenste toxiciteitsparameters zijn derhalve vier EC_x-waarden voor elk berekend remmingsniveau x: E_rC_x (lengte van de hoofdscheut); E_rC_x (bij voorkeur de totale lengte van de scheuten, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen); E_yC_x (lengte van de hoofdscheut); en E_yC_x (bij voorkeur de totale lengte van de scheuten, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen).

57. Er moet worden opgemerkt dat de met behulp van deze twee responsvariabelen berekende EC_x-waarden niet vergelijkbaar zijn, en bij gebruik van de resultaten van de test moet met dit verschil rekening worden gehouden. Vanwege de mathematische grondslagen van de respectieve benaderingen zullen de EC_x-waarden op basis van de gemiddelde specifieke groeisnelheid (E_rC_x) in de meeste gevallen hoger zijn dan de resultaten op basis van de opbrengst (E_yC_x) als de testomstandigheden van deze testmethode worden aangehouden. Dit verschil moet niet worden geïnterpreteerd als een verschil in gevoeligheid tussen de twee responsvariabelen, maar zuiver als een mathematisch verschil tussen de waarden.

Statistische procedures

58. Het is de bedoeling met behulp van regressieanalyse een kwantitatief verband tussen concentratie en respons te verkrijgen. Het is mogelijk een gewogen lineaire regressie te gebruiken nadat op de responsgegevens een lineariserende transformatie is uitgevoerd, bijvoorbeeld met probit-, logit- of Weibull-modellen (7), maar de voorkeur wordt gegeven aan niet-lineaire regressieprocedures, die beter omgaan met onvermijdelijke onregelmatigheden in gegevens en afwijkingen van uniforme verdelingen. In de buurt van het nulpunt of totale remming kunnen dergelijke onregelmatigheden door de transformatie worden uitvergroot en kunnen ze de analyse storen (7). Er moet worden opgemerkt dat standaardmethoden voor analyses met behulp van probit-, logit- of Weibull-transformaties bedoeld zijn voor gebruik bij een binaire respons (bv. sterfte of overleven) en moeten worden aangepast om voor groeisnelheid- of opbrengst-data te kunnen worden gebruikt. Specifieke procedures voor de bepaling van EC_x-waarden uit continue data zijn te vinden in (8), (9) en (10).

59. Voor elke te analyseren responsvariabele wordt de concentratie-responsrelatie gebruikt voor de berekening van puntschattingen van EC_x-waarden. Waar mogelijk moeten voor elke schatting de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen worden bepaald. De kwaliteit van de fitting van de responsgegevens op het regressiemodel moet grafisch of statistisch worden bepaald. De regressieanalyse moet met responsen van individuele replicaten worden uitgevoerd en niet met gemiddelden van dosisgroepen.

60. Als de beschikbare regressiemodellen/methoden niet geschikt zijn voor de gegevens, kunnen de EC_{50} en de betrouwbaarheidsgrenzen ook worden bepaald met behulp van lineaire interpolatie met bootstrapping (10).

61. Voor de bepaling van de LOEC en daaruit de NOEC moeten de gemiddelden van de dosisgroepen worden vergeleken met behulp van variantieanalyse-technieken (ANOVA). Het gemiddelde voor elke concentratie wordt vervolgens vergeleken met het gemiddelde van de controlegroep met behulp van een geschikte methode voor meervoudige vergelijking of trendtoets. Hiervoor kan de Dunnett- of Williams-toets geschikt zijn (12)(13)(14)(15)(16). Er moet worden bepaald of de ANOVA-aanname van homogeniteit van variantie opgaat. Deze bepaling kan grafisch worden uitgevoerd of met een

▼M7

formele toets (15). Hiervoor kan de Levene- of Bartlett-toets worden gebruikt. Wanneer de aanname van homogeniteit van variantie niet opgaat, kan dit soms worden gecorrigeerd door logaritmische transformatie van de gegevens. Als de heterogeniteit van variantie extreem is en niet door transformatie kan worden gecorrigeerd, moet een analyse met methoden als de stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere worden overwogen. Aanvullende richtsnoeren voor het bepalen van de NOEC zijn te vinden in (10).

62. Recente wetenschappelijke ontwikkelingen hebben geleid tot een aanbeveling om het begrip NOEC niet langer te gebruiken en te vervangen door op regressie gebaseerde puntschattingen van EC_x. Voor deze *Myriophyllum*-test is geen geschikte waarde voor x vastgesteld. Een interval van 10 tot 20 % lijkt geschikt (afhankelijk van de gekozen responsvariabele) en bij voorkeur moeten zowel de EC_{10} als de EC_{20} en de betrouwbaarheidsgrenzen daarvan worden gerapporteerd.

Rapportage

63. In het testverslag wordt ten minste de volgende informatie opgenomen:

Teststof

Stof die uit één component bestaat:

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatie, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz. (met inbegrip van het gehalte aan organische koolstof, indien van toepassing).

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB of mengsel:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Diersoort

— wetenschappelijke naam en herkomst.

Testomstandigheden

— gebruikte testprocedure (statisch of semistatisch);

— begindatum en duur van de test;

— testmedium;

— beschrijving van de testopzet: testvaten en deksels, volume van de oplossingen, lengte van de hoofdscheut per testvat aan het begin van de test;

— testconcentraties (nominaal en gemeten, indien van toepassing) en aantal replicaten per concentratie;

— wijze van bereiding van de stam- en testoplossingen met vermelding van het gebruik van eventuele oplosmiddelen of dispergeermiddelen;

— temperatuur tijdens de test;

— lichtbron, lichtintensiteit en homogeniteit van het licht;

— pH-waarden van de test- en controleoplossingen;

— analysemethode voor de teststof met relevante kwaliteitsborgingsgegevens (valideringsstudies, standaarddeviaties of betrouwbaarheidsgrenzen van analyses);

▼M7

— methoden om de lengte van de hoofdscheut en andere meetvariabelen te bepalen, zoals de totale lengte van de zijtakken, de totale lengte van de scheuten, de totale lengte van de wortels, het versgewicht, het droog-gewicht of het aantal kransen;

— toestand van de cultuur (steriel of niet steriel) van elk testvat en elk controlevat bij elke waarneming;

— alle afwijkingen van deze testmethode.

Resultaten

— de ruwe gegevens: de lengte van de hoofdscheut en andere meetvariabelen in elk test- en controlevat bij elke waarneming en op elk analysetijdstip;

— de gemiddelden en standaarddeviaties voor elke meetvariabele;

— de groeicurves voor elke meetvariabele;

— de berekende responsvariabelen voor elk dosisreplicaat, met het gemiddelde en de variatiecoëfficiënt voor de replicaten;

— een grafische weergave van het verband tussen concentratie en effect;

— schattingen van de toxiciteit voor responsvariabelen, zoals EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} en de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen. De LOEC en/of de NOEC, indien deze zijn berekend, en de voor de bepaling daarvan gebruikte statistische methoden;

— als ANOVA is gebruikt, de grootte van het effect dat kan worden gedetecteerd (bv. het minst significante verschil);

— een eventuele stimulering van de groei, als deze bij een behandeling is geconstateerd;

— eventuele visuele verschijnselen van fytotoxiciteit en observaties van de testoplossingen;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van een eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. et al. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* nr. 22, blz. 702–710.

(2) Hoofdstuk C.26 van deze bijlage*: Lemna-soorten: groeiremmingstest.*

(3) OESO (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, Parijs.

(4) OESO (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, Parijs.

(5) Hoofdstuk C.51 van deze bijlage: Toxiciteitstest op *Myriophyllum spicatum* in water en sediment.

(6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

▼M7

(7) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, blz. 157-167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, blz. 1485-1494.

(9) OESO (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, Parijs.

(10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, blz. 1096-1121.

(12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, blz. 482-491.

(13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, blz. 103-117.

(14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, blz. 519-531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, blz. 93-96.

▼M7

Aanhangsel 1

DEFINITIES

Biomassa: het droog- en/of versgewicht van het levende materiaal in een populatie. In deze test is de biomassa de som van de hoofdscheut, alle zijtakken en alle wortels.

Chlorose: de verandering van de kleur van het testorganisme, en in het bijzonder van de kransen, van groen naar vergeeld.

EC_x: de concentratie van de in het testmedium opgeloste teststof die binnen een bepaalde blootstellingsperiode (die expliciet moet worden vermeld als deze afwijkt van de volledige of normale duur van de test) leidt tot een afname van de groei van *Myriophyllum spicatum* met x % (bv. 50 %). Om ondubbelzinnig aan te geven of een EC-waarde gebaseerd is op de groeisnelheid of de opbrengst, worden de symbolen „E_rC" voor de groeisnelheid en „E_yC" voor de opbrengst gebruikt, gevolgd door de gebruikte meetvariabele, bv.E_rC (lengte van de hoofdscheut).

Groei: een toename van de meetvariabele, bv. de lengte van de hoofdscheut, de totale lengte van de zijtakken, de totale lengte van de scheuten, de totale lengte van de wortels, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen gedurende de testperiode.

Groeisnelheid: (gemiddelde specifieke groeisnelheid): de logaritmische toename van de meetvariabele gedurende de blootstellingsperiode. *Noot*: De responsvariabelen die verband houden met de groeisnelheid, zijn onafhankelijk van de duur van de test voor zover het groeipatroon van niet blootgestelde controleorganismen exponentieel is.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): de laagste geteste concentratie waarbij wordt waargenomen dat de stof binnen een bepaalde blootstellingstijd in vergelijking met de controle tot een statistisch significante afname van de groei ($p < 0,05$) leidt. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd.

Meetvariabelen: alle soorten variabelen die gemeten worden om aan de hand van een of meer verschillende responsvariabelen het eindpunt van de test te beschrijven. In deze testmethode zijn de meetvariabelen de lengte van de hoofdscheut, de totale lengte van de zijtakken, de totale lengte van de scheuten, de totale lengte van de wortels, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen.

Monocultuur: een cultuur met één plantensoort.

Necrose: dood (d.w.z. wit of donkerbruin) weefsel van het testorganisme.

NOEC (No Observed Effect Concentration): de testconcentratie die direct onder de LOEC ligt.

Opbrengst: de waarde van een meetvariabele om de biomassa uit te drukken aan het eind van de blootstellingstijd, verminderd met de waarde van de meetvariabele aan het begin van de blootstellingstijd. Noot: Wanneer het groeipatroon van niet blootgestelde organismen exponentieel is, nemen de responsvariabelen op basis van de opbrengst af in de loop van de test.

Responsvariabele: een variabele voor de bepaling van de toxiciteit, met uiteenlopende berekeningsmethoden afgeleid van de gemeten variabelen voor de biomassa. Voor deze testmethode worden de responsvariabelen groeisnelheid en opbrengst afgeleid van meetvariabelen zoals lengte van de hoofdscheut, totale lengte van de scheuten, versgewicht, drooggewicht of aantal kransen.

Semi-statische test (met verversing): een test waarbij de testoplossing op specifieke tijdstippen gedurende de test periodiek wordt ververst.

▼**M7**

Statische test: een testmethode waarbij de testoplossing gedurende de test niet wordt ververst.

Stof: een stof of mengsel.

Testeindpunt: de algemene factor die volgens het doel van de test door de teststof zal worden veranderd in vergelijking met de controle. Het eindpunt van deze testmethode is groeiremming, die kan worden uitgedrukt door verschillende responsvariabelen die op een of meer meetvariabelen gebaseerd zijn.

Testmedium: het volledige kunstmatige groeimedium waarin de testplanten gedurende de blootstelling aan de teststof groeien. De teststof wordt normaal gesproken in het medium opgelost.

Teststof betekent alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

UVCB: stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.

▼M7

Aanhangsel 2

GEWIJZIGD MEDIUM VAN ANDREWS VOOR STAMCULTUUR EN VOORCULTUUR

Het gewijzigde medium van Andrews voor de stamcultuur en voorcultuur wordt bereid op basis van vijf afzonderlijk bereide nutriënt-stamoplossingen, waaraan 3 % sucrose wordt toegevoegd.

Tabel 1

Samenstelling van nutriëntenoplossing van Andrews: (ASTM-aanduiding E 1913-04)

Productie van nutriënt-stamoplossingen			Productie van nutriëntenoplossingen
Voorraadoplossing	Chemische stof	Begingewicht per 1000 ml	ml per 5 l nutriëntenoplossing
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	Zie hieronder stamoplossing 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Stamoplossingen kunnen 6 maanden in een koelkast worden bewaard (bij 5-10 °C). Alleen stamoplossing nr. 5 heeft een beperkte houdbaarheid (twee maanden).

Tabel 2

Productie van stamoplossing 3.1 voor het bereiden van stamoplossing 3

Chemische stof	Begingewicht 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

Nadat stamoplossing 3.1 (tabel 2) is bereid, moet de oplossing in ongeveer 11 ml-aliquots (bij ten minste -18 °C) worden ingevroren. De ingevroren porties zijn vijf jaar houdbaar.

Om stamoplossing 3 te bereiden, ontdooit u stamoplossing 3.1, doet u 10 ml van de oplossing in een maatkolf van 1 l en voegt u ultrazuiver water toe tot aan de markering op de maatkolf.

Doe om het gewijzigde medium van Andrews te bekomen ongeveer 2500 ml ultrazuiver water in een maatkolf van 5 l. Nadat er 50 ml van elke stamoplossing is toegevoegd, vult u de maatkolf voor 90 % met ultrazuiver water en brengt u de pH op 5,8.

▼M7

Voeg vervolgens 150 g opgeloste sucrose (3 % per 5 l) toe en vul de maatkolf tot aan de markering met ultrazuiver water. Tot slot wordt de nutriëntenoplossing in een Schott-kolf van 1 l gedaan en 20 minuten in de autoclaaf behandeld op 121 °C.

De aldus geproduceerde nutriëntenoplossing kan drie maanden steriel in een koelkast worden bewaard (bij 5-10 °C).

Gewijzigd medium van Andrews voor toxiciteitstest zonder sediment

Het tienvoudig geconcentreerde, gewijzigde medium van Andrews dat nodig is om de testoplossingen te verkrijgen, wordt bereid op basis van de vijf nutriënt-stamoplossingen die reeds zijn vermeld in de tabellen 1 en 2, waaraan 30 % sucrose wordt toegevoegd. Doe daartoe ongeveer 100 ml ultrazuiver water in een maatkolf van 1 l. Nadat u 100 ml van elk van de stamoplossingen hebt toegevoegd, brengt u de pH op 5,8. Voeg vervolgens 30 % opgeloste sucrose (300 g per 1000 ml) toe en vul de maatkolf tot aan de markering met ultrazuiver water.

Tot slot wordt de nutriëntenoplossing in een Schott-kolf van 0,5 l gedaan en 20 minuten in de autoclaaf behandeld op 121 °C.

De aldus geproduceerde tienvoudig geconcentreerde gewijzigde nutriëntenoplossing kan drie maanden steriel in een koelkast worden bewaard (bij 5-10 °C).

▼M7

Aanhangsel 3

BEWARING VAN STAMCULTUREN

In dit aanhangsel 3 wordt de stamcultuur van *Myriophyllum spicatum* L ([1]), een tweezaadlobbige waterplant uit de vederkruidfamilie beschreven. Tussen juni en augustus steken onopvallende roze-witte bloemen boven het wateroppervlak uit. De planten zijn in de grond geworteld via een systeem van robuuste rizomen en komen in het gehele noordelijke halfrond voor in eutrofe maar niet verontreinigde en meer kalkhoudende stilstaande wateren met een moddersubstraat. *Myriophyllum spicatum* verkiest zoet water, maar is ook te vinden in brak water.

Voor de toxiciteitstest zonder sediment in laboratoriumomstandigheden zijn steriele planten nodig. Steriele planten zijn te verkrijgen bij het laboratorium voor ecotoxicologie van het Duitse Umweltbundesamt (het federale milieuagentschap van Duitsland).

De testorganismen kunnen ook worden bereid uit niet-steriele planten, in overeenstemming met ASTM-aanduiding E 1913-04. Zie hieronder — uittreksel uit de ASTM Standard Guide — voor de procedure om uit het veld gehaalde *Myriophyllum sibiricum* te telen:

„Als wordt vertrokken van uit het veld gehaalde, niet-steriele planten, moeten in het najaar winterknoppen van *M. sibiricum* worden verzameld. Plaats de winterknoppen in een aquarium van 20 l met 5 cm steriel sediment bedekt met kiezelzand of bijvoorbeeld Turface® en 18 l reagenswater. Belucht het aquarium en houd de temperatuur op 15 °C en de fluentiesnelheid op 200 tot 300 µmol m^{-2} s^{-1} gedurende 16 uur per dag. De plantcultuur in het aquarium kan worden gehandhaafd als reservebron van planten ingeval de steriele plantculturen worden vernietigd door een mechanische storing in de klimaatkast, verontreiniging of iets anders. De planten die in het aquarium worden geteeld, zijn niet steriel, en er kunnen geen steriele culturen worden gehouden in een cultuursysteem op basis van batches. Om de cultuur te steriliseren, worden de planten uit het aquarium gehaald en ongeveer 0,5 uur onder stromend gedeïoniseerd water gespoeld. De planten worden in minder dan 20 minuten in een laminaire-stromingskast onder aseptische omstandigheden gedesinfecteerd (tot het meeste plantenweefsel gebleekt is en enkel de groeiende top nog groen is) in een 3 % (v/v) natriumhypochlorietoplossing die 0,01 % van een geschikte oppervlakteactieve stof bevat. Schud het ontsmettingsmiddel en het plantenmateriaal. Segmenten met meerdere knopen worden naar steriele cultuurbuizen met 45 ml gesteriliseerd, gewijzigd medium van Andrews overgezet, die worden afgesloten met gewone afsluitingen voor cultuurbuizen. Er wordt slechts een plantsegment in elke testkamer geplaatst. De afsluiting wordt op het cultuurvat vastgezet met afdichtingsfolie voor laboratoria. Zodra er een steriele cultuur tot stand is gekomen, moeten plantsegmenten met meerdere knopen elke tien à twaalf dagen worden overgezet naar nieuwe testkamers met vers vloeibaar nutriëntmedium. Teelt op agarplaten heeft uitgewezen dat de planten steriel moeten zijn en achtweken steriel moeten blijven voordat de tests kunnen worden gestart."

Aangezien het gewijzigde medium van Andrews sucrose bevat (dat de groei van schimmels en bacteriën bevordert), moeten alle materialen, oplossingen en culturen onder steriele omstandigheden worden bereid. Alle vloeistoffen en uitrusting moeten voor gebruik worden gesteriliseerd. De sterilisatie gebeurt via behandeling met verhitte lucht (210 °C) gedurende 4 uur of in de autoclaaf gedurende 20 minuten op 121 °C. Daarnaast moeten alle kolven, schaaltjes, kommen enz. en andere uitrusting vlak voor gebruik op de steriele werkbank in een open vlam worden gehouden.

Stamculturen kunnen onder beperkte verlichting en bij lage temperatuur (50 µE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) geruime tijd gebruiksklaar worden bewaard. Voor *Myriophyllum* moet hetzelfde groeimedium worden gebruikt als voor de test, maar voor stamculturen kan een ander nutriëntrijk medium worden gebruikt.

([1]) Carl von Linné (* 23 mei 1707 in Råshult /Älmhult; † 10 januari 1778 in Uppsala).

▼M7

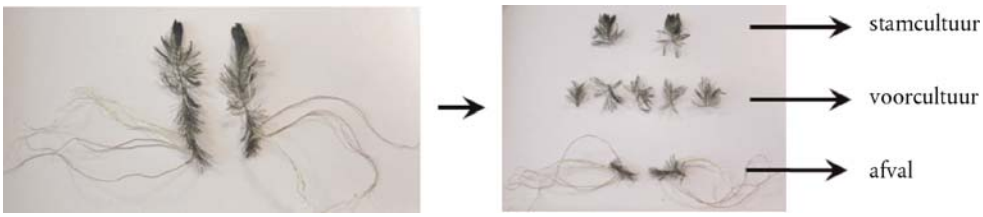
De plantsegmenten worden axenisch verdeeld over verschillende Erlenmeyers van 500 ml en/of Fernbach-kolven van 2000 ml, die gevuld worden met respectievelijk 450 en 1000 ml gewijzigd medium van Andrews. De kolven worden vervolgens axenisch afgesloten met een celluloseprop.

Daarnaast is het absoluut noodzakelijk om uitrusting op de steriele werkbank vlak voor gebruik aan een grondige vlambehandeling te onderwerpen. Naargelang van hun aantal en grootte moeten de planten ongeveer elke drie weken naar een verse nutriëntenoplossing worden overgezet.

Voor deze vernieuwde cultuur kunnen zowel toppen als segmenten van het middendeel van de stengel worden gebruikt. Het aantal en de grootte van de overgezette planten (of plantsegmenten) zijn afhankelijk van hoeveel planten er nodig zijn. Zo kunt u bijvoorbeeld vijf scheutsegmenten naar een Fernbach-kolf overzetten en drie scheutsegmenten naar een Erlenmeyer-kolf, elk met een lengte van 5 cm. Verwijder alle gewortelde, bloeiende, dode of anderszins verdachte delen.

Figuur 1:

Snijden van planten voor de stam- en voorcultuur na 3 weken teelt.



De planten moeten worden opgekweekt in een Erlenmeyer van 500 ml en een Fernbach-kolf van 2000 ml in een koelincubator bij 20 ± 2 °C, met een constante belichting van ongeveer 100-150 µE m^{-2} s^{-1} of 6000-9000 lux (afgegeven door kamerverlichting met de kleurtemperatuur „warm wit licht”).

Figuur 2:

Opkweken van planten in een koelincubator met kamerverlichting.



Er moeten chemisch zuivere (met zuur gewassen) en steriele glazen kweekvaten worden gebruikt en aseptische behandelingstechnieken worden toegepast. Bij verontreiniging van de stamcultuur door bijvoorbeeld algen, schimmels en/of bacteriën, moet een nieuwe cultuur worden bereid of moet een stamcultuur van een ander laboratorium worden gebruikt om de desbetreffende cultuur te vernieuwen.

▼M7

Aanhangsel 4

BEWARING VAN VOORCULTUREN EN VOORBEREIDING VAN TESTORGANISMEN VOOR HET TESTEN

Voor de voorcultuur snijdt u scheuten van de stamcultuur in segmenten met elk twee kransen; doe de kransen in Fernbach-kolven gevuld met gewijzigd medium van Andrews (met 3 % sucrose). Elke kolf kan maximaal 50 scheutsegmenten bevatten. Er moet wel voor worden gezorgd dat de segmenten levenskrachtig zijn en geen wortels of zijtakken op hun knoppen hebben (zie figuur 1 in aanhangsel 3).

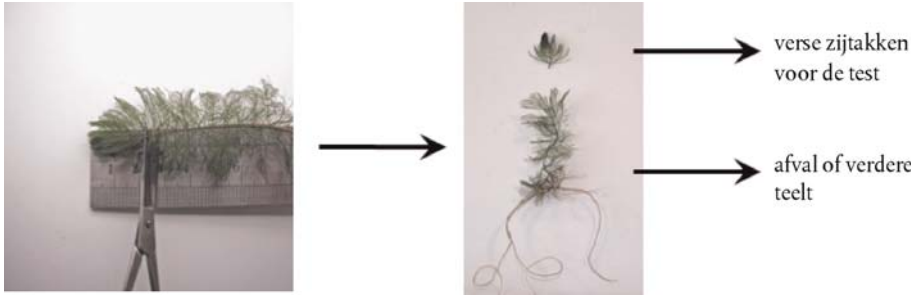
De voorcultuurorganismen worden gedurende 14 tot 21 dagen onder steriele omstandigheden opgekweekt in een klimaatkast met een afwisselende licht-/donkercyclus van 16/8 uur. De lichtintensiteit wordt gekozen uit het bereik van 100-150 µE m^{-2} s^{-1}. De temperatuur in de testvaten moet 23 ± 2 °C zijn.

Aangezien het gewijzigde medium van Andrews sucrose bevat (dat de groei van algen, schimmels en bacteriën bevordert), moet het bereiden van de teststofoplossingen en het opkweken plaatsvinden onder steriele omstandigheden. Alle vloeistoffen en uitrusting moeten voor gebruik worden gesteriliseerd. De sterilisatie gebeurt via behandeling met verhitte lucht (210 °C) gedurende 4 uur of in de autoclaaf gedurende 20 minuten op 121 °C. Daarnaast moeten alle kolven, schaaltjes, kommen enz. en andere uitrusting vlak voor gebruik op de steriele werkbank in een open vlam worden gehouden.

De scheuten worden axenisch verwijderd uit de kolven met de voorculturen, waarbij materiaal moet worden gekozen dat zo homogeen mogelijk is. Elke test moet ten minste 60 testorganismen omvatten (tests met acht teststofconcentraties). Neem voor de test verse zijtakken van voorculturen, kort ze in tot 2,5 cm van de voet (gemeten met een liniaal) en zet ze over naar een glas met steriel gewijzigd medium van Andrews. Deze verse zijtakken kunnen worden gebruikt voor de toxiciteitstest op *Myriophyllum spicatum* zonder sediment.

Figuur 2:

Snijden van planten uit de voorcultuur voor de sediment-vrije toxiciteitstest op *Myriophyllum spicatum*.



▼M7

C.51. TOXICITEITSTEST OP *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* IN WATER EN SEDIMENT

INLEIDING

1. Deze testmethode is gelijkwaardig aan testrichtlijn (TG) 239 (2014) van de OESO. Er zijn testmethoden beschikbaar voor drijvende, eenzaadlobbige planten van de soort *Lemna* (1) en voor algensoorten (2). Deze methoden worden gewoonlijk gebruikt om gegevens te genereren over de risico's van teststoffen, en in het bijzonder van chemische stoffen met een herbicide werking, op waterplanten van niet-doelsoorten. In bepaalde gevallen kunnen evenwel gegevens voor bijkomende macrofytsoorten nodig zijn. In richtsnoeren die onlangs werden gepubliceerd in het kader van de workshop inzake de beoordeling van de risico's van pesticiden voor aquatische macrofyten (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, AMRAP) van de Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), werd voorgesteld om gegevens over een gewortelde macrofytsoort te vereisen voor teststoffen waarvan bekend is dat *Lemna* en algen niet gevoelig zijn voor de werking ervan of wanneer verdeling naar het sediment een probleem kan zijn, waardoor de planten worden blootgesteld door opname via de wortels (3). Op basis van de huidige inzichten en ervaring werden *Myriophyllum* spp geselecteerd als voorkeurssoorten in gevallen waarin er gegevens moeten worden verzameld voor een tweezaadlobbige soort met wortels die onderwater groeit (4) (5) (6). Deze test is geen vervanging van andere aquatische toxiciteitstests, maar eerder een aanvulling erop, om een volledigere beoordeling van de gevaren en risico's voor waterplanten mogelijk te maken. De testmethode op *Myriophyllum spicatum* in water en sediment vormt een aanvulling op de toxiciteitstest op *Myriophyllum spicatum* zonder sediment (7).

2. In dit document wordt een testmethode beschreven waarmee de effecten van een teststof op de gewortelde waterplantsoort *Myriophyllum spicatum* in een water-sedimentsysteem kunnen worden beoordeeld. De testmethode is ten dele gebaseerd op bestaande methoden (1) (2) (8) en houdt rekening met recent onderzoek naar de risicobeoordeling voor waterplanten (3). De methode met water en sediment is gevalideerd middels een internationale rondzendproef met *Myriophyllum*-soorten die onder statische omstandigheden werden geteeld en werden blootgesteld aan de teststof via de waterkolom (9). Het testsysteem is echter eenvoudig aan te passen om rekening te houden met blootstelling via verrijkt sediment of via de waterfase in een semistatisch scenario of een scenario met stootdosering, hoewel deze scenario's niet aan een formele rondzendproef zijn onderworpen. Bovendien kan de algemene methode worden gebruikt voor andere soorten met wortels die onderwater groeien of boven het wateroppervlak uitsteken, waaronder ook andere *Myriophyllum*-soorten (bv. *Myriophyllum aquaticum*) en *Glyceria maxima* (10). Voor andere soorten kan het nodig zijn om de omstandigheden, de opzet en de duur van de test aan te passen. Er is in het bijzonder aanvullend onderzoek nodig om passende procedures vast te stellen voor *Myriophyllum aquaticum*. Deze opties worden niet gedetailleerd beschreven in deze testmethode, waarin de standaardaanpak voor blootstelling van *Myriophyllum spicatum* in een statisch systeem via de waterfase wordt beschreven.

3. Deze testmethode is van toepassing op stoffen waarvoor de testmethode is gevalideerd (zie details in het verslag over de rondzendproef (9)) en op formuleringen of bekende mengsels. Een test op *Myriophyllum* kan worden verricht om te voldoen aan een gegevensvereiste van fase 1 naar aanleiding van potentiële verdeling van een teststof naar het sediment of problemen met de werking/selectiviteit. Er kan ook een *Myriophyllum*-test in een laboratorium worden voorgeschreven als onderdeel van een strategie in een hogere fase om problemen met de risico's voor waterplanten aan te pakken. De specifieke reden voor het uitvoeren van een test bepaalt de gekozen blootstellingsroute (d.w.z. via het water of via het sediment). Voordat de testmethode wordt gebruikt om een mengsel te testen om gegevens te genereren voor een beoogd regelgevingsdoel, moet worden nagegaan of, en zo ja, waarom deze methode betrouwbare resultaten oplevert voor dat doel. Zulke overwegingen zijn niet nodig wanneer het testen van het mengsel wettelijk vereist is.

▼M7

PRINCIPE VAN DE TEST

4. De test is opgezet om de effecten van chemische stoffen op de vegetatieve groei van in gestandaardiseerde media (water, sediment en nutriënten) groeiende *Myriophyllum*-planten te beoordelen. Daartoe worden scheuttoppen van gezonde, niet-bloeiende planten in gestandaardiseerd, kunstmatig sediment aangevuld met extra nutriënten gepot om een goede plantengroei te verzekeren en worden zij vervolgens in medium van Smart en Barko gehouden (aanhangsel 1). Na een kiemperiode waarin de planten wortels vormen, worden zij blootgesteld aan een reeks testconcentraties die aan de waterkolom worden toegevoegd. Bij wijze van alternatief kan blootstelling via het sediment worden gestimuleerd door het kunstmatige sediment te verrijken met de teststof en de planten te verplanten naar dat verrijkte sediment. In beide gevallen worden de planten vervolgens gedurende 14 dagen in gecontroleerde milieuomstandigheden gehouden. De effecten op de groei worden vastgesteld op basis van kwantitatieve beoordelingen van de scheutlengte, het versgewicht en het drooggewicht en van kwalitatieve waarnemingen van symptomen zoals chlorose, necrose of groeimisvormingen.

5. Om de effecten van de stof te kwantificeren, wordt de groei in de testoplossingen vergeleken met de groei van de controleplanten en wordt de concentratie bepaald die een specifiek percentage remming van de groeisnelheid veroorzaakt; deze wordt uitgedrukt als de EC_x; „x” kan elke waarde aannemen, naargelang van de regelgevingsvoorschriften, bv. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Er zij op gewezen dat ramingen van de EC_{10}- en EC_{20}-waarden enkel betrouwbaar en passend zijn in tests waarin de variatiecoëfficiënten in de controleplanten onder het geraamde effectniveau vallen, d.w.z. dat de variatiecoëfficiënten < 20 % moeten zijn om EC_{20} op een betrouwbare manier te kunnen ramen.

6. Zowel de gemiddelde specifieke groeisnelheid (geraamd op basis van beoordelingen van scheutlengte, versgewicht en drooggewicht) als de opbrengst (geraamd op basis van de toename van scheutlengte, versgewicht en drooggewicht) van de onbehandelde en behandelde planten moet worden bepaald. De specifieke groeisnelheid (r) en opbrengst (y) worden vervolgens gebruikt om respectievelijk de E_rC_x (bv E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) en de E_yC_x (bv. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) te bepalen.

7. Indien nodig kunnen langs statistische weg op basis van ramingen van de gemiddelde specifieke groeisnelheden en opbrengst de laagste concentratie met waargenomen effecten (LOEC) en de concentratie zonder waargenomen effecten (NOEC) worden bepaald.

INFORMATIE OVER DE TESTSTOF

8. Er moet een analysemethode beschikbaar zijn met een afdoende gevoeligheid voor kwantitatieve bepaling van de stoffen in het testmedium.

9. Gegevens over de teststof die nuttig kunnen zijn om de testomstandigheden vast te stellen, zijn bijvoorbeeld de structuurformule, de samenstelling in het geval van stoffen met meerdere bestanddelen, UVCB's, mengsels of formules, de zuiverheid, de oplosbaarheid in water, de stabiliteit in water en licht, de dissociatieconstante in zuur (pK_a), de octanol-waterverdelingscoëfficiënt (K_{ow}), de K_d naar het sediment, indien beschikbaar, de dampspanning en de biologische afbreekbaarheid. De oplosbaarheid in water en de dampspanning kunnen gebruikt worden om de constante van de Wet van Henry te berekenen, die aangeeft of tijdens de testperiode significante verliezen van de teststof te verwachten zijn. Als er verliezen te verwachten zijn, dienen die verliezen te worden gekwantificeerd en moeten de stappen die vervolgens worden genomen om die verliezen te beperken, worden gedocumenteerd. Wanneer de informatie over de oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof(fen) onzeker is, wordt aanbevolen deze eigenschappen te bepalen onder de omstandigheden van de test, d.w.z. in het groeimedium, bij de temperatuur en met het lichtregime zoals die in de test worden gebruikt. *NB:* wanneer lichtafhankelijke peroxiderende herbiciden worden getest, moet de verlichting in het laboratorium evenveel ultraviolet licht van de zon bevatten als het daglicht.

▼M7

10. De pH in het testmedium moet worden gemeten en indien nodig gecorrigeerd. De regulering van de pH van het testmedium is van bijzonder belang, bijvoorbeeld bij het testen van metalen of chemische stoffen die instabiel voor hydrolyse zijn. Nadere richtsnoeren voor het testen van stoffen met zodanige fysisch-chemische eigenschappen dat ze moeilijk te testen zijn, worden gegeven in een OESO-leidraad (11).

GELDIGHEID VAN DE TEST

11. De uitkomsten van de test zijn alleen geldig als de gemiddelde totale lengte van de scheuten en het gemiddelde totale versgewicht van de scheuten in de controleplanten ten minste verdubbelen tijdens de blootstellingsfase van de test. Daarnaast mogen de controleplanten geen zichtbare tekenen van chlorose vertonen en mogen zij niet zichtbaar verontreinigd zijn door andere organismen, zoals algen en/of een bacteriënfilm op de plant, op het sedimentoppervlak of in het testmedium.

12. De gemiddelde variatiecoëfficiënt voor de opbrengst op basis van metingen van het versgewicht van de scheuten (d.w.z. van in het begin van de test tot aan het eind van de test) in de controleculturen mag niet meer dan 35 % bedragen tussen de duplo's.

REFERENTIESTOF

13. Om de prestaties van de testprocedure in de loop van de tijd te controleren moeten een of meer referentiestoffen worden getest, zoals 3,5-dichloorfenol dat in het internationale ringonderzoek is gebruikt (9). De gegevens van de rondzendproef geven aan dat de gemiddelde EC50-waarden van 3,5-DCP voor de verschillende responsvariabelen tussen 4,7 en 6,1 mg/l bedroegen (zie het verslag van de rondzendproef voor gegevens over het verwachte betrouwbaarheidsinterval rond deze waarden). Het is raadzaam om een referentiestof ten minste twee keer per jaar of, wanneer de test minder frequent wordt uitgevoerd, tegelijk met de definitieve toxiciteitstests te testen. Het statistische verslag over de internationale rondzendproef (9) bevat richtsnoeren ten aanzien van de verwachte EC_{50}-waarden voor 3,5-DCP.

BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Testapparatuur

14. De test moet worden verricht onder gecontroleerde milieuomstandigheden, d.w.z. in een klimaatkast, klimaatkamer of laboratorium met een regelbare daglengte, belichting en temperatuur (zie het onderdeel „Testomstandigheden”, punten 56-58). De stamculturen dienen gescheiden van de testvaten te worden bewaard.

15. Het onderzoek moet worden verricht met glazen testvaten, zoals aquaria of glazen; gewoonlijk worden bekerglazen van 2 l (ongeveer 24 cm hoog en 11 cm diameter) gebruikt. Andere (grotere) vaten kunnen echter ook geschikt zijn, voor zover de waterdiepte voldoende is om een onbeperkte groei toe te laten en de planten gedurende de volledige test onder water te houden.

16. Kunststoffen of glazen plantenpotten (met een diameter van ongeveer 9 cm, een hoogte van 8 cm en een volume van 500 ml) kunnen worden gebruikt als recipiënt om de planten in het sediment te potten. Als alternatief kunnen ook bekerglazen worden gebruikt. Die genieten in sommige gevallen zelfs de voorkeur (bv. bij het testen van hydrofobe chemische stoffen of chemische stoffen met een hoge K_{ow}).

17. De keuze voor de pot/glasgrootte moet worden overwogen in combinatie met de keuze van de testvaten en de optimale testopzet (zie hieronder). Als testopzet A wordt gebruikt (een scheut per pot met drie potten per vat), dan zijn mogelijk kleinere potten of grotere vaten nodig. Als testopzet B wordt gebruikt (drie scheuten per pot met een pot per vat), dan moeten de afmetingen van de desbetreffende pot en vaten toereikend zijn. In alle gevallen moet het bovenliggende water ten minste 12 cm diep zijn boven de bovenzijde van het sediment, en moet de verhouding van sedimentoppervlakte/volume tot wateroppervlakte/volume worden genoteerd.

▼M7

Testorganisme

18. De algemene aanpak die in deze testmethode wordt beschreven, kan worden gebruikt om verschillende soorten waterplanten te testen. De omstandigheden die in deze testmethode zijn vastgesteld, zijn echter toegespitst op het testen van de vederkruidsoort *Myriophyllum spicatum*. Deze soort behoort tot de familie van de tweezaadlobbigen, Haloragaceae.

19. *Myriophyllum spicatum* (aarvederkruid) is een onderwatersoort met wortels die uiteenlopende omstandigheden kan verdragen en zowel in stilstaand als stromend water voorkomt. *M. spicatum* is een overblijvende plant die in de winter afsterft tot op de wortels. De planten zullen gewoonlijk vanzelf bloeien en zaadzetten, hoewel vegetatieve vermeerdering op basis van okselknoppen of scheutfragmenten die op natuurlijke wijze of na verstoring afbreken, vaak de voornaamste methode van kolonisatie is.

Kweken van het testorganisme

20. Planten kunnen uit populaties in de natuur worden gehaald of via leveranciers van waterplanten worden verkregen. In beide gevallen moet de herkomst van de planten worden gedocumenteerd en de identiteit van de soort worden nagegaan. Er moet bijzonder zorgvuldig te werk worden gegaan om ervoor te zorgen dat de juiste soort wordt verkregen wanneer *Myriophyllum spicatum* uit het veld wordt gehaald, in het bijzonder in gebieden waar deze plant zich kan vermengen met andere *Myriophyllum*-soorten. Bij twijfel wordt aanbevolen om geverifieerde laboratoriumculturen te gebruiken waarvan de herkomst bekend is. Planten die zijn blootgesteld aan chemische verontreiniging of zijn verzameld op plekken waarvan bekend is dat zij verontreinigd zijn, mogen niet worden gebruikt in deze test.

21. In gebieden waar *M. spicatum* tijdens de wintermaanden niet verkrijgbaar is, kan het nodig zijn om op de lange termijn stamculturen te bewaren in kassen of in het laboratorium. De stamculturen moeten onder soortgelijke omstandigheden worden bewaard als de testomstandigheden, hoewel de bestralingssterkte en de temperatuur kunnen worden verlaagd om de onderhoudsfrequentie van de culturen te beperken (bv. wanneer er gedurende enige tijd geen *Myriophyllum*-tests gepland zijn). Er wordt aanbevolen om grotere aquaria en plantenpotten te gebruiken dan bij de tests om de planten de ruimte te geven om zich te vermenigvuldigen. De samenstelling van het sediment- en het watermedium moet dezelfde zijn als bij de tests, hoewel er alternatieve methoden om het sediment te bemesten kunnen worden toegepast (bv. door langwerkende, commerciële meststoffen te gebruiken).

22. De stamplanten mogen niet zichtbaar verontreinigd zijn met andere organismen, zoals slakken, draadalgen, schimmels of insecten, zoals eitjes of larven van de mot *Paraponyx stratiotata* en larven of volwassen dieren van de curculionidae *Eubrychius velutus*. Het kan nodig zijn om het plantenmateriaal in zoet water te spoelen om zichtbare verontreiniging weg te nemen. Daarnaast moeten inspanningen worden geleverd om de ontwikkeling van eencellige algen en bacteriële verontreiniging zoveel mogelijk tegen te gaan, hoewel het plantenmateriaal niet volledig steriel hoeft te zijn. De stamculturen moeten worden gemonitord en indien nodig worden verplant om de ontwikkeling van algen en verontreiniging met bacteriën tegen te gaan. Als verontreiniging met algen of bacteriën een probleem wordt, kan het nuttig zijn om de stamculturen te beluchten.

23. In alle gevallen moeten de planten tijdens een voldoende lange periode voordat zij bij een test worden gebruikt (d.w.z. > 2 weken), worden opgekweekt/geacclimatiseerd onder soortgelijke (zij het niet noodzakelijk identieke) omstandigheden als die welke bij de test zullen worden gebruikt.

24. Bloeiende stamculturen mogen niet worden gebruikt bij tests, aangezien de vegetatieve groeisnelheid tijdens en na het bloeien gewoonlijk afneemt.

▼M7

Sediment

25. Voor deze test wordt het volgende samengestelde sediment op basis van het in hoofdstuk C.28 van deze bijlage (8) gebruikte kunstmatige sediment aanbevolen. Het sediment wordt bereid zoals beschreven in testmethode C.28, waaraan de volgende nutriënten worden toegevoegd:

a) 4-5 % turf (drooggewicht, op basis van 2 ± 0,5 % organische koolstof) met een pH zo dicht mogelijk bij 5,5 à 6,0; het is belangrijk dat fijngemalen turf in poedervorm (deeltjesgrootte < 1 mm) wordt gebruikt dat alleen aan de lucht is gedroogd;

b) 20 % (drooggewicht) kaolienklei (met bij voorkeur meer dan 30 % kaoliniet);

c) 75-76 % (drooggewicht) kwartszand (overwegend bestaande uit fijn zand; meer dan 50 % van de deeltjes moet een grootte tussen 50 en 200 μm hebben).

d) Er wordt een waterig nutriëntmedium toegevoegd zodat de uiteindelijke batch sediment 200 mg/kg droog sediment van zowel ammoniumchloride als natriumfosfaat bevat en het vochtgehalte van het uiteindelijke mengsel 30-50 % bedraagt.

e) Er wordt chemisch zuiver calciumcarbonaat ($CaCO_3$) toegevoegd om het uiteindelijke sedimentmengsel een pH van 7,0 ± 0,5 te geven.

26. De bron van de turf, de kaolienklei en het zand moet bekend en gedocumenteerd zijn. Als de herkomst onbekend is of tot bezorgdheid strekt, moeten de respectieve bestanddelen van het sediment worden gecontroleerd op verontreiniging met chemische stoffen (bv. zware metalen, organische chloor- en fosforverbindingen).

27. De droge bestanddelen van het sediment moeten homogeen worden gemengd alvorens de waterige nutriëntenoplossing grondig door het sediment wordt gemengd. Het vochtige sediment moet ten minste twee dagen voor gebruik worden bereid om de turf grondig te doordrenken en te voorkomen dat hydrofobe turfdeeltjes naar het oppervlak zouden drijven wanneer het sediment onder de media wordt gezet; het vochtige sediment kan voor gebruik in het donker worden bewaard.

28. Voor de test wordt het sediment overgebracht in recipiënten met geschikte afmetingen, zoals plantenpotten met een diameter die in de glazen vaten past (de sedimentoppervlakte moet ongeveer 70 % of meer van de oppervlakte van het vat beslaan). Wanneer er gaten in de bodem van het recipiënt zitten, helpt een stukje filterpapier onderaan het recipiënt om het sediment in het recipiënt te houden. De potten worden gevuld met een effen laag sediment, die vervolgens wordt bedekt met een dunne laag (~ 2 à 3 mm) inert materiaal zoals zand, fijn tuingrind (of gemalen koraal) om het sediment op zijn plaats te houden.

Testmedium

29. Er wordt aanbevolen om voor het opkweken en testen van *Myriophyllum spicatum* medium van Smart en Barko (12) te gebruiken. De bereiding van dit medium wordt in aanhangsel 1 beschreven. Voor een optimale plantengroei, moet het medium (de waterfase) aan het begin van de test een pH-waarde tussen 7,5 en 8,0 hebben.

Proefopzet

30. De test moet worden verricht in ten minste zes duplovaten voor de onbehandelde controle en ten minste vier duplovaten voor elk van ten minste vijf concentratieniveaus.

31. Als de NOEC niet behoeft te worden bepaald, kan de testopzet zodanig worden aangepast dat het aantal concentraties wordt opgevoerd en het aantal duplo's per concentratie wordt verlaagd.

▼M7

32. Elk testvat vertegenwoordigt een duplo met drie scheuten. Er zijn twee opties voor het opkweken van drie scheuten per testvat:

— testopzet A: een scheut per pot en drie potten per vat;

— testopzet B: drie scheuten per pot en een pot per vat.

— Een alternatieve testopzet waarbij een scheut per pot per testvat wordt opgekweekt, kan worden aanvaard voor zover de duplo's worden gecorrigeerd om aan de vereiste geldigheidscriteria te voldoen.

33. De afzonderlijke testvaten moeten aselect worden toegewezen aan de dosisgroepen. Wat de locatie van de testvaten in het testgebied betreft, moet een aselecte opzet worden gehanteerd om de invloed van plaatselijke verschillen in lichtintensiteit of temperatuur zo veel mogelijk te beperken.

Teststofconcentraties en controlegroepen

34. De concentraties moeten gewoonlijk een meetkundige reeks vormen, waarvan de rede niet hoger mag zijn dan 3,2. Wanneer er vooraf iets bekend is over de toxiciteit van de teststof, bijvoorbeeld uit een bereikbepalingstest, kan dit nuttig zijn bij het kiezen van geschikte testconcentraties.

35. Als een EC_x wordt bepaald, moet de EC_x binnen het bereik van de testconcentraties vallen om een adequaat betrouwbaarheidsniveau te waarborgen. Als bijvoorbeeld de EC_{50} wordt bepaald, moet de hoogste testconcentratie hoger dan de EC_{50} zijn. Als de EC_{50} buiten het bereik van de testconcentraties ligt, zullen de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen groot zijn en zal een correcte bepaling van de statistische fit van het model wellicht niet mogelijk zijn. Het gebruik van meer testconcentraties komt het betrouwbaarheidsinterval rond de resulterende EC_x-waarde ten goede.

36. Om de LOEC/NOEC (optioneel eindpunt) te bepalen, moet de laagste testconcentratie zodanig laag zijn dat de groei niet significant verschilt van de groei bij de controleplanten. Bovendien moet de hoogste testconcentratie dan zodanig hoog zijn dat de groei significant lager is dan in de controle. Het gebruik van meer duplo's komt het statistische onderscheidingsvermogen van de nuleffectconcentratie/ANOVA-opzet te goede.

Limiettest

37. Wanneer een bereikbepalingstest erop wijst dat de teststof in concentraties tot 100 mg/l of tot de oplosbaarheidsgrens in het testmedium of, in het geval van formuleringen, tot de dispergeerbaarheidsgrens geen toxische effecten heeft, kan een limiettest worden uitgevoerd om de respons in een controlegroep en één dosisgroep (100 mg/l of een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheidsgrens, of 1 000 mg/kg droog sediment) gemakkelijker te kunnen vergelijken. Deze test moet de algemene beginselen van een standaard dosisresponstest volgen, al is het raadzaam om het aantal duplo's te verhogen naar zes testvaten per controle en per concentratie. De groei in de controlegroep en de dosisgroep kan geanalyseerd worden met behulp van een statistische toets om gemiddelden te vergelijken, bv. een t-toets van Student.

Testoplossingen

38. Testoplossingen worden gewoonlijk bereid door verdunning van een stamoplossing die werd bereid door de teststof op te lossen of te dispergeren in medium van Smart en Barko, met behulp van gedemineraliseerd (gedistilleerd of gedeïoniseerd) water (zie aanhangsel 1).

▼M7

39. De hoogste testconcentratie mag gewoonlijk niet hoger zijn dan de oplosbaarheid van de teststof in water of, in het geval van formuleringen, de dispergeerbaarheid onder de testomstandigheden.

40. Voor slecht in water oplosbare teststoffen kan het nodig zijn om met een organisch oplosmiddel of dispergeermiddel een geconcentreerde stamoplossing of dispersie van de stof te maken, om nauwkeurige hoeveelheden teststof aan het testmedium te kunnen toevoegen en het dispergeren en oplossen ervan te bevorderen. Al het mogelijke moet worden gedaan om gebruik van dergelijke oplosmiddelen of dispergeermiddelen te vermijden. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen als hulpstof mag niet tot fytotoxiciteit leiden. Vaak gebruikte oplosmiddelen die bij concentraties tot 100 µl/l geen fytotoxiciteit veroorzaken zijn bijvoorbeeld aceton en dimethylformamide. Wanneer een oplosmiddel of dispergeermiddel wordt gebruikt, moet de eindconcentratie worden gerapporteerd en tot een minimum worden beperkt (≤ 100 µl/l). In dat geval moeten alle dosis- en (oplosmiddel)controlegroepen dezelfde concentratie oplosmiddel of dispergeermiddel bevatten. Onbehandelde controleduplo's die geen oplosmiddel of dispergeermiddel bevatten, worden ook in de testopzet opgenomen. Nadere richtsnoeren over het gebruik van dispergeermiddelen zijn opgenomen in een OESO-leidraad (11).

TESTPROCEDURE

41. De testprocedure varieert naargelang van de toedieningsweg van de teststof (via de water- of de sedimentfase). Bij de keuze van het blootstellingsregime dat zal worden gebruikt bij de test (statisch of statisch met verversing, verrijkt water of verrijkt sediment), moet rekening worden gehouden met het te verwachten gedrag van de teststof in een systeem met water en sediment. In sommige gevallen geniet het de voorkeur om tests met verrijkt sediment te gebruiken voor chemische stoffen waarvan een significante verdeling naar het sediment wordt voorspeld.

Kiemfase

42. Gezonde scheuttoppen/-uiteinden (zonder zijscheuten) worden van de cultuurplanten gesneden om scheuten van 6 cm (± 1 cm) lang te verkrijgen. Voor testopzet A (een scheut per pot met drie potten per vat) wordt in elke pot één scheutuiteinde geplant. Voor testopzet B (drie scheuten per pot met een pot per vat) worden in elke pot met het sediment vier à vijf scheuttoppen geplant.

43. In beide gevallen dienen extra potten te worden beplant om bij het begin van de test uniforme planten te kunnen uitkiezen en om reserveplanten voorhanden te hebben die kunnen worden gebruikt om de wortelgroei vlak voor de behandeling te controleren en om te worden geoogst om de biomassa en de lengte van de scheuten op dag 0 te kunnen meten.

44. De scheuten worden zo in de potten geplaatst dat ongeveer drie centimeter onder het sedimentoppervlak zit, genoeg om ten minste twee knopen te bedekken.

45. De potten worden vervolgens overgezet naar testvaten met dezelfde milieuomstandigheden als tijdens de blootstellingsfase en zeven dagen lang in medium van Smart en Barko gehouden om wortelontwikkeling op te wekken.

46. Daarna moeten verschillende planten uit de reservepotten worden gehaald om ze te controleren op wortelgroei. Als er geen wortelgroei zichtbaar is (d.w.z. dat er geen worteltoppen zichtbaar zijn) moet de kiemfase worden verlengd tot er wortelgroei zichtbaar is. Deze stap wordt aanbevolen om ervoor te zorgen dat de planten aan het begin van de test actief aan het groeien zijn.

▼M7

Selectie van uniform plantenmateriaal

47. Voor testopzet A (een scheut per pot met drie potten per vat) worden de potten voor het begin van de test op uniformiteit geselecteerd. Voor testopzet B (drie scheuten per pot met een pot per vat) worden overtollige planten verwijderd zodat er drie planten met een uniforme grootte en een uniform uitzicht overblijven.

Blootstelling via de waterfase

48. De op uniformiteit geselecteerde potten worden in de testvaten geplaatst zoals voorgeschreven voor de desbetreffende testopzet. Vervolgens wordt medium van Smart en Barko aan de testvaten toegevoegd. Verstoring van het sediment moet worden voorkomen. Daartoe kan het medium worden toegevoegd met behulp van een trechter of een kunststofschijf om het sediment af te dekken terwijl het medium in de testvaten wordt gegoten, zolang de schijf meteen daarna weer wordt verwijderd. De plantpotten kunnen ook nadat het medium is toegevoegd, in de testvaten worden geplaatst. In beide gevallen kan er indien nodig vers medium worden gebruikt aan het begin van de blootstellingsfase om potentiële algen- of bacteriëngroei te beperken of om het mogelijk te maken om afzonderlijke batches testoplossing te bereiden voor de verschillende duplo's.

49. De scheutlengte boven het sediment wordt gemeten voor of nadat het medium is toegevoegd.

50. De nodige hoeveelheden teststof kunnen aan het testmedium worden toegevoegd voor het aan de testvaten wordt toegevoegd. De teststof kan ook aan het medium worden toegevoegd nadat het aan de testvaten is toegevoegd. In dat geval moet ervoor worden gezorgd dat de teststof gelijkmatig over het testsysteem wordt verdeeld, zonder het sediment te verstoren.

51. Het uitzicht van de testmedia (bv. helder, troebel enz.) wordt in alle gevallen genoteerd aan het begin van de test.

Blootstelling via sediment

52. Verrijkte sedimenten worden in de gekozen concentratie bereid door rechtstreeks een oplossing van de teststof aan het verse sediment toe te voegen. Een stamoplossing van de in gedeïoniseerd water opgeloste teststof wordt met het kunstmatige sediment gemengd met behulp van een wals of een voedermixer of door handmatig mengen. Indien de teststof slecht in water oplosbaar is, kan deze worden opgelost in een zo klein mogelijk volume van een geschikt organisch oplosmiddel (bv. hexaan, aceton of chloroform). Deze oplossing wordt vervolgens gemengd met 10 g fijn kwartszand per testvat. Het oplosmiddel krijgt de tijd om te verdampen, en vervolgens wordt het zand gemengd met een geschikte hoeveelheid sediment per testglas. Voor het oplossen, dispergeren of emulgeren van de teststof mogen alleen gemakkelijk verdampende oplosmiddelen worden gebruikt. Bij de uiteindelijke bereiding van het sediment moet rekening worden gehouden met het volume/gewicht van het met de teststof verrijkte zand (het sediment wordt dus met minder zand bereid). De aan het sediment toegevoegde teststof moet zorgvuldig en gelijkmatig over het sediment worden verdeeld.

53. Het verrijkte zand wordt in de potten gedaan (zoals hierboven beschreven). De planten, die zijn geselecteerd op uniformiteit en een adequaat wortelgestel, worden uit de potten gehaald die zijn gebruikt tijdens de kiemfase, en worden overgezet in het verrijkte sediment volgens de hierboven beschreven werkwijze.

54. De potten worden in de testvaten geplaatst zoals voorgeschreven voor de desbetreffende testopzet. Vervolgens wordt zorgvuldig (met een trechter) medium van Smart en Barko toegevoegd om verstoring van het sediment te voorkomen. De scheutlengte boven het sediment wordt gemeten voor of nadat het medium is toegevoegd.

▼M7

Instandhouding van het waterpeil gedurende de test

55. Het uiteindelijke watervolume moet worden genoteerd en op elk testvat moet het waterpeil worden gemarkeerd. Als tijdens de test meer dan 10 % van het water verdampt, moet het waterpeil worden aangevuld met gedistilleerd water. Indien nodig kunnen de glazen losjes met een doorzichtige afdekking, zoals een doorzichtig kunststof deksel, worden bedekt om verdamping en verontreiniging met algensporen te beperken.

Testomstandigheden

56. Er moet warm witte en/of koud witte fluorescerende belichting worden gebruikt om te zorgen voor een bestralingssterkte binnen het bereik 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, gemeten binnen het voor fotosynthese effectieve golflengtebereik (400-700 nm) op het wateroppervlak en met een licht-donkercyclus van 16:8 uur. De bestralingssterkte in het testgebied mag niet meer dan ± 15 % afwijken van de gekozen bestralingssterkte.

57. De temperatuur in de testvaten bedraagt 20 ± 2 °C.

58. De pH van het controlemedium mag gedurende de test niet meer dan 1,5 eenheden stijgen. Een afwijking van meer dan 1,5 eenheden maakt de test echter niet ongeldig wanneer kan worden aangetoond dat aan de eerder gespecificeerde geldigheidscriteria wordt voldaan.

Testduur

59. De blootstelling duurt 14 dagen.

Metingen en analyses

60. Na de kiemfase en vlak voor de behandeling (op dag 0) worden reserveplanten uit vijf willekeurig gekozen poten voor de opzet met drie planten per pot of uit 15 potten voor de opzet met een plant per pot geoogst om de lengte, het versgewicht en het drooggewicht van de scheuten te beoordelen zoals hieronder is beschreven.

61. Voor planten die in de blootstellingsfase zijn overgezet, moeten de volgende beoordelingen plaatsvinden, zoals te zien in tabel 1:

— Aan het einde van de blootstellingsperiode (op dag 14) worden de beoordelingen van de lengte van de hoofdscheut, het aantal zijscheuten en de lengte van de zijscheuten genoteerd.

— Tijdens de blootstellingsperiode worden ten minste drie keer (op dagen 0, 7 en 14) visuele beoordelingen van de gezondheid van de planten geregistreerd.

— Aan het einde van de test (op dag 14) worden het versgewicht en het drooggewicht van de scheuten beoordeeld.

62. De scheutlengte wordt bepaald met behulp van een liniaal. Als er zijscheuten aanwezig zijn, wordt ook het aantal zijscheuten en de lengte ervan gemeten.

63. De gezondheid van de planten wordt visueel beoordeeld door het uitzicht van de planten en de algemene toestand van het testmedium te registreren. Daarbij moeten onder meer de volgende waarnemingen worden genoteerd:

— necrose, chlorose of andere verkleuringen, zoals een te sterke rode verkleuring ten opzichte van de controleplanten;

— de ontwikkeling van verontreiniging met bacteriën of algen;

— groeiafwijkingen zoals verminderde groei, wijzingen van de lengte tussen de knopen, vervormde scheuten/bladeren, wildgroei van zijscheuten, bladverlies, verlies van celdruk en stengelfragmentatie.

▼M7

— De gezondheid van de wortels wordt aan het einde van de test visueel beoordeeld door het sediment zorgvuldig van de wortels te spoelen om het wortelgestel te kunnen observeren. Hieronder vindt u een voorgestelde beoordelingsschaal, in verhouding tot de controleplanten:

1) geen wortels

2) weinig wortels

3) matige wortelontwikkeling

4) bijzonder goede wortelontwikkeling, vergelijkbaar met de controles

64. Het versgewicht wordt aan het begin en aan het eind van de test beoordeeld door de scheut ter hoogte van het sediment te snoeien en vervolgens droog te deppen voor het wegen. Sedimentdeeltjes die aan de voet van de scheut kunnen blijven kleven, moeten zorgvuldig worden verwijderd. Het scheutmateriaal wordt vervolgens in een droogoven geplaatst op 60 °C en tot een constant gewicht gedroogd voordat het opnieuw wordt gewogen om het drooggewicht te noteren.

65. Tabel 1 bevat een overzicht van de biologische beoordelingen die ten minste moeten worden uitgevoerd tijdens de test.

Tabel 1

Beoordelingsschema

Dag na behandeling (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Scheutlengte, lengte van de zijscheuten en aantal zijscheuten	Visuele beoordeling van de scheuten	Vers- en drooggewicht van de scheuten, Visuele beoordeling van de wortels	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: geeft aan dat beoordelingen enkel op deze momenten moeten worden uitgevoerd
—: geeft aan dat er geen metingen nodig zijn

Frequentie van de metingen en analyses

66. De temperatuur van het medium moet ten minste eenmaal per dag (of voortdurend met een datalogger) worden gemeten in een extra vat dat onder dezelfde omstandigheden in de klimaatkast, incubator of klimaatkamer wordt bewaard.

67. De pH en het gehalte opgeloste zuurstof van het testmedium moeten aan het begin van de test, ten minste een keer in de loop van de test en aan het eind van de test worden gecontroleerd in alle duplovaten. De metingen moeten telkens op hetzelfde moment van de dag plaatsvinden. Als er bulkoplossingen worden gebruikt om alle duplo's voor elke testconcentratie te bereiden, volstaat het om elke bulkoplossing een keer te meten op dag 0.

68. De bestralingssterkte moet in de klimaatkast, incubator of klimaatkamer worden gemeten op punten die overeenkomen met het niveau van het wateroppervlak. De metingen dienen ten minste eenmaal aan het begin van de test of gedurende de test te worden uitgevoerd. De methode waarmee het licht wordt gedetecteerd en gemeten, met name het type sensor, zal de gemeten waarde beïnvloeden. De voorkeur wordt gegeven aan sferische sensoren (die

▼M7

reageren op licht uit alle hoeken boven en onder het meetvlak) en „cosinus”-sensoren (die reageren op licht uit alle hoeken boven het meetvlak) in plaats van unidirectionele sensoren, aangezien deze een hogere uitslag geven voor een meerpuntslichtbron van het hier beschreven type.

Analytische metingen van de teststof

69. De correcte toepassing van de teststof moet worden gestaafd met analytische metingen van de teststofconcentraties.

70. Daartoe moeten kort na het begin van de test (op de dag van toepassing voor stabiele teststoffen of een uur na toepassing voor stoffen die niet stabiel zijn) en aan het eind van de test voor alle testconcentraties watermonsters worden genomen om ze te analyseren op de teststof.

71. De concentratie in het sediment en het poriënwater van het sediment moet op zijn minst in de hoogste testconcentratie aan het begin en aan het eind van de test worden bepaald, tenzij bekend is dat de teststoffen stabiel zijn in water (> 80 % van de nominale concentratie). Als in een water/sedimentstudie onder vergelijkbare omstandigheden (bv. verhouding sediment/water, soort toepassing, sedimenttype) de verdeling van de teststof tussen het water en het sediment duidelijk is bepaald, kunnen metingen in het sediment en het poriënwater niet noodzakelijk zijn.

72. Bemonstering van het sediment aan het begin van de test zal het testsysteem waarschijnlijk verstoren. Daarom kunnen bijkomende behandelde testvaten nodig zijn om de analytische bepalingen aan het begin en aan het eind van de test te vergemakkelijken. Wanneer tussentijdse beoordelingen (op dag 7) nodig worden geacht en er voor de analyses grote sedimentmonsters nodig zijn die niet zonder problemen uit het testsysteem kunnen worden gehaald, dienen de analytische bepalingen ook te worden verricht met behulp van extra testvaten die op dezelfde manier zijn behandeld als de testvaten die zijn gebruikt voor de biologische beoordelingen.

73. Om het poriewater te isoleren, wordt aanbevolen te centrifugeren, bijvoorbeeld 30 min bij 10 000 g en een temperatuur van 4 °C. Filtratie kan echter ook aanvaardbaar zijn, mits is aangetoond dat de teststof niet aan filters adsorbeert. In sommige gevallen kan analyse van de concentraties in het poriewater onmogelijk zijn, als het monster te klein is.

74. In semistatische tests (blootstelling via de waterfase) waarbij de concentratie van de relevante teststof(fen) gedurende de test naar verwachting niet binnen 20 % van de nominale concentratie zal blijven zonder dat de testoplossingen worden ververst, moeten bij elke verversing monsters worden genomen van de gebruikte en de vers bereide testoplossing om de concentratie van de teststof te analyseren.

75. Wanneer de gemeten aanvankelijke concentratie van de teststof niet binnen 20 % van de nominale concentratie ligt, maar afdoende kan worden aangetoond dat de aanvankelijke concentraties herhaalbaar en stabiel zijn (d.w.z. binnen het bereik van 80-120 % van de aanvankelijke concentratie liggen), behoeven de chemische bepalingen echter alleen bij de hoogste en laagste testconcentratie te worden uitgevoerd.

76. In alle gevallen hoeft de bepaling van teststofconcentraties slechts op één duplovat bij elke testconcentratie te worden uitgevoerd. Als alternatief kunnen de testoplossingen van alle duplo's voor elke concentratie worden gebundeld voor de analyses.

77. Als kan worden aangetoond dat de concentratie van de teststof gedurende de gehele test binnen 20 % van de nominale of gemeten beginconcentratie is gebleven, kan de analyse van de resultaten en de daaropvolgende afleiding van de eindpunten op basis van de nominale of gemeten beginwaarden worden uitgevoerd.

▼M7

78. In die gevallen moeten de effectconcentraties op de nominale of gemeten waterconcentraties aan het begin van de test worden gebaseerd.

79. Als er echter aanwijzingen zijn dat de concentratie is afgenomen (en in het behandelde compartiment dus niet binnen 20 % van de nominale of gemeten beginwaarden is gebleven) gedurende de test, moet de analyse van de resultaten worden uitgevoerd op basis van het meetkundige gemiddelde van de concentratie gedurende de blootstelling of op basis van modellen waarmee de afname van de concentratie van de teststof in het behandelde compartiment wordt beschreven (11).

EVALUATIE VAN DE GEGEVENS

80. Wanneer een oplosmiddel/dispergeermiddel moet worden gebruikt, kunnen gegevens van de oplosmiddelcontroles en de onbehandelde controles worden gebundeld met het oog op de statistische analyses, voor zover de respons in de oplosmiddelcontroles en de onbehandelde controles niet op statistisch significante wijze verschilt.

Responsvariabelen

81. De test is bedoeld om de effecten van de teststof op de vegetatieve groei van de testsoorten als volgt te bepalen aan de hand van twee responsvariabelen, de gemiddelde specifieke groeisnelheid en de opbrengst:

Gemiddelde specifieke groeisnelheid

82. Deze responsvariabele is gebaseerd op logaritmische veranderingen van de totale lengte van de scheuten, het totale versgewicht van de scheuten en het totale drooggewicht van de scheuten in de loop van de tijd in de controlegroepen en in elke dosisgroep. Deze variabele wordt berekend voor elke duplo van elke controle- en elke dosisgroep. De gemiddelde lengte en het gemiddelde gewicht van de drie planten per testvat (duplo), en bijgevolg ook de groeisnelheid voor elke duplo, moeten worden berekend met de volgende formule:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

waarbij:

μ_{i-j}: de gemiddelde specifieke groeisnelheid van tijdstip i tot tijdstip j

N_i: de meetvariabele in het test- of controlevat op tijdstip i

N_j: de meetvariabele in het test- of controlevat op tijdstip j

t: de periode van tijdstip i tot tijdstip j

83. Op basis van de duplorespons moeten een gemiddelde waarde voor de groeisnelheid en variantieramingen worden berekend voor elke dosis- en controlegroep.

84. De gemiddelde specifieke groeisnelheid moet voor de volledige testperiode worden berekend (tijdstip „i” in bovenstaande formule is het begin van de test en tijdstip „j” is het einde van de test). Voor elke testconcentratie en controle wordt een gemiddelde waarde voor de gemiddelde specifieke groeisnelheid berekend en een waarde voor de variantie.

▼M7

85. De procentuele remming van de groeisnelheid (I_r) kan dan voor elke testconcentratie (dosisgroep) worden berekend met de volgende formule:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

waarbij:

% Ir: procentuele remming van de gemiddelde specifieke groeisnelheid

μC: gemiddelde waarde van μ in de controlegroep

μT: gemiddelde waarde van μ in de dosisgroep

Opbrengst

86. Deze responsvariabele is gebaseerd op veranderingen van de totale lengte van de scheuten, het totale versgewicht van de scheuten en het totale drooggewicht van de scheuten in de loop van de tijd in de controlegroepen en in elke dosisgroep. De gemiddelde procentuele remming van de opbrengst (% Iy) kan voor elke dosisgroep als volgt worden berekend:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

waarbij:

% I_y: procentuele remming van de opbrengst;

b_C: biomassa aan het eind minus biomassa aan het begin in de controlegroep;

b_T: biomassa aan het eind minus biomassa aan het begin in de dosisgroep.

Uitzetting van de concentratie/responscurves

87. Uitzetting van de gemiddelde procentuele remming van de responsvariabele (I_r, of I_y) tegen de logaritme van de concentratie van de teststof levert concentratie/responscurves op.

Schatting van de EC_x

88. De EC_x (bv. EC_{50}) moet worden geschat op basis van zowel de gemiddelde specifieke groeisnelheid (E_rC_x) als de opbrengst (E_yC_x), in beide gevallen op basis van het totale versgewicht van de scheuten, het totale drooggewicht van de scheuten en de totale lengte van de scheuten.

89. Er moet worden opgemerkt dat de met behulp van deze twee responsvariabelen berekende EC_x-waarden niet vergelijkbaar zijn, en bij gebruik van de resultaten van de test moet met dit verschil rekening worden gehouden. Vanwege de mathematische grondslagen van de respectieve benaderingen zullen de EC_x-waarden op basis van de gemiddelde specifieke groeisnelheid (E_rC_x) in de meeste gevallen hoger zijn dan de resultaten op basis van de opbrengst (E_yC_x) als de testomstandigheden van deze testmethode worden aangehouden. Dit verschil moet niet worden geïnterpreteerd als een verschil in gevoeligheid tussen de twee responsvariabelen, maar zuiver als een mathematisch verschil tussen de waarden.

Statistische procedures

90. Het is de bedoeling met behulp van regressieanalyse een kwantitatief verband tussen concentratie en respons te verkrijgen. Het is mogelijk een gewogen lineaire regressie te gebruiken nadat op de responsgegevens een lineariserende transformatie is uitgevoerd, bijvoorbeeld naar probit-, logit- of Weibull-eenheden (13), maar de voorkeur wordt gegeven aan niet-lineaire regressieprocedures, die beter omgaan met onvermijdelijke onregelmatigheden in gegevens en afwijkingen van uniforme verdelingen. In de buurt van

▼M7

het nulpunt of totale remming kunnen dergelijke onregelmatigheden door de transformatie worden uitvergroot en kunnen ze de analyse storen (13). Er moet worden opgemerkt dat standaardmethoden voor analyses met behulp van probit-, logit- of Weibull-transformaties bedoeld zijn voor gebruik bij een binaire respons (bv. sterfte of overleven) en moeten worden aangepast om voor groeisnelheid- of opbrengst-data te kunnen worden gebruikt. Specifieke procedures voor de bepaling van EC_x-waarden uit continue data zijn te vinden in (14), (15), (16) en (17).

91. Voor elke te analyseren responsvariabele wordt de concentratie-responsrelatie gebruikt voor de berekening van puntschattingen van EC_x-waarden. Voor elke raming worden de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen bepaald, en de kwaliteit van de fitting van de responsgegevens op het regressiemodel moet grafisch of statistisch worden bepaald. De regressieanalyse moet met responsen van individuele replicaten worden uitgevoerd en niet met gemiddelden van dosisgroepen.

92. Als de beschikbare regressiemodellen/methoden niet geschikt zijn voor de gegevens, kunnen de EC_{50} en de betrouwbaarheidsgrenzen ook worden bepaald met behulp van lineaire interpolatie met bootstrapping (18).

93. Voor de bepaling van de LOEC en daaruit de NOEC moeten de gemiddelden van de dosisgroepen worden vergeleken met behulp van variantieanalyse-technieken (ANOVA). Het gemiddelde voor elke concentratie wordt vervolgens vergeleken met het gemiddelde van de controlegroep met behulp van een geschikte testmethode (bv. toets van Dunnett of van Williams) (19) (20) (21) (22). Er moet worden bepaald of de ANOVA-aanname van normale verdeling (ND) en homogeniteit van variantie (VH) opgaat. Deze beoordeling moet worden uitgevoerd met behulp van een toets van Shapiro-Wilks (ND) of van Levene (VH). Wanneer de aanname van normale verdeling en homogeniteit van variantie niet opgaat, kan dit soms worden gecorrigeerd door logaritmische transformatie van de gegevens. Als de heterogeniteit van variantie en/of afwijking van ND extreem is en niet door transformatie kan worden gecorrigeerd, moet een analyse met methoden als de t-toets van Bonferroni-Welch, de stap-omlaag-trendtoets van Jonckheere-Terpstra of de mediaantoets van Bonferroni worden overwogen. Aanvullende richtsnoeren voor het bepalen van de NOEC zijn te vinden in (16).

RAPPORTAGE

94. In het testverslag worden ten minste de volgende gegeven opgenomen:

Teststof

Stof die uit één component bestaat:

— fysisch voorkomen, oplosbaarheid in water en aanvullende relevante fysisch-chemische eigenschappen;

— chemische identificatiegegevens, zoals IUPAC- of CAS-naam, CAS-nummer, SMILES- of InChI-code, structuurformule, zuiverheid, chemische identiteit van onzuiverheden, indien van toepassing en praktisch haalbaar, enz.

Stof die uit meerdere componenten bestaat, UVCB's en mengsels:

— voor zover mogelijk, karakterisering aan de hand van chemische identiteit (zie hierboven), kwantitatief voorkomen en relevante fysisch-chemische eigenschappen van de bestanddelen.

Diersoort

— wetenschappelijke naam en herkomst.

Testomstandigheden

— duur en omstandigheden van de kiemfase;

— gebruikte testprocedure (statisch, semistatisch, met pulsen);

▼M7

— begindatum en duur van de test;

— testmedium, d.w.z. sediment en vloeibaar nutriëntmedium;

— beschrijving van de testopzet: klimaatkast/kamer of laboratorium, testvaten en deksels, oplossingsvolumes, lengte en gewicht van de testplanten per testvat aan het begin van de test, verhouding van sedimentoppervlakte tot wateroppervlakte, verhouding van sedimentvolume tot watervolume;

— testconcentraties (nominaal en gemeten, indien van toepassing) en aantal replicaten per concentratie;

— wijze van bereiding van de stam- en testoplossingen met vermelding van het gebruik van eventuele oplosmiddelen of dispergeermiddelen;

— temperatuur tijdens de test;

— lichtbron, bestralingssterkte ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$);

— pH-waarden van de test- en controlemedia en uitzicht van de testmedia aan het begin en het eind van de test;

— zuurstofconcentraties;

— analysemethode met relevante kwaliteitsborgingsgegevens (valideringsstudies, standaarddeviaties of betrouwbaarheidsgrenzen van analyses);

— methoden voor het bepalen van de meetvariabelen, bv. lengte, drooggewicht, versgewicht;

— alle afwijkingen van deze testmethode.

Resultaten

— de ruwe gegevens: scheutlengte en -gewicht van planten/pot en andere meetvariabelen in elk test- en controlevat bij elke waarneming en op elk analysetijdstip, volgens het beoordelingsschema in tabel 1;

— de gemiddelden en standaarddeviaties voor elke meetvariabele;

— de groeicurves voor elke concentratie;

— verdubbelingstijd/groeisnelheid in de controlegroep, op basis van de lengte en het versgewicht van de scheuten, met inbegrip van de variatiecoëfficiënt voor de opbrengst van het versgewicht;

— de berekende responsvariabelen voor elk dosisreplicaat, met het gemiddelde en de variatiecoëfficiënt voor de replicaten;

— een grafische weergave van de concentratie-effectrelatie;

— ramingen van de toxische eindpunten voor responsvariabelen zoals EC_{50}, en de bijbehorende betrouwbaarheidsintervallen. De LOEC en/of de NOEC, indien deze zijn berekend, en de voor de bepaling daarvan gebruikte statistische methoden;

— als ANOVA is gebruikt, de grootte van het effect dat kan worden gedetecteerd (bv. het kleinste significante verschil);

— een eventuele stimulering van de groei, als deze bij een behandeling is geconstateerd;

▼M7

— eventuele zichtbare tekenen van fytotoxiciteit en observaties aan de testoplossingen;

— bespreking van de resultaten, met inbegrip van een eventuele beïnvloeding van de resultaten van de test die een gevolg is van afwijkingen van deze testmethode.

LITERATUUR

(1) Hoofdstuk C.26 van deze bijlage: Lemna-soorten: groeiremmingstest.

(2) Hoofdstuk C.3 van deze bijlage: Zoetwateralgen en cyanobacteriën: groeiremmingstest.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 januari 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, blz. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, blz. 715-722.

(7) Hoofdstuk C.50 van deze bijlage: Toxiciteitstest op *Myriophyllum spicatum* zonder sediment.

(8) Hoofdstuk C.28 van deze bijlage: Test ter bepaling van de toxiciteit voor chironomidea in sediment en water m.b.v. verrijkt water.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, nr. 206, OECD Publishing, Parijs.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, blz. 231 — 237.

(11) OESO (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, Parijs.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, blz. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, blz. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, blz. 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) OESO (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, Parijs.

(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, blz. 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, blz. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, blz. 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, blz. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, blz. 519-531.

▼**M7**

Aanhangsel 1

SAMENSTELLING MEDIUM VAN SMART EN BARKO

Bestanddeel	Hoeveelheid reagens die aan het water wordt toegevoegd (*) (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 (luchtevenwicht)	7,9

(*) gedemineraliseerd (gedistilleerd of gedeïoniseerd) water.

▼M7

Aanhangsel 2

DEFINITIES

Biomassa: het droog- en/of versgewicht van het levende materiaal in een populatie. In deze test is de biomassa de som van de hoofdscheut, alle zijtakken en alle wortels.

Chlorose: de verandering van de kleur van het testorganisme, en in het bijzonder van de kransen, van groen naar vergeeld.

EC_x: de concentratie van de in het testmedium opgeloste teststof die binnen een bepaalde blootstellingsperiode (die expliciet moet worden vermeld als deze afwijkt van de volledige of normale duur van de test) leidt tot een afname van de groei van *Myriophyllum spicatum* met x % (bv. 50 %). Om ondubbelzinnig aan te geven of een EC-waarde gebaseerd is op de groeisnelheid of de opbrengst, worden de symbolen „E_rC" voor de groeisnelheid en „E_yC" voor de opbrengst gebruikt, gevolgd door de gebruikte meetvariabele, bv.E_rC (lengte van de hoofdscheut).

Groei: een toename van de meetvariabele, bv. de lengte van de hoofdscheut, de totale lengte van de zijtakken, de totale lengte van de scheuten, de totale lengte van de wortels, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen gedurende de testperiode.

Groeisnelheid: (gemiddelde specifieke groeisnelheid): de logaritmische toename van de meetvariabele gedurende de blootstellingsperiode. *Noot*: De responsvariabelen die verband houden met de groeisnelheid, zijn onafhankelijk van de duur van de test voor zover het groeipatroon van niet blootgestelde controleorganismen exponentieel is.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): de laagste geteste concentratie waarbij wordt waargenomen dat de stof binnen een bepaalde blootstellingstijd in vergelijking met de controle tot een statistisch significante afname van de groei ($p < 0,05$) leidt. Alle testconcentraties boven de LOEC moeten echter een schadelijk effect hebben dat gelijk is aan of groter dan de effecten die worden waargenomen bij de LOEC. Indien niet aan deze beide voorwaarden kan worden voldaan, moet uitgebreid worden toegelicht hoe de LOEC (en daarmee de NOEC) is geselecteerd.

Meetvariabelen: alle soorten variabelen die gemeten worden om aan de hand van een of meer verschillende responsvariabelen het eindpunt van de test te beschrijven. In deze testmethode zijn de meetvariabelen de lengte van de hoofdscheut, de totale lengte van de zijtakken, de totale lengte van de scheuten, de totale lengte van de wortels, het versgewicht, het drooggewicht of het aantal kransen.

Monocultuur: een cultuur met één plantensoort.

Necrose: dood (d.w.z. wit of donkerbruin) weefsel van het testorganisme.

NOEC (No Observed Effect Concentration): de testconcentratie die direct onder de LOEC ligt.

Opbrengst: de waarde van een meetvariabele om de biomassa uit te drukken aan het eind van de blootstellingstijd, verminderd met de waarde van de meetvariabele aan het begin van de blootstellingstijd. Noot: Wanneer het groeipatroon van niet blootgestelde organismen exponentieel is, nemen de responsvariabelen op basis van de opbrengst af in de loop van de test.

Responsvariabele: een variabele voor de bepaling van de toxiciteit, met uiteenlopende berekeningsmethoden afgeleid van de gemeten variabelen voor de biomassa. Voor deze testmethode worden de responsvariabelen groeisnelheid en opbrengst afgeleid van meetvariabelen zoals lengte van de hoofdscheut, totale lengte van de scheuten, versgewicht, drooggewicht of aantal kransen.

Semi-statische test (met verversing): een test waarbij de testoplossing op specifieke tijdstippen gedurende de test periodiek wordt ververst.

Statische test: een testmethode waarbij de testoplossing gedurende de test niet wordt ververst.

▼**M7**

Stof: een stof of mengsel.

Testeindpunt: de algemene factor die volgens het doel van de test door de teststof zal worden veranderd in vergelijking met de controle. Het eindpunt van deze testmethode is groeiremming, die kan worden uitgedrukt door verschillende responsvariabelen die op een of meer meetvariabelen gebaseerd zijn.

Testmedium: het volledige kunstmatige groeimedium waarin de testplanten gedurende de blootstelling aan de teststof groeien. De teststof wordt normaal gesproken in het medium opgelost.

Teststof: alle volgens deze testmethode geteste stoffen en mengsels.

UVCB: stoffen waarvan de samenstelling niet bekend of variabel is, complexe reactieproducten of biologische materialen.