387L0302

30.5.88 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 133/1

KOMMISSIONENS DIREKTIV

av den 18 november 1987

om anpassning till tekniska framsteg för nionde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen

(88/302/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 67/548/EEG av den 27 juni 1967 om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen(1) i dess lydelse efter den sjätte ändringen genom direktiv 79/831/EEG(2), särskilt artikel 19 i detta, och

med beaktande av följande:

Enligt artikel 3.1 i direktiv 67/548/EEG skall ämnens och preparats fysikaliskt-kemiska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet bestämmas med de metoder som anges i bilaga 5.

Enligt artikel 3.2 i direktiv 67/548/EEG skall den verkliga eller potentiella miljöfarligheten hos ett ämne eller preparat fastställas med avseende på de egenskaper som anges i bilaga 7 och 8.

Bilaga 5 i dess lydelse enligt kommissionens direktiv 84/449/EEG(3) innehåller endast testmetoder för de egenskaper som anges i bilaga 7. Det är således nödvändigt att även tillhandahålla testmetoder för de egenskaper som anges i bilaga 8.

Bestämmelserna i detta direktiv har tillstyrkts av Kommittén för anpassning till teknisk utveckling av direktiven om avskaffande av tekniska handelshinder för farliga ämnen och preparat.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Texten i bilagan till detta direktiv skall läggas till i bilaga 5 till direktiv 67/548/EEG.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall före den 31 december 1988 anta och offentliggöra de bestämmelser som är nödvändiga för att följa detta direktiv och skall genast underrätta kommissionen om detta. Bestämmelserna skall tillämpas senast den 30 juni 1989.

Artikel 3

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 18 november 1987.

På kommissionens vägnar

Stanley CLINTON DAVIS

Ledamot av kommissionen

(1) EGT nr 196, 16.8.1967, s. 1/67.
(2) EGT nr L 259, 15.10.1979, s. 10.
(3) EGT nr L 251, 19.9.1984, s. 1.

BILAGA

De testmetoder som beskrivs i denna bilaga är till för bestämning av vissa av de toxikologiska och ekotoxikologiska egenskaper som förtecknas i bilaga 8 till rådets direktiv 79/831/EEG. De testmetoder som beskrivs är tillämpliga för nivå 1 och nivå 2 i bilaga 8, men testerna har inte specificerats efter nivå.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sida

DEL B: Metoder för bestämning av toxicitet 6

Allmän inledning: DEL B 6
Test avseende subkronisk oral toxicitet: 90 dagars repeterad oraltest på gnagare 10
Test avseende subkronisk oral toxicitet: 90 dagars repeterad oraltest på icke-gnagare 14
Test avseende subkronisk dermal toxicitet: 90 dagars repeterad dermaltest på gnagare 18
Test avseende subkronisk inhalationstoxicitet: 90 dagars repeterad inandningstest på gnagare 22
Teratogenicitetstest — på gnagare och icke-gnagare 26
Test avseende kronisk toxicitet 29
Test avseende cancerogenicitet 34
Kombinerat test avseende kronisk toxicitet och cancerogenicitet 39
Reproduktionstoxicitetstest på en generation 45
Reproduktionstoxicitetstest på två generationer 49
Toxikokinetik 53
Mutagenicitetstest och screening för cancerogenicitet 57
— Genmutation – *Saccharomyces cerevisiae* 57
— Mitotisk rekombination – *Saccharomyces cerevisiae* 60
— Genmutationstest *in vitro* på däggdjursceller 63
— DNA-skada och DNA-reparation – felaktig DNA-syntes – däggdjursceller *in vitro* 66
— Test avseende systerkromatidbyten *in vitro* 70
— Könsbunden recessiv letal test på *Drosophila melanogaster* 73
— Celltransformationstest *in vitro* på däggdjursceller 75
— Dominant letal test på gnagare 78
— Cytogenetisk test på könsceller från däggdjur *in vivo* 81
— Fläcktest på mus 84
— Test avseende ärftlig translokation på mus 87

DEL C: Metoder för bestämning av ekotoxicitet 90

Allmän inledning: Del C 90
Test avseende tillväxthämning hos alger 91
Toxicitet hos daggmaskar: test i syntetisk jord 97
Biologisk nedbrytbarhet – Zahn-Wellens test 101
Biologisk nedbrytbarhet: Aktiverat slam – Simulationstest 108
Biologisk nedbrytbarhet: Aktiverat slam – Respirationshämningstest 120
Biologisk nedbrytbarhet: Modifierat SCAS test 125

DEL B: METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET

ALLMÄN INLEDNING: DEL B

LÅNGTIDSUNDERSÖKNINGAR

Undersökning av subkronisk/kronisk toxicitet och cancerogenicitet

Egenskaper hos testämnet och behandlingsblandningen

Testämnets sammansättning, inbegripet de viktigaste orenheterna, och dess relevanta fysikaliska-kemiska egenskaper, inbegripet ämnets stabilitet, måste vara kända innan en toxicitetsundersökning inleds.

Testämnets fysikaliska-kemiska egenskaper ger viktig vägledning vid val av tillförselväg, utformning av undersökningar av subkronisk/kronisk toxicitet eller cancerogenicitet samt hantering och lagring av testämnet.

Uppgifter om testämnets kemiska struktur och fysikaliska-kemiska egenskaper kan dessutom ge en antydan om absorptionsförmågan vid en bestämd tillförselväg, liksom upplysa om ämnets uppträdande i fråga om metabolism och distributionen i vävnaderna. Uppgifter om toxikokinetiska parametrar kan dessutom finnas tillgängliga från tidigare undersökningar om toxicitet och toxikokinetik.

En analysmetod för kvalitativ och kvantitativ bestämning av testämnet (om möjligt inbegripet viktiga orenheter) i doseringsmediet och i biologiska material bör utvecklas innan en undersökning inleds.

Försöksdjur: Val av arter och stammar

Eftersom det är nödvändigt att behandla djuren under en större del av deras livstid har undersökningarna en tendens att begränsas till arter av försöksdjur som är lätta att hålla och har en relativt kort livslängd. Det är högst önskvärt att man känner till incidensen av spontana sjukdomar och tumörer i de använda djurstammarna, när de hålls under liknande förhållanden.

Stammar bör vara väl beskrivna och fria från störande medfödda defekter. Användning av inavlade stammar eller F 1-hybrider kan vara till viss fördel i detta sammanhang, men om det finns tillräcklig bakgrundsinformation om utavlade stammar kan även djur från stängda bestånd användas.

Djurvård, utfodring och vattning

Djurförsök och undersökningar skall utföras i enlighet med nationella bestämmelser varvid hänsyn skall tas till humana principer och den senaste internationella utvecklingen på området för djurs välbefinnande.

En strikt kontroll av miljöförhållandena samt lämpliga djurvårdsmetoder är en grundförutsättning för att erhålla meningsfulla resultat. Sådana faktorer såsom förvaringsrum, tillstötande sjukdomar, medicinsk behandling, orenheter i foder, luft, vatten och bäddmaterial kan ha en avgörande betydelse för resultatet av undersökningar med upprepad dosering. I allmänhet bör man känna till kemiska steriliseringsmedels verkningar på undersökningen.

Fodret skall motsvara alla de näringskrav som försöksdjuren har och vara fria från orenheter som kan påverka testresultatet. Gnagare bör utfodras och vattnas *ad libitum*, och fodret bör bytas minst en gång i veckan. För närvarande används tre olika fodersorter: konventionella, syntetiska och olika fodersorter med angiven sammansättning.

Oavsett vilket foder man väljer måste leverantörerna regelbundet kontrollera näringsvärdet och graden av orenheter i basfodret och skicka denna information till laboratoriet tillsammans med varje fodersändning. Det är högst önskvärt att man på förhand känner till fodersammansättningens verkningar på metabolismen, utvecklingen av tumörer och djurens livslängd.

Försökslaboratoriet kan dessutom utföra ytterligare kontroller av basfodret för att analysera fodrets beståndsdelar samt oavsiktligt tillsatta orenheter, inbegripet cancerogener. I detta fall bör analysresultaten behållas och inbegripas i slutrapporten för varje enskilt testämne.

Vanliga foderbeståndsdelar som man vet påverkar cancerogeniciteten (t. ex. antioxidanter, omättade fettsyror, selen) bör inte ingå i fodret i skadliga koncentrationer. Till följd av den potentiella inverkan som sådana orenheter som normalt förekommer i fodret har vid bedömningen av cancerogenecitet är det nödvändigt att särskilt uppmärksamma närvaron av bekämpningsmedelsrester, organiska klorföreningar, polycykliska aromatiska kolväten, östrogen, tungmetaller, nitrosaminer och mykotoxiner i fodret.

Om testämnet tillförs via vattnet eller fodret är stabilitetstester av grundläggande betydelse. Innan undersökningen inleds bör lämpliga stabilitets- och homogenitetstester med upprepad dosering utföras för att fastställa frekvensen av foderberedningen och den kontroll som krävs.

Om fodret steriliseras måste den verkan en sådan behandling har på testämnet samt fodrets näringsbeståndsdelar vara känd. Vid behov måste tillämpliga anpassningar företas.

Vid tester av cancerogenicitet bör forskarna vara uppmärksamma på eventuella föroreningar i det vatten som används. Vatten som är tjänligt som dricksvatten är normalt det lämpligaste, och en vattenanalys bör finnas tillgänglig.

Det kan vara nödvändigt att ändra testämnets koncentration i fodret när djuret växer, för att bibehålla ett rimligt konstant intag av testämnet i förhållande till kroppsvikt.

Näringsvärdet i det foder som ges till kontroll- respektive försöksdjur bör vara så lika som möjligt. Till följd av detta är det nödvändigt att ta hänsyn till näringsvärdet i det testämne som iblandas i fodret. Erfarenheten har visat att upp till 5 % av näringsfria testämnen i fodret sannolikt inte har något inflytande på fodrets näringsvärde.

1. Inhalationssundersökningar

Inget gränstest har fastställts eftersom det inte har varit möjligt att definiera ett enhetligt gränsvärde för exponering genom inhalation.

2. Teratogenicitetsundersökningar

Denna testmetod används främst vid oral tillförsel. Andra tillförselvägar kan dock användas beroende på testämnets fysikaliska egenskaper eller sannolik exponeringsform för människor. I sådana fall bör testmetoden anpassas med hänsyn till de relevanta kriterierna för 28-dagarsstudien.

3. Toxikokinetik

Toxikokinetiska undersökningar bidrar till att tolka och utvärdera uppgifter om toxicitet. Syftet med dessa undersökningar är att förklara vissa aspekter av den testade kemikaliens toxicitet. Resultatet kan bidra till att utforma ytterligare toxicitetsundersökningar. Det är inte nödvändigt att i samtliga fall bestämma alla parametrar. Endast vid sällsynta tillfällen är det nödvändigt att genomföra hela raden av toxikokinetiska undersökningar (absorption, utsöndring, distribution och metabolism). I fråga om vissa kemiska förbindelser kan det vara lämpligt att ändra denna följdordning, och i vissa fall kan en enkel dos vara tillräcklig.

Definitioner

Toxikokinetik:	Undersökning av testämnens absorption, distribution, utsöndring och metabolism.
Absorption:	Det förlopp genom vilket ett ämne tränger in i kroppen.
Utsöndring:	Det förlopp genom vilket ett tillfört ämne och/eller dess metaboliter avlägsnas från kroppen.
Distribution:	Det förlopp genom vilket ett absorberat ämne och/eller dess metaboliter cirkulerar i kroppen.
Metabolism:	Det förlopp genom vilket ett tillfört ämne ändrar struktur i kroppen, antingen genom enzymatiska eller icke-enzymatiska reaktioner.

4. Undersökning av akut och subakut toxicitet på en andra djurart

Syftet med en undersökning på en andra djurart är att komplettera de resultatet som erhållits på grundval av undersökningen på den första djurarten.

Vid en undersökning på en andra art kan den testmetod som redan beskrivits användas eller anpassas för ett mindre antal djur.

5. Fertilitetsundersökning

Om en reproduktionstest av tre generationer är nödvändig kan den metod som beskrivs för en reproduktionstest av två generationer utvidgas till att omfatta en tredje generation.

6. Mutagenicitetsundersökning

Ytterligare mutagenicitetstester inbegripet "screening" test för cancerogenicitet

I bilaga 8 till direktivet anges kompletterande undersökningar av mutagenicitet och prescreening för cancerogenetisk verkan. De undersökningar som anges i detta avsnitt kan i allmänhet användas för att undersöka båda dessa aspekter.

Inledning

Den initiala bedömningen av ett ämnes mutagena aktivitet består i ett test för gen(punkt)mutationer i bakterier liksom för cytogenetisk skada i däggdjursceller (*in vitro* eller *in vivo*). Lämpliga metoder för dessa "bastester" beskrivs ovan. Detta avsnitt rör ytterligare undersökningar som är lämpliga för att verifiera och/eller komplettera de resultat som erhållits vid bastesterna, och som kan användas för att

1. bekräfta resultat som erhållits vid bastesterna,
2. undersöka endpoints som inte undersöktes i bastesterna,
3. inleda eller utvidga *in vivo*-undersökningar.

Till följd av detta omfattar de beskrivna testerna både *in vitro* och *in vivo* eukaryotiska system samt en utvidgad rad biologiska endpoints. Testerna ger upplysningar om punktmutationer i mer komplexa organismer än de bakterier som används i bastesterna, och ger fler upplysningar om ett ämnes förmåga att inducera kromosomförändringar.

Även tester för andra endpoints än punktmutationer och kromosomförändringar beskrivs. Dessa tester ger kompletterande upplysningar och kan på tillämpligt sätt användas i testscheman.

I allmänhet bör ett program om ytterligare undersökning av mutagenicitet utformas så att det ger ytterligare relevant information om det ifrågavarande ämnets mutagenetiska och/eller cancerogenetiska potential.

Vilka undersökningar som är lämpliga i ett visst fall kommer att bero på flera faktorer, t. ex. ämnets kemiska och fysikaliska egenskaper, resultaten av de initiala bakteriologiska och cytogenetiska undersökningarna, ämnets metaboliska egenskaper, resultaten av andra undersökningar om toxicitet samt befintlig kunskap om ämnets användning. Med tanke på de olika faktorer som man kan behöva ta hänsyn till är ett strikt schema för val av tester därför inte lämpligt. Några allmänna principer kan dock ge viss vägledning. Om ett test var positivt i bastesterna bör de kompletterande undersökningarna inbegripa åtminstone ett test som kan spåra samma genetiska endpoints. Om båda undersökningarna i bastesterna var negativa bör ett test för genmutationer liksom ett test för kromosomförändringar normalt utföras som kompletterande undersökningar. Det kan dessutom vara lämpligt att skaffa fram ytterligare data genom indikatortesterna (se nedan).

Metoder för sådana tester anges nedan indelade i grupper på grundval av deras viktigaste genetiska endpoints.

Tester för undersökning av gen(punkt)mutationer

För ytterligare tester av ett ämnes potential att framkalla gen(punkt)mutationer kan följande tester vara lämpliga:

a) Framåt- eller tillbakamutationstester med användning av eukaryotiska mikroorganismer (*Saccharomyces cerevisiae*).

b) *In vitro*-tester av framåtmutation i däggdjursceller.

c) Könsbunden recessiv letal test på *Drosophila melanogaster*.

d) *In vivo-test* för undersökning av somatisk cellmutation: Fläcktest på mus.

Tester för undersökning av kromosomförändringar

För ytterligare tester av ett ämnes potential att framkalla kromosomförändringar kan följande tester vara lämpliga:

a) Cytogenetiskt *in vivo*-test med däggdjur

Här kan man överväga att utföra en metafasanalys av benmärgsceller *in vivo*, om detta inte har gjorts inom ramen för den initiala undersökningen (bastesterna). Dessutom kan cytogenetiska *in vivo*-tester av könsceller företas.

b) Cytogenetiskt *in vitro*-test med däggdjursceller, om detta inte har gjorts inom ramen för den initiala undersökningen.

c) Dominant letal test med gnagare.

d) Test för undersökning av ärftlig translokation med mus.

Indikatortest för verkningar på DNA

Det finns metoder genom vilka man kan konstatera vissa verkningar på DNA, men som inte har en mutagen verkan som "endpoint". Dessa undersökningar kan ge upplysningar som kompletterar resultaten av undersökningarna om mutagenocitet och som kan vara till nytta vid tolkningen av sådana undersökningar. Om det finns ett behov av sådan undersökningar kan följande tester, med användning av eukaryotiska mikroorganismer eller däggdjursceller, anses vara lämpliga:

a) Mitotisk rekombination med *Saccharomyces cerevisiae*.

b) DNA-skador och DNA-reparation – felaktig DNA-syntes – däggdjursceller *(in vitro)*.

c) Undersökning av systerkromatidbyten med däggdjursceller *(in vitro)* .

Andra indikatortester för cancerogenetisk potential

Det finns tester för att mäta ett ämnes potential att inducera morfologiska och beteendemässiga förändringar i cellkulturer som tros vara förbundna med maligna transformationer *in vivo*. Ett rad olika celltyper och kriterier för transformation kan användas.

Bedömning av risken för ärftliga verkningar i däggdjur

Det finns metoder för att mäta ärftliga verkningar i intakta däggdjur framkallade av gen(punkt)mutationer (som i det särskilda locustestet med mus[1]) eller av kromosomförändringar (som i testet för ärftlig translokation med mus). Sådana metoder kan användas vid bedömning av ett ämnes eventuella genetiska risk för människor. Till följd av komplexiteten av dessa tester och det mycket stora antal djur som krävs, särskilt för det specifika locustestet, måste det finnas starka motiv innan dessa tester utförs.

---

(1) Det specifika locustestet med mus (vilket inte beskrivs i detta dokument) kan användas för mätning av mutationer hos den första generationen sedan föräldrarnas könsceller exponerats för ett mutagent ämne. Genetiska förändringar, som leder till ärftliga förändringar med synliga fenotypiska utslag, kan spåras och kvantifieras.

TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET

90 DAGARS REPETERAD ORALTEST PÅ GNAGARE

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs oralt dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, en dos per grupp i 90 dagar. Under doseringsperioden observeras djuren dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under försöket obduceras, och i slutet av försöket avlivas och obduceras överlevande djur.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas unga friska djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Testämnet kan tillföras via fodret, med magsond, i kapslar, eller via dricksvattnet. Samma tillförselmetod skall användas för alla djur under hela behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta dosering skall det vara fastställt att de inte framkallar några toxiska verkningar. I lämpliga fall kan tidigare insamlade data användas.

Försöksbetingelser

Försöksdjur

Om det inte finns kontraindikationer skall i första hand råttor användas. Unga friska djur från vanligen nyttjade laboratoriestammar skall användas. Helst skall dosering inledas innan råttorna är sex veckor gamla, och under inga omständigheter efter åtta veckors ålder. Vid inledningen av försöket får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten. Om ett test av subkronisk toxicitet med oral tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma djurart och stam användas i båda undersökningarna.

Antal och kön

Minst 20 djur (10 hondjur och 10 handjur) skall användas på varje dosnivå. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av försöksdjur under försöket skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan försöket slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 20 djur (10 av vardera kön) behandlas med den högsta dosen i 90 dagar och därefter observeras i 28 dagar för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska verkningar.

Dosnivåer

Minst tre dosnivågrupper samt en kontrollgrupp skall användas. Djuren i kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som djuren i testgrupperna, bortsett från att de inte skall tillföras testämnet. Om vehikel används för att underlätta dosering skall kontrollgruppen tillföras vehikeln på samma sätt som behandlingsgrupperna. Vidare skall vehikeln tillföras kontrollgruppen i samma mängd som emottas av försöksdjuren i gruppen med den högsta dosnivån. Den högsta dosnivån bör medföra toxiska verkningar men inte leda till någon, eller endast begränsad, dödlighet. Den lägsta dosnivån bör inte medföra några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människors exponering för testämnet bör den lägsta dosnivån vara högre än denna. Idealt skall medeldosen endast medföra minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Om fler än en medeldos används skall dosnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska verkningarna erhålls.

I de grupper som behandlas med låg- och medeldoser och i kontrollgruppen bör antalet dödsfall vara lågt för att en utvärdering av resultaten skall vara meningsfylld.

Om testämnet tillförs via fodret kan antingen en konstant koncentration (ppm eller mg/kg foder) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas. Det alternativ som används skall anges. Om ett testämne tillförs via magsond skall dosen ges vid samma tid varje dag. Dosnivåerna skall justeras med jämna mellanrum (varje eller varannan vecka) för att hålla dosnivån konstant i förhållande till djurens kroppsvikt.

Gränstest

Om ett 90-dagarsförsök som utförs i enlighet med nedan beskrivna metod och med en dosnivå på 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag, eller en högre dosnivå om detta motiveras av kännedom om eventuell exponering för människor, inte medför några tecken på toxiska verkningar kan ytterligare tester anses vara överflödiga. Om ett testämne med låg toxicitet tillförs via fodret är det viktigt att säkerställa att mängden av och egenskaperna hos den aktuella testämnet inte påverkar normala näringskrav.

Observationsperiod

Samtliga djur skall observeras dagligen och tecken på toxicitet skall registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde för första gången samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner bör registreras.

Förfarande

Idealt tillförs testämnet varje dag i 90 dagar. Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning skall observeras i ytterligare 28 dagar utan behandling för att fastställa om de toxiska verkningarna försvinner eller håller i sig.

Observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkualtionssystemen, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Foderintaget (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) skall mätas varje vecka och djuren skall vägas en gång i veckan.

Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testperioden avlivas och obduceras alla överlevande djur, utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas, avlivas och obduceras.

Följande undersökningar skall genomföras på alla djur, inbegripet kontrollgruppen:

a) Innan testämnet tillförs samt sedan försöket avslutats skall en oftamologisk undersökning utföras med användning av ett oftalmoskop eller liknande lämplig utrustning, helst på alla djur men åtminstone på djuren i den högsta dosgruppen och i kontrollgruppen. Om förändringar i ögonen observeras bör alla djur undersökas.

b) Vid slutet av testperioden skall en hematologisk undersökning utföras, inbegripet hematokrit- och hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differentialräkning av leukocyter, mätning av koaguleringsförmågan, t. ex. koagulationstid, protombintid, tromboplastintid eller blodplättsräkning.

c) Vid slutet av försöksperioden skall en klinisk-biokemisk blodanalys utföras. För denna undersökning är följande analysområden lämpliga: elektrolytbalans, kolhydratmetabolism, lever- och njurfunktion. Valet av specifika analyser kommer att påverkas av observationer av testämnets verkningssätt. Följande bestämningar föreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium,

fasteglukos (fasteperioden beror på djurarten), glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas(1), glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas(2), ornitin dekaroxylas, gamma-glutamyl-transpeptidas, urinkväve, albumin, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein. Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en tillfredsställande toxikologisk bedömning inbegriper lipidsanalys, hormoner, syra/basbalans, methemoglobin och kolinesterasaktivitet. Ytterligare klinisk-biokemiska analyser kan vid behov utföras för att vidare utreda de observerade verkningar.

d) En urinanalys krävs i regel inte, men kan dock vara nödvändig om en toxisk verkan förväntas eller observeras.

Om tidigare insamlade basdata är otillräckliga bör man överväga att bestämma hematologiska och klinisk-biokemiska parametrar innan man inleder försöket.

Makroskopisk undersökning

Alla försöksdjur skall genomgå en fullständig makroskopisk undersökning som inbegriper undersökning av alla externa kroppsytor, alla kroppsöppningar liksom kranie-, bröstkorgs- och bukhålan samt deras innehåll. Lever, njurar, binjurar och testiklar skall vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning.

Följande vävnader och organ skall förvaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning: alla vävnader och organ som uppvisar lesioner, hjärnan – inbegripet snitt av medulla/pons, lillhjärnbarken och hjärnbarken, hypofysen, sköldkörteln/bisköldkörteln, thymusvävnad, luftstrupe och lungor, hjärta, stora kroppspulsådern, (spottkörtlar), lever, mjälte, njurar, binjurar, bukspottskörtel, könskörtlar, livmoder, (associerade könsorgan), (hud), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, representativa lymfkörtlar, (kvinnliga bröstkörtlar), (lårmuskulatur), nerver från det perifera nervsystemet, bröstbenet med benmärg, (ögon), (femur, inbegripet ledyta), (ryggmärg på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från ländområdet), och (exorbitala tårkörtlar). De vävnader som anges inom paranteser behöver endast undersökas om det finns tecken på toxicitet eller i samband med målorgan.

Histopatologisk undersökning

a) En fullständig histopatologisk undersökning skall utföras på organ och vävnader från djuren i kontroll- och högdosgrupperna.

b) Alla allvarliga lesioner skall undersökas.

c) Målorganen i andra doseringsnivågrupper skall också undersökas.

d) Lungorna från djur i låg- och medeldosgrupperna skall undersökas histopatologiskt för tecken på infektion, eftersom detta ger en lämplig uppfattning om djurens hälsotillstånd. Man bör även överväga en histopatologisk undersökning av lever och njurar från djur i dessa grupper. Ytterligare histopatologiska undersökningar av djur i dessa grupper krävs inte rutinmässigt, men organ som har visat tecken på lesioner hos högdosgruppen måste alltid undersökas.

e) Djur i en eventuell satellitgrupp skall underkastas en histopatologisk undersökning av de organ och vävnader som har uppvisat toxiska verkningar i de behandlade grupperna.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje grupp anges antal djur vid inledningen av försöket, antal djur med lesioner och den procent djur som uppvisar varje slag av lesion. Resultaten skall utvärderas på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel, om sådan använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

(1) Numera känt som serum alanine aminotransferase.
(2) Numera känt som serum aspartate aminotransferase.

— Icke toxisk dos, om sådan fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar.

— Tidpunkten för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Oftamologiska rön.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Använda klinisk-biokemiska analyser och alla resultat (inbegripet resultat av en eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET

90 DAGARS REPETERAD ORALTEST PÅ ICKE-GNAGARE

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B..

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs oralt dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur (icke-gnagare), en dos per grupp i 90 dagar. Under doseringsperioden skall djuren observeras dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under försöket obduceras, och i slutet av försöket avlivas och obduceras överlevande djur.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas unga friska djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Testämnet kan tillföras via fodret eller i kapslar om detta är lämpligare. Samma tillförselmetod skall användas för alla djur under hela behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen skall det vara fastställt att de inte framkallar några toxiska verkningar. I lämpliga fall kan tidigare insamlade data användas.

Försöksbetingelser

Försöksdjur

Det vanligen nyttjade försöksdjuret (icke-gnagare) är hunden, som helst skall vara av en definierad ras. Andra icke-gnagare får användas. Unga friska djur skall användas och i fråga om hundar skall dosering helst inledas mellan fyra och sex månaders ålder och och inte senare än nio månaders ålder. Om ett test av subkronisk toxicitet med oral tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma art/ras användas i båda undersökningarna.

Antal och kön

Minst åtta djur (fyra hondjur och fyra handjur) skall användas på varje doseringsnivå. Antal överlevande djur vid försökets avslutning skall vara tillräckligt högt för att säkerställa en meningsfull utvärdering av toxiska verkningar.

Dosnivåer

Minst tre dosnivågrupper och en kontrollgrupp skall användas. Djuren i kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som djuren testgrupperna, bortsett från att de inte skall tillföras testämnet. Den högsta dosnivån bör medföra toxiska verkningar men inga dödsfall. Den lägsta dosnivån bör

inte ge några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet skall den lägsta nivån vara högre än denna. Idealt skall medeldosen medföra minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Om fler än en medeldos används skall dosnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska verkningarna erhålls.

I de grupper som behandlas med låg- och medeldoser och i kontrollgruppen bör inga dödsfall förekomma.

Om ämnen med låg toxicitet tillförs via fodret är det viktigt att säkerställa att mängden av det aktuella testämnet inte påverkar normala näringskrav.

Om testämnet tillförs via fodret kan antingen en konstant koncentration (ppm eller mg/kg foder) eller en konstant koncentration i förhållande till djurens kroppsvikt användas. Det alternativ som används skall anges. Om ett testämne tillförs direkt, t. ex. via en kapsel, skall dosen ges vid samma tid varje dag och dosnivåerna skall vid behov justeras varje vecka för att hålla dosnivån konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett test av subkronisk toxicitet genom oral tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma foder användas i båda undersökningarna.

Gränstest

Om ett 90-dagarsförsök som utförs i enlighet med nedan beskrivna metod och med en dosnivå på 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag, eller en högre dosnivå om detta motiveras av kännedom om eventuell exponering för människor, inte medför några tecken på toxiska verkningar kan ytterligare tester anses vara överflödiga. Om ett testämne med låg toxicitet tillförs via fodret är det viktigt att säkerställa att mängden av och egenskaperna hos den aktuella testämnet inte påverkar normala näringskrav.

Observationsperiod

Samtliga djur skall observeras dagligen och tecken på toxicitet skall registrera tillsammans med tidpunkten då de uppträdde för första gången samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder och försvinner skall registreras.

Förfarande

Idealt tillförs testämnet varje dag i 90 dagar. Av främst praktiska skäl är det emellertid godtagbart med dosering fem dagar i veckan om ämnet tillförs på annat sätt än via fodret.

Observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Foderintaget (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) skall mätas varje vecka och djuren skall vägas en gång i veckan.

Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testeperioden avlivas och obduceras alla överlevande djur, utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas och obduceras.

Följande undersökningar skall utföras på alla djur, inbegripet kontrollgruppen:

a) En oftamologisk undersökning med användning av ett oftalmoskop eller liknande lämplig utrustning skall utföras innan testämnet tillförs samt sedan försöket avslutats, helst på alla djur men åtminstone på djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om förändringar i ögonen observeras skall alla djur undersökas.

b) En hematologisk undersökning, inbegripet hematokrit- och hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differentiell leukocyträkning, mätning av koagulationsnivån, t. ex. koagulationstid, protombintid, tromboplastintid eller blodplättsräkning, skall företas i början av försöket, och sedan antingen varje månad eller när halva försökstiden har gått, och slutligen i slutet av försöksperioden.

c) En klinisk-biokemisk blodanalys skall företas i slutet av försöksperioden. För denna undersökning är följande analyser lämpliga: elektrolytbalans, kolhydratmetabolism, lever- och njurfunktion. Valet av specifika analyser kommer att påverkas av observationer av testämnets verkningssätt. Följande bestämningar föreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukos (fasteperioden beror på djurarten), glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas([1]), glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas([2]), ornitin dekaroxylas, gamma-glutamyl-transpeptidas, urinkväve,

([1]) Numera känt som serum alanine aminotransferase.
([2]) Numera känt som serum aspartate aminotransferase.

albumin, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein. Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en tillfredsställande toxikologisk bedömning inbegriper analyser av lipider, hormoner, syra/basbalans, methemoglobin och kolinesterasaktivitet. Ytterligare kliniskbiokemiska analyser kan utföras då sådana behövs för en vidare undersökning av observerade verkningar.

d) En urinanalys krävs i regel inte, men kan dock vara nödvändig om en toxisk verkan förväntas eller observeras.

Makroskopisk undersökning

Alla djur bör underkastas en fullständig makroskopisk undersökning som inbegriper undersökning av alla externa kroppsytor, alla kroppsöppningar liksom kranie-, bröstkorgs- och bukhålan samt deras innehåll. Lever, njurar, binjurar och testiklar skall vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning.

Följande vävnader och organ bör bevaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning: alla vävnader och organ som uppvisar lesioner, hjärnan – inbegripet snitt av medulla/pons, lillhjärnbarken och hjärnbarken, hypofysen, sköldkörteln/bisköldkörteln, thymusvävnad, (luftstrupe) och lungor, hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever, mjälte, njurar, binjurar, bukspottskörtel, könskörtlar, livmoder, (associerade könsorgan), (hud), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, representativa lymfkörtlar, (kvinnliga bröstkörtlar), (lårmuskulatur), nerver från det perifera nervsystemet, bröstbenet med benmärg, (ögon), (femur, inbegripet ledyta), (ryggmärg på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från ländområdet). De vävnader som anges inom paranteser behöver endast undersökas om det finns tecken på toxicitet eller i samband med målorgan.

Histopatologisk undersökning

En fullständig histopatologisk undersökning skall utföras på organ och vävnader från kontroll- och högdosgrupperna. Ytterligare histopatologiska undersökningar av andra dosgrupper bör utföras på organ som utvisar lesioner i högdosgruppen, eller för vilka kliniska obserationer påvisar behov av en sådan undersökning.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje grupp anges antal djur vid försökets inledning, antal djur med lesioner och procent djur som uppvisar varje slag av lesion. Resultaten skall utvärderas på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel om sådan använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion efter kön och dosnivå.

— Icke toxisk dos, om sådan fastställts.

— Tidpunkt för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar (särskilt kliniska rön).

— Tidpunkt för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Oftamologiska rön.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Använda klinisk-biokemiska tester och alla resultat (inbegripet resultat av en eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. **REFERENSER**

Se allmän inledning till del B.

TEST AVSEENDE SUBKRONISK DERMAL TOXICITET

90 DAGARS REPETERAD DERMALTEST PÅ GNAGARE

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet appliceras dagligen på huden i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, en bestämd dos per grupp i 90 dagar. Under försöksperioden skall djuren observeras dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under försöket obduceras och i slutet av försöket avlivas och obduceras överlevande djur.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas unga friska djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Kort innan försöket klipps ryggpälsen bort på försöksdjuren. Om pälsen rakas bort bör detta ske ca 24 timmar innan försöket inleds. Klippning och rakning måste normalt upprepas varje vecka. Vid klippning eller rakning skall försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Minst 10 % av djurets kroppsyta skall göras klar för applicering av testämnet. Djurets vikt måste beaktas vid bestämning av hur stort område som skall klippas. Vid test av fasta ämnen, vilka vid behov kan pulveriseras, skall testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov, med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda. Daglig applicering fem till sju dagar i veckan skall ske.

Försöksbetingelser

Försöksdjur

Vuxna råttor eller kaniner får användas. Andra djurarter kan användas men detta måste motiveras. Djur av vanligen nyttjade laboratoriestammar skall användas. Vid inledning av försöket får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten. Om ett test av subkronisk toxicitet med dermal tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma djurart och stam användas i båda under-sökningarna.

Antal och kön

Minst 20 djur (10 hondjur och 10 handjur) med frisk hud skall användas på varje doseringsnivå. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av försöksdjur under försöket skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan försöket slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 20 djur (10 av vardera kön) behandlas med den högsta dosen i 90 dagar och därefter observeras i 28 dagar för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska verkningar.

Dosnivåer

Minst tre dosnivågrupper och en kontrollgrupp skall användas. Om vehikel används skall, förutom kontrollgruppen, en vehikelkontrollgrupp användas. Exponeringsperioden bör vara minst sex timmar per dag. Applicering av testämnet bör ske vid samma tidpunkt varje dag och den mängd ämne som används skall justeras regelbundet (varje eller varannan vecka) för att säkerställa att den hålls konstant i förhållande till djurets kroppsvikt. Djuren i kontrollgrupen skall behandlas på samma sätt som försöksdjuren, bortsett från applicering av testämnet. Om vehikel används för att underlätta doseringen skall vehikelkontrollgruppen doseras på samma sätt som försöksgrupperna och ges samma mängd ämne som den som appliceras på djuren i den försöksgrupp med den den högsta doseringsnivån. Den högsta doseringsnivån bör medföra toxiska verkningar men inte leda till någon, eller endast begränsad, dödlighet. Den lägsta doseringsninvån bör inte ha någon toxisk verkan. Om det finns en användbar uppskattning av människors högsta exponering för ämnet bör den lägsta dosnivån vara högre än denna. Idealt skall medeldosen medföra minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Om flera medel-dosnivåer används skall de väljas på ett sätt att en gradering av de toxiska verkningarna. erhålls. I lågdos-, medeldos- och kontrollgrupperna bör antalet dödsfall vara få för att möjliggöra en meningsfull utvärdering av resultaten.

Om testämnet medför allvarlig hudirritation bör koncentrationen sänkas, vilket kan leda till en minskning eller ett fullständigt bortfall av de övriga toxiska verkningarna vid den högsta doseringsnivån. Om huden har skadats allvarligt kan det vara nödvändigt att avbryta försöket och utföra ett nytt försök med en lägre koncentration.

Gränstest

Om en dos av 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag eller en högre doseivå som fastställts på grundval av kännedom om exponering för människor, inte medför någon toxisk verkan kan ytterligare testning anses överflödig.

Observationsperiod

Samtliga djur skall observeras dagligen och tecken på toxicitet registreras. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner skall registreras.

Förfarande

Djuren skall hållas i var sin bur. Idealt appliceras testämnet varje dag i 90 dagar.

Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning bör hållas under observation i ytterligare 28 dagar utan applicering av testämne för att fastställa om de toxiska verkningarna försvinner eller håller i sig. Exponeringsperioden bör vara sex timmar per dag.

Testämnet skall appliceras jämnt över ett område som motsvarar ca 10 % av den total kroppsytan. Vid användning av kraftigt toxiska ämnen kan en mindre yta täckas, men ämnet skall appliceras på ytan i ett så tunt och jämnt lager som möjligt.

Testämnet hållas i kontakt med huden med en porös gaskompress och icke hudirriterande tejp. Testytan skall vidare täckas på lämpligt sätt för att säkerställa att gaskompressen och testämnet hålls på plats och att djuren inte kan svälja testämnet. För att förhindra att djuren intar testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas, men total immobilisering rekommenderas inte.

I slutet av exponeringsperiodens skall resterande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med annan lämplig metod för rengöring av huden.

Samtliga djur skall observeras dagligen och tecken på toxicitet skall registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde för första gången samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observationer av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet, kroppsmotorik samt beteendemönster. Foderintag och djurens vikt skall registreras en gång i veckan. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testperioden avlivas och obduceras alla överlevande djur, utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas, avlivas och obduceras.

Följande undersökningar utförs normalt på alla djur, inbegripet kontrollgruppen:

a) Innan testämnet appliceras samt sedan försöket avslutats utförs en oftamologisk undersökning med användning av ett oftalmoskop eller liknande lämplig utrustning, helst på alla djur men åtminstone på djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om förändringar i ögonen observeras skall alla djur undersökas.

b) Vid slutet av testperioden skall en hematologisk undersökning utföras, inbegripet hematokrit- och hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differentiell leukocyträkning, mätning av koagulationsnivån, t. ex. koagulationstid, protombintid, tromboplastintid eller blodplättsräkning.

c) Vid slutet av försöksperioden skall en klinisk-biokemisk blod analys utföras. För denna undersökning är följande analysområden lämpliga: elektrolytbalans, kolhydratmetabolism, lever- och njurfunktion. Valet av specifika analyser kommer att påverkas av observationer av testämnets verkningssätt. Följande bestämningar föreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukos (fasteperioden beror på djurarten), glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas(1), glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas(2), ornitin dekarboxylas, gamma-glutamyl-transpeptidas, urinkväve, albumin, blodkreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein.

Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en tillfredsställande toxikologisk bedömning inbegriper analyser av lipider, hormoner, syra/basbalans, methemoglobin och kolinesterasaktivitet. Ytterligare klinisk-biokemiska analyser kan utföras då sådana behövs för en vidare undersökning av observerade verkningar.

d) En urinanalys krävs i regel inte, men kan dock vara nödvändig om en toxisk verkan förväntas eller observeras.

Om tidigare insamlade basdata är otillräckliga bör man överväga att bestämma hematologiska och klinisk-biokemiska parametrar innan man inleder försöket.

Makroskopisk undersökning

Alla djur bör underkastas en fullständig obduktion som inbegriper undersökning av alla externa kroppsytor, alla kroppsöppningar liksom kranie-, bröstkorgs- och bukhålan samt deras innehåll. Lever, njurar, binjurar och testiklar skall vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undgå uttorkning. Följande vävnader och organ bör bevaras i ett lämpligt medium för en eventuell framtida histopatologisk undersökning: alla vävnader och organ som uppvisar lesioner, hjärnan – inbegripet snitt av medulla/pons, lillhjärnbarken och hjärnbarken, hypofysen, sköldkörteln/bisköldkörteln, thymusvävnad, (luftstrupe) och lungor, hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever, mjälte, njurar, binjurar, bukspottskörtel, könskörtlar, livmoder, associerade könsorgan, gallblåsa (om sådan finns), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, representativa lymfkörtlar, (kvinnliga bröstkörtlar), (lårmuskulatur), nerver från det perifera nervsystemet, (bröstbenet med benmärg), (ögon), (femur, inbegripet ledyta), (ryggmärg på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från ländområdet), och (exorbitala tårkörtlar). De vävnader som anges inom paranteser behöver endast undersökas om det finns tecken på toxicitet eller i samband med målorgan.

Histopatologisk undersökning

a) En fullständig histopatologisk undersökning skall utföras på obehandlad och behandlad hud och på organ och vävnader från alla djur i kontroll- och högdosegrupperna.

b) Alla allvarliga lesioner skall undersökas.

c) Målorgan i andra dosgrupper skall också undersökas.

d) Om råttor används skall lungorna från djur i låg- och medeldoserupperna undersökas histopatologiskt för tecken på infektion, eftersom detta ger en lämplig uppfattning om djurens hälsotillstånd. Ytterligare histopatologiska undersökningar av djur i dessa grupper krävs inte rutinmässigt, men organ som har uppvisat tecken på lesioner i högdosgruppen skall alltid undersökas.

e) Djur i en eventuell satellitgrupp bör underkastas en histopatologisk undersökning av de organ och vävnader som har visat tecken på toxisk verkan hos djur i de behandlade grupperna.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje grupp skall anges antal djur i början av försöket, antal djur med lesioner och den procent djur som uppvisar varje slag av lesion. Resultaten skall utvärderas på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

(1) Numera känt som serum alanine aminotransferase.
(2) Numera känt som serum aspartate aminotransferase.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel om sådan använts) och koncentrationer.

— Upplysningar om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke-toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar.

— Tidpunkt för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Oftamologiska rön.

— Hematologiska undersökningar och samtliga resultat.

— Använda klinisk-biokemiska undersökningar och samtliga resultat (inbegripet resultat av en eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Eventuell statistisk bearbetning av resultaten.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se den allmäna inledningen till del B.

4. REFERENSER

Se den allmäna inledningen till del B.

TEST AVSEENDE SUBKRONISK INHALATIONSTOXICITET

90 DAGARS REPETERAD INHALATIONSTEST PÅ GNAGARE

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Flera grupper av försöksdjur exponeras dagligen under en angiven period för graderade koncentrationer av testämnet, en bestämd koncentration per grupp i 90 dagar. Om vehikel används för att underlätta framtagning av lämplig koncentration av testämnet i luften, skall en kontrollgrupp som utsätts för vehiklen användas. Under försöksperioden observeras djuren dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under testet skall obduceras och i slutet av testet avlivas och obduceras överlevande djur.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före testet fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Vid behov kan en vehikel tillsättas för att underlätta framtagning av lämplig koncentration av testämnet i luften. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta dosering skall det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska verkningar. I lämpliga fall kan tidigare insamlade data användas.

Försöksbetingelser

Försöksdjur

Om det inte finns kontraindikationer skall i första hand råttor användas. Unga friska djur från vanligen nyttjade laboratoriestammar skall användas. Vid inledning av testet får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från en lämplig genomsnittsvikt. Om ett test av subkronisk toxicitet genom inhalation utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma djurart och stam användas i båda undersökningarna.

Antal och kön

Minst 20 djur (10 hondjur och 10 handjur) används på varje koncentrationsnivå. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av djur under testet skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan studien slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 20 djur (10 av vardera könet) tillföras den högsta koncentrationen i 90 dagar och därefter observeras i 28 dagar för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska verkningar.

Exponeringskoncentrationer

Minst tre koncentrationsnivågrupper och en kontrollgrupp eller en kontrollgrupp som tillförs vehikeln (i en koncentration som motsvarar den högsta koncentrationen av vehikeln) skall användas. Djuren i kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som djuren i behandlingsgrupperna, bortsett från att de inte skall utsättas för testämnet. Den högsta koncentrationsnivån bör medföra toxiska verkningar men inte leda till någon, eller begränsad, dödlighet. Den lägsta koncentrationsnivån skall inte medföra några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet skall den lägsta nivån vara högre än denna. Idealt skall medelkoncentrationen ge minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Om fler än en medelkoncentration används skall koncentrationsnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska verkningarna erhålls. I låg-, medelkoncentrations- och kontrollgrupperna skall antalet dödsfall vara få för att möjliggöra en meningsfull utvärderingen av resultaten.

Exponeringstid

Den dagliga exponeringsprioden är sex timmar och en jämn fördelning av koncentrationen i kamrarna måste säkerställas. Vid särskilda omständigheter kan även andra perioder användas.

Utrustning

Djuren skall testas med inhalationsutrustning som utformats så att den upprätthåller en dynamisk luftcirkulation med minst 12 luftväxlingar per timme, för att säkerställa en tillräcklig syrehalt och en jämnt fördelad exponerings-atmosfär. Om exponeringskammare används skall den vara så utformad att trängseln bland försöksdjuren minimeras och exponeringen för testämnet genom inhalation maximeras. Som en allmän regel för att säkerställa en stabil atmosfär i en kammare, skall försöksdjurens totala "volym" inte överstiga 5 % av exponeringskammarens volym. Exponeringen kan göras genom kammare för mun-näsa, enbart huvudet eller hela försöksdjurets kropp; vid användning av de två första metoderna minskar man möjligheten att testämnet upptas via andra vägar.

Observationsperiod

Alla försöksdjur skall observeras dagligen för tecken på toxicitet under hela försöket och under återhämtningsperioden. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner skall registreras.

Förfarande

Djuren skall exponeras för testämnet dagligen, fem till sju dagar i veckan, i 90 dagar. En eventuell satellitgrupp avsedd för efterföljande observationer bör hållas under observation i ytterligare 28 dagar, utan tillförsel av testämne, så att man har möjlighet att registrera om de toxiska verkningarna försvinner eller persisterar. Temperaturen under försöket skall hållas vid 22 ± 3 C. Under ideala betingelser skall den relativa luftfuktigheten hållas mellan 30 % och 70 %, men i vissa fall (t. ex. test med aerosoler) kan detta vara praktiskt ogenomförbart. Under exponeringen skall djuren undanhållas foder och vatten.

Ett dynamiskt respirationssystem med ett lämpligt analytiskt kontrollsystem skall användas. Ett försökstest rekommenderas för att fastställa lämpliga exponeringskoncentrationer. Luftgenomströmningen skall justeras för att säkerställa att betingelserna är homogena i hela exponeringskammaren. Systemet skall vara sådant att det så snabbt som möjligt går att säkerställa stabila exponeringsbetingelser.

Följande skall mätning eller kontrollers:

a) Luftgenomströmningen: Luftgenomströmningen i kammaren skall helst kontrolleras fortlöpande.

b) Den faktiska koncentrationen av testämnet mätt i respirationszonen. Under den dagliga exponeringsperioden skall koncentrationen inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen. En sådan kontrollnivå kan emellertid var omöjlig att uppnå vid test med stoft och vissa aerosoler, och i sådana fall kan större avvikelser accepteras. Under inkörning av urustningen bör analys göras av partikelstorleken för att bestämma aerosolkoncentrationens stabilitet. Under exponeringen skall analyser göras så ofta som möjligt för att bestämma fördelningen av partikelstorleken.

c) Temperatur och luftfuktighet.

d) Under och efter exponering skall observationer göras och registreras systematiskt för varje enskilt djur. Alla djur skall observeras dagligen och tecken på toxicitet skall registeras, inbegripet när dessa tecken uppträder för första gången, hur länge de varar, och hur kraftiga de är. Inspektioner av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Foderintaget och djurens vikt skall registreras en gång i veckan. Regelbunden inspektion av djuren är nödvändig för att minimera förlust av djur som ingår i försöket

till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. Vid försökets avslutning skall alla överlevande djur avlivas och obduceras. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas och obduceras.

Alla djur inklusive kontrollgruppen genomgå följande undersökning:

a) Före exponering för testämnet samt sedan försöket avslutats skall en oftamologisk undersökning med användning av ett oftalmoskop eller liknande lämplig utrustning utföras, helst på alla djur men åtminstone på högdos- och kontrollgrupperna. Om förändringar i ögonen observeras skall alla djur undersökas.

b) Vid slutet av försöket skall en hematologisk undersökning utföras, inbegripet hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differentiell leukocyträkning samt ett mått på koaguleringsförmågan, t. ex. koagulationstid, protombintid, tromboplastintid eller blodplättsräkning.

c) Vid slutet av försöksperioden skall en klinisk-biokemisk blodanalys utföras. För denna undersökning är följande analyser lämpliga: elektrolytbalans, kolhydratmetabolism, lever- och njurfunktion. Valet av specifika analyser kommer att påverkas av observationer av testämnets verkningssätt. Följande bestämningar föreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukos (fasteperioden beror pådjurarten), glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas(1), glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas(2), ornitin dekarboxlas, gamma-glutamyltranspeptidas, urinkväve, albumin, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein.

   Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en adekvat toxikologisk utvärdering inbegriper analyser av lipider, hormoner, syra/basbalansen, metehemoglobin och kolinesterasaktivitet. Ytterligare klinisk-biokemiska analyser kan vid behov utföras för att vidare utreda de observerade verkningar.

d) En urinanalys krävs i regel inte, men kan dock vara nödvändig om en toxisk verkan förväntas eller observeras.

Om tidigare insamlade grundläggande uppgifter är otillräckliga bör man överväga att bestämma hematologiska och klinisk-biokemiska parametrar innan man inleder försöket.

Makroskopisk undersökning

Alla försöksdjur skall genomgå en fullständig makroskopisk undersökning som inbegriper undersökning av alla externa kroppsytor, alla kroppsöppningar liksom kranie-, bröstkorgs- och bukhålan samt deras innehåll. Lever, njurar, binjurar och testiklar skall vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning. Följande vävnader och organ skall förvaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning: alla vävnader och organ som företer allvarliga lesioner, lungor – som skall tas ut hela och oskadade, vägas och behandlas med ett lämpligt fixativ för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls (perfusion med ett fixativ anses vara ett effektivt förfarande), vävnader i näs-svalgrummet, hjärnan – inbegripet snitt av medulla/pons, lilllhjärnbarken och hjärnbarken, hypofysen, sköldkörteln/bisköldkörteln, thymusvävnad, luftstrupe och lungor, hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever, mjälte, njurar, binjurar, bukspottskörtel, könskörtlar, livmoder, (associerade könsorgan), (hud), gallblåsa (om sådan finns), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, representativa lymfkörtlar, (kvinnliga bröstkörtlar), (lårmuskulatur), nerver från det perifera nervsystemet, (ögon), bröstbenet med benmärg, (femur, inbegripet ledyta) och (ryggmärg på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från ländområdet). De vävnader som anges inom parenteser behöver endast undersökas om det finns tecken på toxicitet eller i samband med målorgan.

Histopatologisk undersökning

a) En fullständig histopatologisk undersökning skall utföras på luftvägarna och andra organ och vävnader från alla djur i kontroll- och högdosgrupperna.

b) Alla allvarliga lesioner skall undersökas.

c) Målorganen från andra dosgrupper skall undersökas.

d) Lungor från djur i lågdos- och medeldosgrupperna skall underkastas en histopatologisk undersökning eftersom detta ger en lämplig uppfattning om djurens hälsotillstånd. Ytterligare histopatologiska undersökningar av djur från dessa grupper krävs inte rutinmässigt, men sådana organ som har visat tecken på förändringar i högdosgruppen skall alltid undersökas.

e) Om en satellitgrupp har använts bör en histopatologisk undersökning göras på sådana organ och vävnader som har visat tecken på toxisk verkan hos djur i behandlade grupperna.

(1) Nuförtiden känt som serum-alanin-aminotransferas.
(2) Nuförtiden känt som serum-aspartat-aminotransferas.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje grupp skall anges antalet djur i början av försöket, antal djur med lesioner och den procent djur som uppvisar varje slag av lesion. Resultaten skall utvärderas på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Testbetingelser:

Beskrivning av exponeringsapparaturen: inklusive utformning, typ, dimensioner, luftkälla, system för framställning av finfördelade ämnen och aerosoler, metod att konditionera luften och sätt att hålla djuren i en försökskammare när sådan används. Utrustning för mätning av temperatur, luftfuktighet och finfördelade aerosolers koncentration och storlek skall beskrivas.

Exponeringsdata: Dessa skall ställas upp i tabellform och presenteras med medelvärden och ett spridningsmått (t. ex. standardavvikelse) och skall, om möjligt, omfatta

a) luftgenomströmningen genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

c) nominella koncentrationer (total mängd testämne som tillförts inhalationsutrustningen, dividerat med luftvolymen),

d) typ av vehikel, om sådan används,

e) faktiska koncentrationer i försökets respirationszon,

f) partiklarnas medianstorlek (i tillämpliga fall),

— Upplysningar om toxisk reaktion uppdelade efter kön och koncentration.

— Icke toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under testet eller överlevnad till slutet av testet.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar.

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Oftamologiska rön.

— Utförda hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Utförda klinisk-biokemiska undersökningar och alla resultat (inbegripet resultat av en eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

— detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Statistisk behandling av resultaten när detta är möjligt,

— Diskussion om resultaten,

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. REFERENSER

Se allmän inledning till del B.

TERATOGENICITETSTEST PÅ GNAGARE OCH ICKE-GNAGARE

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprinciper

Testämnet tillförs i graderade doser eller koncentrationer till flera grupper av dräktiga försöksdjur under åtminstone den del av dräktighetsperioden som omfattar organogenes, en dos per grupp. Kort före den förväntade födslotidpunkten avlivas moderdjuret, livmodern avlägsnas och innehållet undersöks. Denna testmetod omfattar toxicitet i embryo och foster.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Unga friska vuxna hondjur, som inte har varit parade, som är ungefär lika gamla och av samma storlek acklimatiseras till laboratoriebetingelserna under fem dagar före försöket och paras därefter med handjur vars fruktbarhet är fastställd på förhand. Inseminerade hondjur födelas slumpmässigt i behandlingsgrupper.

Parning kan ske naturligt eller genom insemination. Hondjuren tillförs testämnet dagligen med början kort efter implantationen och därefter under hela organogenesperioden. Dagen innan den förväntade födslodagen avlägsnas fostret genom hysterektomi och undersöks för abnormiteter i organ eller skelett, inbegripet växtretardation, försenad benbildning och blödningar i tarmarna.

Försöksbetingelser

Försöksdjur

De vanligen nyttjade försöksdjuren är råttor, möss, hamstrar och kaniner. I första hand bör råttor och kaniner användas. Vanligen nyttjade laboratoriestammar skall användas. Stammarna skall inte ha låg fertilitet och bör vara kända för att reagera på teratogener. Djuren skall hållas i varsin bur.

Antal och kön

Minst 20 dräktiga råttor, möss eller hamstrar eller 12 dräktiga kaniner används på varje dosnivå. Syftet är att säkerställa att tillräckligt många kullar erhålls för att kunna bedöma ämnets teratogena potential.

Dosnivåer

Minst tre olika dosnivågrupper och en kontrollgrupp skall användas. Om vehikel används bör även en vehikelkontrollgrupp användas. Om vehikel används måste dess toxikologiska verkningar vara kända. Den bör inte vara teratogenisk eller påverka reproduktionen. Djuren i kontrollgruppen/kontrollgrupperna skall behandlas på samma sätt som djuren i behandlingsgruppen,

bortsett från att de inte skall tillföras testämnet. Såvida det inte finns begränsningar till följd av testämnet fysikaliska-kemiska egenskaper bör den högsta dosen under ideala omständigheter ha viss omedelbar observerbar toxicitet hos moderdjuret, t. ex. viktförlust, men inte leda till mer än 10 % dödlighet bland moderdjuren. Den lägsta dosen bör inte ha någon toxisk verkan. Medeldoser (eventuellt flera) graderas geometriskt mellan den högsta och den lägsta dosen.

Gränstest

Om ett testämne med låg toxicitet vid en dosnivå på 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag inte medför några tecken på embryonal toxicitet eller teratogenicitet kan ytterligare tester anses vara överflödiga.

Exponeringstid

Som dag 0 i försöket räknas den dag då man (om det är möjligt) observerar en vaginalpropp och/eller sperma. Exponeringsperioden bör täcka den huvudsakliga delen av organogenes. Detta kan inträffa som dag 6 till 15 för råtta och mus, dag 6 till 14 för hamster eller dag 6 till 18 för kanin. Om dag 0 fastställs på grundval av parning eller artificiell insemination bör dessa perioder justeras genom att lägga till en dag före den förväntade födslodagen.

Observationstid

En noggrann klinisk undersökning skall utföras minst en gång om dagen. Ytterligare observationer bör göras dagligen och lämpliga åtgärder bör vidtas för att minimiera förlust av djur under försöket.

Förfarande

Testämnet tillförs oralt via magsond. Testämnet bör tillföras omkring samma tid varje dag.

Hondjuren behandlas med testämnet dagligen under en lämplig behandlingsperiod. Dosen kan baseras på honjurets kroppsvikt vid doseringsperiodens början eller så kan, med hänsyn till den snabba viktökning som sker under dräktigheten, djuren vägas regelbundet och dosen baseras på den senast registrerade vikten. Tecken på toxicitet skall registrera tillsammans med tidpunkten då de uppträdde för första gången samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Hondjur som visar tecken på att abortera eller föda för tidigt skall avlivas och genomgå en makroskopisk undersökning. Observationen fortsätter efter doseringsperioden fram till omkring en dag före den beräknade födslotidpunkten. Syftet är att omfatta merparten av dräktighetsperioden men att undgå de tolkningssvårigheter som kan förekomma i samband med en naturlig födsel. Observationerna skall omfatta, men inte nödvändigtvis begränsas till hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkulationssystemen, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Foderintaget skall mätas varje vecka och djuren skall vägas en gång i veckan.

Makroskopisk undersökning

Moderdjur som dör under eller i slutet av försöket skall undersökas makroskopiskt för strukturella abnormiteter eller patologiska förändringar som kan ha påverkat dräktigheten. Kort efter dödsfall avlägsnas livmodern och innehållet undersöks i syfte att fastställa eventuella döda foster på embryo- eller fosterstadiet och antalet levande foster. Vid dödsfall i livmodern är det normalt möjligt att uppskatta tidpunkten för dödsfallet. Hos råttor och kaniner kan antalet corpora lutea fastställas. Fostrens kön registreras och de vägs individuellt varvid vikten registreras och fostrens medelvikt beräknas. Sedan fostren avlägsnats undersöks varje foster externt. Hos råttor, möss och hamstrar förbereds mellan en tredjedel och hälften av varje kull och undersöks för abnormiteter i skelettet, medan den andra delen av kullen förbereds och undersöks för abnormiteter i mjukdelarna med användning av lämpliga metoder. Kaninfoster undersöks individuellt genom noggrann dissektion i syfte att fastställa abnormiteter i organ och därefter undersöka abnormiteter i skelettet.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje grupp anges antal djur i början av försöket, antal djur som blev dräktiga, antal och procent levande foster och foster med eventuella mjukdels- eller skelettabnormiteter samt deras samhörighet till olika kullar. Utvärderingen av resltat skall grundas på en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser.

— Doseringsnivå (med angivande av vehikel, om sådan använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter dos.

— Icke toxisk dos, om sådan fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar.

— Tidpunkten för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt

— Dräktighetens längd och upplysningar för varje kull (inklusive historiska data).

— Uppgifter om fostrer (levande/döda, kön, mjukdels- och skelettabnormiteter).

— Uppgifter om kullar ((levande/döda, kön, mjukdels- och skelettabnormiteter för varje kull).

— Statistisk behandling av resultaten.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

TEST AVSEENDE KRONISK TOXICITET

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs normalt sju dagar i veckan på lämpligt sätt till flera grupper av försöksdjur, en dos per grupp, under huvuddelen av deras livslängd. Under och efter exponering för testämnet observeras försöksdjuren dagligen för tecken på toxicitet.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Försöksbetingelser

Försöksdjur

I första hand skall råttor användas. På grundval av resultat från tidigare utförda undersökningar kan andra arter (gnagare eller icke-gnagare) användas. Unga friska djur av vanligen nyttjade laboratoriestammar skall användas och dosering skall inledas så snart som möjligt efter avvänjning.

I början av försöket får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten. Om ett test av subkronisk toxicitet utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma djurart/ras och stam användas i båda undersökningarna.

Antal och kön

I fråga om gnagare skall minst 40 djur (20 hondjur och 20 handjur) användas för varje dosnivågrupp och för kontrollgruppen. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av försöksdjur under försöket skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan försöket slutförs.

För icke-gnagare godkäns ett mindre antal djur, dock minst fyra till sex per grupp.

Dosnivåer och exponeringsperioder

Minst tre dosnivågrupper och en kontrollgrupp skall användas. Den högsta dosen bör ha en tydlig toxisk verkan utan att förorsaka omfattande dödlighet. Den lägsta dosen bör inte ha någon toxisk verkan.

Medeldosen (eventuellt flera) bör ligga mitt emellan den högsta och den lägsta dosen.

Vid val av dosnivåer bör hänsyn tas till data från tidigare tester av toxicitet.

Djuren exponeras normalt dagligen för testämnet. Om ämnet tillförs via dricksvattnet eller fodret bör detta finnas tillgänglig kontinuerligt.

Kontrollgrupper

En kontrollgrupp som i alla avseenden motsvarar de behandlade grupperna, bortsett från tillförseln av testämnet, skall användas.

Under särskilda omständigheter, t. ex. vid inhalationstester där aerosoler används, eller där en emulgator med okänd biologisk verkan används i tester med oral tillförsel, skall även en negativ motsvarande kontrollgrupp användas. Den negativa kontrollgruppen skall behandlas på samma sätt som försöksgrupperna, bortsett från exponering för testämne eller eventuell vehikel.

Tillförselvägar

Det finns två huvudsakliga tillförselvägar: oralt och genom inhalation. Valet av tillförselväg beror på testämnets fysikaliska och kemiska egenskaper och det sätt på vilket människor sannolikt exponeras för testämnet.

Derma tillförsel av testämnet är kopplat till en mängd praktiska problem. Om kronisk systemisk toxicitet är ett resultat av perkutan absorption framgår detta normalt genom en ytterligare test med oral tillförsel, kombinerat med kännedom om graden av perkutan absorption på grundval av tidigare perkutana toxicitetstester.

Tester med oral tillförsel

Om testämnet absorberas i mag-tarmkanalen och om människor utsätts för tillförsel genom ingestion, är oral tillförsel att föredra såvida inte kontraindiktioner föreligger.

Djuren tillförs testämnet via fodret, upplöst i dricksvattnet, eller i en kapsel.

Idealt tillförs djuren testämnet sju dagar i veckan eftersom en begränsning av doseringen till fem dagar i veckan kan leda till återhämtning eller abstinenstoxicitet mellan exponeringsperioderna, vilket kan påverka resultaten och utvärdering av resultaten. Av praktiska skäl godkänns dock dosering fem dagar i veckan.

Inhalation

Eftersom inhalationstester inbegriper mer komplexa tekniska problem än andra tillförselvägar för testämnen behövs en mer detaljerad vägledning av denna tillförselväg. Det bör påpekas att under vissa omständigheter kan intratrakeal instillation vara ett alternativ.

Försök med långtidsexponering utförs normalt på grundval av planerad exponering för människor. Djuren exponeras antingen fem dagar i veckan, sex timmar dagligen, sedan jämvikt uppnåtts för koncentrationen i kammaren (intermittent exponering), eller så utgår man från möjlig miljöexponering, varvid djuren exponeras sju dagar i veckan, 22-24 timmar om dagen sju dagar i veckan (kontinuerlig exponering), med omkring en timme om dagen vid ett bestämt klockslag för utfodring av djuren och rengöring av kamrarna. I båda fallen exponeras djuren normalt för bestämda koncentrationer av testämnet. En viktig skillnad mellan intermittent och kontinuerlig exponering, som man bör vara uppmärksam på, är att intermittent exponering inbegriper en exponeringsfri period av 17-18 timmar per dag, och en ännu längre period under helgerna, då djuren kan återhämta sig från verkningarna av varje daglig exponering.

Valet mellan intermittent och kontinuerlig exponering beror på syftet med försöket och den exponering för människor som simuleras. Man måste dock beakta en rad tekniska problem. Fördelen med kontinuerlig exponering, när det handlar om att simulera miljöbetingelser, kan t. ex. gå förlorad till följd av nödvändigheten att vattna och utfodra djuren under exponeringsperioden och även behovet av mer komplicerad (och pålitlig) teknik för generering och kontroll av aerosoler och luftfuktighet.

Exponeringskammare

Djuren skall testas i en inhalationskammare som utformats så att den upprätthåller en dynamisk luftcirkulation med minst 12 luftväxlingar per timme, för att säkerställa en tillräcklig syrehalt och en jämnt fördelad exponeringsatmosfär. Kontroll- och exponeringskammare skall vara identiska i fråga om konstruktion och utformning för att säkerställa att exponeringsförhållandena är de samma i alla avseende förutom exponering för testämnet. Ett normalt undertryck skall upprätthållas i kammaren för att förhindra att testämnet sipprar ut i det omgivande rummet. Exponeringskammaren skall vara så utformade att trängseln bland försöksdjuren minimeras. Som en allmän regel för att säkerställa en stabil atmosfär i en kammare, skall försöksdjurens totala "volym" inte överstiga 5 % av exponeringskammarens volym.

Följande skall mätas eller kontrolleras:

i) Luftgenomströmning: luftgenomströmningen i kammaren skall helst kontrolleras fortlöpande:

ii) Koncentration: Under den dagliga exponeringsperioden skall koncentrationen av testämnet inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen.

iii) Temperatur och luftfuktighet: För gnagare hålls temperaturen vid 22 ± 2 °C och fuktigheten i kammaren mellan 30 % och 70 %, förutom när vatten används för suspension av testämnet i kammarens atmosfär. Helst skall båda kontrolleras fortlöpande.

iv) Mätning av partikelstorlek: Om atmosfärer med flytande eller fasta aerosoler används i kammare bör man analysera fördelningen av partikelstorleken. Aerosolpartiklarna skall vara möjliga att inhalera för de försöksdjur som används. Provtagning skall ske av kammarens atmosfär i djurens respirationsszon. Luftproven skall vara representativa för den partikelfördelning som djurens exponeras för och det skall genom gravimetrisk analys vara möjligt att på grundval av desas luftprover beskriva hela aerosolen, även om en stor del av den inte är möjlig att inhalera. Under inkörning av urustningen bör analys göras av partikelstorleken för att bestämma aerosolkoncentrationens stabilitet. Under exponeringen skall analyser göras så ofta som det är nödvändigt för att korrekt bestämma om den fördelning av partikelstorleken som djuren exponeras för är konstant.

Exponeringsperiod

Exponeringsperioden skall vara minst 12 månader.

Förfarande

Observationer

En grundlig klinisk undersökning skall göras minst en gång om dagen. Andra observationer skall göras dagligen och lämpliga åtgärder skall vidtas för att minimera förlust av djur som ingår i studien, t. ex. skall djur som hittas döda obduceras eller nedfrysas, och svaga eller döende djur skall isoleras eller avlivas. Noggranna observationer är nödvändiga för säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av sjukdom, kannibalism eller autolys av vävnader.

Klinska tecken, inbegripet neurologiska förändringar, förändringar i ögon och dödlighet skall registreras för alla djur. Tidpunkten då toxiska tecken uppträder för första gången, hur denna toxicitet utvecklas samt misstanke om förekomst av tumörer skall registreras.

Varje djur skall vägas en gång i veckan under försöksperiodens första 13 veckor och därefter minst en gång var fjärde vecka. Foderintaget skall fastställas en gång i veckan under försöksperiodens första 13 veckor och därefter ca var tredje månad, om inte hälsotillstånd eller förändring i kroppsvikt kräver annat.

Hematologisk undersökning

En hematologisk undersökning (t. ex. hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total leukocyträkning, räkning av blotplättar samt mått på koaguleringsförmågan) skall företas efter tre månader, sex månader samt därefter ca var sjätte månad samt vid försökets avslutning på blodprover som i fråga om icke-gnagare tas på varje enskilt djur, och i fråga om råttor på tio djur av varje kön i alla grupper. Om det är möjligt skall proverna tas från samma råttor varje gång. I fråga om icke-gnagare skall dessutom ett prov tas innan försöket inleds.

Om kliniska observationer tyder på att djurens hälsotillstånd har försämrats under försöket skall en differentialräkning på prover från de ifrågavarande djuren företas.

En differentialräkning skall företas på prover från djur i den grupp som har varit exponerad för den högsta dosen och djur från kontrollgruppen. En differentialräkning på prover från djur i den grupp som har fått den näst högsta dosen skall endast företas om det är stor skillnad mellan den högst doserade gruppen och kontrollgruppen, eller om patologiska rön indicerar detta.

Urinanalys

Urinprov för analys skall tas från alla icke-gnagare och från tio råttor per kön i alla grupper, helst från samma råttor varje gång med samma intervaller som vid den hematologiska undersökningen. Följande undersökningar skall utföras på prover antingen från varje enskild djur eller, i fråga om gnagare, på en samlad urinprovs/kön/grupp:

— Utseende: volym och densitet för enskilda djur.

— Protein, glukos, keton, ockult blod (semikvantitativt).

— Sedimentmikroskopi (semikvantitativt).

Klinisk-kemisk undersökning

Omkring var sjätte månad samt vid försökets avslutning skall blodprov för klinisk-kemisk undersökning tas från varje enskild djur när det gäller icke-gnagare och tio råttor per kön i alla grupper, helst från samma råttor varje gång. I fråga om icke-gnagare skall dessutom prov tas innan försöket inleds. Plasma från proverna skall underkastas följande undersökningar:

— Total proteinkoncentration.

— Albuminkoncentration.

— Test av leverfunktion t. ex. alkalisk fosfataktivitet, glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminasaktivitet(1), och glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminasaktivitet(2), gamma-glutamyl-transpeptidas, ornitin dekaroxylas.

— Kolhydratmetabolism, t. ex. fasteglukos.

— Test av njurfunktion, t. ex. urinämne.

Makroskopisk undersökning

Alla försöksdjur, även de som dör under försöket eller döende djur som avlivas, skall underkastas en fullständig makroskopisk undersökning. Vid avlivning skall blodprov tas från alla djur för differentialräkning. Alla makroskopiska synliga lesioner, tumörer eller lesioner som misstänks vara tumörer, skall bevaras. Makroskopiska observationer skall så långt det går korreleras med mikroskopiska rön.

Alla vävnader och organ bör bevaras för histopatologisk undersökning. Detta gäller normalt följande organ och vävnader: hjärnan(3), (medulla/pons, lillhjärnbarken och hjärnbarken), hypofysen, sköldkörteln (inbegripet bisköldkörteln), thymus, lungor (inbegripet luftstrupe), hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever(3), mjälte, njurar(3), binjurar(3), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, livmoder, urinblåsan, lymfkörtlar, bukspottskörtel, könskörtlar(3), associerade könsorgan, kvinnliga bröstkörtlar, hud, muskulatur, nerver från det perifera nervsystemet, ryggmärg (på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från ländområdet), bröstbenet med benmärg och femur (inbegripet ledyta) och ögon. Det bästa sättet att bevara lungor och urinblåsa är att blåsa upp dem med ett fixermedel. I samband med inhalationstester är det av grundläggande betydelse för de hispatologiska testerna att lungorna blåses upp. Vid särskilda tester såsom inhalationstester skall hela luftsystemet undersökas, inbegripet näsa, svalg och luftrör.

Om andra kliniska undersökningar utförs skall den information som erhålls från dessa finnas tillgänglig innan en mikroskopisk undersökning företas, eftersom detta kan vara av betydande värde för patologen.

Histopatologisk undersökning

Alla synliga förändringar, särskilt tumörer och andra lesioner som inträffar i ett organ skall undersökas mikroskopiskt. Dessutom rekommenderas följande:

a) Mikroskopisk undersökning av alla bevarade organ och vävnader med en fullständigt beskrivning av alla lesioner som påträffats i

   1) alla djur som dog eller avlivades under försöket,

   2) alla djur i högdos- och kontrollgrupperna.

b) Sådana organ eller vävnader som uppvisar abnormitet som orsakats av, eller kan ha orsakats av, testämnet skall även undersökas i lågdosgrupperna.

c) Om försöksresultaten visar på betydliga förändringar i djurets normala livslängd eller induktion av verkningar som kan påverka en toxisk reaktion, bör djuren i nästa lägre dosnivå undersökas i enlighet med ovan beskrivna riktlinjer.

d) Information om normalt förekommande lesioner hos den använda laboriatoriestammen, under samma laboratorievillkor, dvs. tidigare insamlade data, är oumbärligt för en korrekt bedömning av betydelsen av de förändringar som observerats i de behandlade djuren.

(1) Numera känt som serum-alanin-aminotransferas.
(2) Numera känt som serum-aspartat-aminotransferas.
(3) Dessa organ, från tio djur per kön per grupp för gnagare och samtliga icke-gnagare, plus thyroid (med parathyroider) för samtliga icke-gnagare, skall vägas.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp skall anges antal djur i början av försöket, antal djur som uppvisar lesioner och den procentdel djur som uppvisar varje slag av lesion. Utvärderingen av resultaten bör ske på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statisktiska metoder för användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser:

Beskrivning av exponeringsapparaturen:

Inklusive utformning, typ, dimensioner, luftkälla, system för framställning av finfördelade ämnen och aerosoler, metod att konditionera luften och sätt att hålla djuren i en försökskammare när sådan används. Utrustning för mätning av temperatur, luftfuktighet och finfördelade aerosolers koncentration och storlek skall beskrivas.

Exponeringsdata:

Dessa skall ställas upp i tabellform och presenteras med medelvärden och ett spridningsmått (t. ex. standardavvikelse) och skall, om möjligt, omfatta

a) luftgenomströmningen genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

c) nominella koncentrationer (total mängd testämne som tillförts inhalationsutrustningen, dividerat med luftvolymen),

d) typ av vehikel, om sådan används;

e) faktiska koncentrationer i försökets respirationszon,

f) partiklarnas medianstorlek.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel, om sådan har använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke-toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar,

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt,

— Oftamologiska rön.

— Utförda hematologiska undersökningar och alla resultat.

— Utförda linisk-biokemiska undersökningar och alla resultat (inbegripet resultat av en eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

TEST AVSEENDE CANCEROGENICITET

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs normalt sju dagar i veckan på lämpligt sätt till flera grupper av försöksdjur, en bestämd dos per grupp under huvuddelen av deras livslängd. Under och efter exponering för testämnet observeras försöksdjuren dagligen för tecken på toxicitet, särskilt utveckling av tumörer.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Försöksdjur

På grundval av resultaten från tidigare utförda tester kan andra arter (gnagare eller icke-gnagare) användas. Unga friska djur av vanligen nyttjade laboratoriestammar skall användas och dosering skall inledas så snart som möjligt efter avvänjning.

I början av försöket får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten. Om ett test av subkronisk toxicitet med oral tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma djurart användas i båda undersökningarna.

Antal och kön

I fråga om gnagare skall minst 100 djur (50 hondjur och 50 handjur) användas på varje dosnivå och för motsvarande kontrollgrupp. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av försöksdjur under försöket skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan försöket slutförs.

Dosnivåer och exponeringsperioder

Minst tre dosnivågrupper skall användas förutom den motsvarande kontrollgruppen. Den högsta dosen bör framkalla minimala toxicitetstecken, t. ex. en liten minskning av kroppsviktstillväxten (mindre än 10 %), utan att leda till väsentliga ändringar av den normala livslängden, med undantag för fall av tumörer.

Den lägsta dosen bör inte påverka normal tillväxt, utveckling och livslängd eller framkalla några tecken på toxicitet. I allmänhet bör den lägsta dosen inte vara mindre än 10 % av den högsta dosen.

Medeldosen (eventuellt flera) bör ligga mitt emellan den högsta och den lägsta dosen.

Vid val av dosnivåer bör hänsyn tas till data från tidigare tester och undersökningar av toxicitet.

Djuren exponeras normalt dagligen. Om ämnet administreras via dricksvattnet eller fodret bör detta finnas tillgänglig kontinuerligt.

Kontrollgrupper

En motsvarande kontrollgrupp skall användas och behandlas på samma sätt som försöksgrupperna, bortsett från exponering för testämnet.

Under särskilda omständigheter, t. ex. vid inhalationstester där aerosoler används, eller där en emulgator med okänd biologisk verkan används i tester med oral tillförsel, används en ytterligare kontrollgrupp som inte skall exponeras för vehikel eller testämne.

Tillförselvägar

Det finns tre huvudsakliga tillförselvägar: oral tillförsel, dermal tillförsel respektive tillförsel genom inhalation. Valet av tillförselväg beror på testämnets fysikaliska och kemiska egenskaper och det sätt på vilket människor sannolikt exponeras för testämnet.

Oral tillförsel

Om testämnet absorberas i mag-tarmkanalen och om människor exponeras genom munnen, är test med oral tillförsel att föredra såvida inte kontraindikationer föreligger. Djuren tillförs testämnet via fodret, upplöst i dricksvattnet, eller via en kapsel.

Idealt skall djuren tillföras testämnet sju dagar i veckan eftersom en begränsning av doseringen till fem dagar i veckan kan leda till återhämtning eller abstinenstoxicitet mellan exponeringsperioderna, vilket kan påverka resultaten och efterföljande utvärdering. Av praktiska skäl godkänns dock dosering fem dagar i veckan.

Dermal tillförsel

Exponering på huden genom pensling kan väljas som modell för framkallande av hudlesioner i avsikt att simulera en huvudsaklig form av exponering för människor.

Tillförsel genom inhalation

Eftersom inhalationstester inbegriper mer komplexa tekniska problem än andra tillförselvägar för testämnen behövs en mer detaljerad vägledning av detta administrationssätt. Det bör påpekas att intratrakeal instillation kan vara ett alternativ under vissa omständigheter.

Försök med långtidsexponering utförs normalt på grundval av möjlig mänsklig exponering varvid djuren exponeras sex timmar om dagen fem dagar i veckan sedan jämvikt uppnåtts för koncentrationen i kammaren (intermittent exponering), eller så utgår man från möjlig miljöexponering varvid djuren exponeras sju dagar i veckan 22-24 timmar om dagen (kontinuerlig exponering) med omkring en timme om dagen vid ett bestämt klockslag för utfodring av djuren och rengöring av kamrarna. I båda fallen exponeras djuren normalt för bestämda exponeringskoncentrationer.

En viktig skillnad mellan intermittent och kontinuerlig exponering, som man bör vara uppmärksam på, är att intermittent exponering inbegriper en exponeringsfri period av 17-18 timmar per dag, och en ännu längre period under helgerna, då djuren kan återhämta sig från verkningarna av varje daglig exponering.

Valet mellan intermittent och kontinuerlig exponering beror på syftet med försöket och den mänskliga exponering som simuleras. Man måste dock ta hänsyn till en rad tekniska problem. Fördelen vid kontinuerlig exponering, när det handlar om att simulera miljöbetingelser, kan t. ex. gå förlorad till följd av nödvändigheten att vattna och utfodra djuren under exponeringsperioden och även behovet av bättre utvecklade (och pålitliga) tekniker för generering och kontroll av aerosoler och luftfuktighet.

Exponeringskammare

Djuren skall testas i en inhalationskammare som utformats så att den upprätthåller en dynamisk luftcirkulation med minst 12 luftväxlingar per timme, för att säkerställa en tillräcklig syrehalt och en jämnt fördelad exponeringsatmosfär. Kontroll- och exponeringskammare skall vara identiska i fråga om konstruktion och utformning för att säkerställa att exponeringsförhållandena är desamma i alla avseende förutom exponering för testämnet. Ett normalt undertryck skall upprätthållas i kammaren

för att förhindra att testämnet sipprar ut i det omgivande rummet. Exponeringskammaren skall vara så utformade att trängseln bland försöksdjuren minimeras. Som en allmän regel för att säkerställa en stabil atmosfär i en kammare, skall försöksdjurens totala "volym" inte överstiga 5 % av exponeringskammarens volym.

Följande skall mätas eller kontrolleras:

i) Luftgenomströmningen: Luftgenomströmningen i kammaren skall helst kontrolleras fortlöpande.

ii) Koncentrationen: Under den dagliga exponeringsperioden skall koncentrationen inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen. Under hela försöksperioden skall den dagliga koncentrationen hållas så konstant som möjligt.

iii) Temperatur och luftfuktighet: För gnagare hålls temperaturen vid 22 ± 2 °C och fuktigheten i kammaren mellan 30 % och 70 %, förutom när vatten används för suspension av testämnet i kammarens atmosfär. Helst skall båda kontrolleras fortlöpande.

iv) Mätning av partikelstorlek: Om atmosfärer med flytande eller fasta aerosoler används i kammare bör man analysera fördelningen av partikelstorleken. Aerosolpartiklarna skall vara möjliga att inhalera för de försöksdjur som används. Provtagning skall ske av kammarens atmosfär i djurens respirationsszon. Luftproven skall vara representativa för den partikelfördelning som djurens exponeras för och det skall genom gravimetrisk analys vara möjligt att på grundval av desas luftprover beskriva hela aerosolen, även om en stor del av den inte är möjlig att inhalera. Under inkörning av urustningen bör analys göras av partikelstorleken för att bestämma aerosolkoncentrationens stabilitet och därefter skall analyser göras under exponeringsperioden så ofta som det är nödvändigt för att korrekt bestämma om den fördelning av partikelstorleken som djuren exponeras för är konstant.

Exponeringsperiod

En test för cancerogenicitet omfattar merparten av försöksdjurens normala livslängd. Om mus eller hamster används bör försöket vara i 18 månader, och om råttor används, i 24 månader. Vid användning av vissa djurstammar med längre livslängd och/eller en låg spontan förekomst av tumörer bör försöket vara i 24 månader med mus och hamster och i 30 månader med råtta. Det accepteras dock att ett sådant förlängt försök avslutas när antalet överlevande djur i den grupp som exponeras för den lägsta dosen, eller kontrollgruppen har nått 25 %. Om det är en uppenbar skillnad i djurens kön bör varje kön betraktas som ett försök för sig själv, och försökets längd anpassas till detta. Om prematura dödsfall uppträder i den grupp som exponeras för den högsta dosen och om det är uppenbart att detta orsakats av toxiska verkningar, är det inte nödvändigt att avsluta försöket, under förutsättning att de toxiska verkningarna inte skapar problem i andra grupper. För att ett negativt testresultat skall kunna accepteras får högst 10 % av varje grupp falla utanför försöket på grund av autolys av vävnader, kannibalism eller praktiska problem, och överlevandeprocenten i alla grupper får inte vara lägre än 50 % efter 18 månaders försök med användning av mus och hamster, och efter 24 månader med användning av råtta.

Förfarande

Observationer

Daglig observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster.

Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas, avlivas och obduceras.

Kliniska tecken och dödlighet skall registreras för varje djur. Särskilt uppmärksamhet skall ägnas åt tumörutveckling: den tidpunkt då tecken uppträder för första gången, lokalisering, dimensioner, framträdande och utveckling av varje tydligt synliga eller palpabla tumörer.

Foderintaget (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) skall mätas en gång i veckan under försöksperiodens första 13 veckor och därefter omkring var tredje månad, såvida inte djurens hälsotillstånd eller förändring av kroppsvikt kräver annat.

Varje enskild djur skall vägas en gång i veckan under försöksperiodens första 13 veckor och därefter minst en gång var fjärde vecka.

Kliniska undersökningar

Hematologisk undersökning

Om kliniska observationer av djuren i burarna tyder på att djurens hälsotillstånd har försämrats under försöket skall en differentialräkning på prover från de ifrågavarande djuren företas.

Efter 12 månader, 18 månader och innan djuren avlivas skall ett blodutstryk tas från varje djur. En differentialräkning skall företas på prover från djur i den högdos- och kontrollgrupperna. Om dessa data, särskilt de som tagits fram strax innan avlivning, eller data från den patologiska undersökningen så kräver, skall en differentialräkning företas på djur i den grupp som har fått den näst högsta dosen.

Makroskopisk undersökning

Alla försöksdjur, även de som dör under försöket eller döende djur som avlivas under försöket skall genomgå en fullständig makroskopisk undersökning. Alla makroskopiska synliga lesioner, tumörer eller lesioner som misstänks vara tumörer, skall bevaras.

Följande vävnader och organ bör bevaras i lämplig media för eventuell senare histopatologisk undersökning: hjärnan (inberipet snitt av medulla/pons, lillhjärnbarken och hjärnbarken), hypofysen, sköldkörteln och bisköldkörteln, thymusvävnad, luftstrupe och lungor, hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever, mjälte, njurar, binjurar, bukspottskörtel, könskörtlar, livmoder, associerade könskörtlar, hud, matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, representativa lymfkörtlar, kvinnliga bröstkörtlar, lårmuskulatur, nerver från det perifera nervsystemet, bröstbenet med benmärg, femur (inbegripet ledyta), ryggmärg på tre nivåer (vid halsen, mitt för bröstkorgen och från ländområdet) och ögon.

Det bästa sättet att bevara lungor och urinblåsa är att blåsa upp dem med ett fixermedel. I samband med inhalationstester är det av grundläggande betydelse för de hispatologiska testerna att lungorna blåses upp. Vid inhalationstester skall hela luftsystemet undersökas, inbegripet näsa, svalg och luftrör.

Histopatologisk undersökning

a) En fullständig histopatologisk undersökning skall göras av organ och vävnader hos alla djur som dör eller avlivas under försöket och alla djur i högdos- och kontrollgrupperna.

b) En mikroskopisk undersökning av alla klart synliga tumörer, samt lesioner som misstänks för att vara tumörer skall göras i alla grupper.

c) Om det föreligger väsentlig skillnad på förekomsten av neoplastiska lesioner i den högst doserade gruppen och kontrollgruppen skall de relevanta organen eller vävnaderna underkastas en histopatologisk undersökning i de övriga grupperna.

d) Om antalet överlevande i den högst doserade gruppen är väsentligt lägre än i kontrollgruppen skall den grupp som är doserad med den näst högsta dosen underkastas en fullständig histopatologisk undersökning.

e) Om undersökningen av den högst doserade gruppen ger anledning att misstänka att det är fråga om induktion av toxiska eller andra verkningar som kan ha betydelse för en neoplastisk reaktion, bör den näst högst doserade gruppen underkastas en fullständig histopatologisk undersökning.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp skall anges antal djur i början av försöket, antal djur med tumörer som registrerats under försöket, tidpunkten för registrering samt antal djur med tumörer som upptäckts först efter avlivning. Utvärderingen av resultaten skall ske på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statisktiska metoder för användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser:

Beskrivning av exponeringsapparaturen:

Inklusive utformning, typ, dimensioner, luftkälla, system för framställning av finfördelade ämnen och aerosoler, metod att konditionera luften och sätt att hålla djuren i en försökskammare när sådan används. Utrustning för mätning av temperatur, luftfuktighet och finfördelade aerosolers koncentration och storlek skall beskrivas.

Exponeringsdata:

Dessa skall ställas upp i tabellform och presenteras med medelvärden och ett spridningsmått (t. ex. standardavvikelse) och skall, om möjligt, omfatta

a) luftgenomströmningen genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

c) nominella koncentrationer (total mängd testämne som tillförts inhalationsutrustningen, dividerat med luftvolymen);

d) typ av vehikel, om sådan används;

e) faktiska koncentrationer i försökets respirationszon;

f) partiklarnas medianstorlek.

— Doseringsnivåer (med angivelse av vehikel om en sådan har använts) och koncentrationer.

— Upplysningar om förekomsten av tumörer indelat efter kön, dos och slag av tumör.

— Tidpunkt för dödsfall under försöket eller om djuren överlevde försöket.

— Uppgifter om toxisk reaktion indelat efter kön och dos.

— Beskrivning av toxisk eller annan verkan.

— Tidpunkt för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Utförda hematologiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Statistisk bearbetning av resultaten och beskrivning av den använda metoden.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

KOMBINERAT TEST AVSEENDE KRONISK TOXICITET OCH CANCEROGENICITET

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Syftet med en kombinerad test av kronisk toxicitet/cancerogenicitet är att bestämma ett ämnes kroniska och cancerogena verkningar på däggdjur efter långvarig exponering.

För att göra detta kompletteras testet av cancerogenicitet med minst en satellitgrupp som exponeras för testämnet, och en kontrollsatellitgrupp. De dos som den högst doserade satellitgruppen exponeras för kan vara större än den största dos som används i testet av cancerogenicitet. De djur som används i testet av cancerogenicitet undersöks både för toxisk reaktion och för cancerogenetiska reaktioner. Djuren i den satellitgrupp som exponeras för ämnet undersöks för toxisk reaktion.

Testämnet tillförs normalt sju dagar i veckan på lämpligt sätt till flera grupper av försöksdjur, en dos per grupp under huvuddelen av djurens livslängd. Under och efter exponering för testämnet observeras försöksdjuren dagligen för tecken på toxicitet och utveckling av tumörer.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Försöksdjur

I första hand skall råttor användas. På grundval av resultaten från tidigare utförda undersökningar kan andra arter (gnagare eller icke-gnagare) användas. Unga friska djur av vanligen nyttjade laboratoriestammar skall användas och dosering skall inledas så snart som möjligt efter avvänjning.

I början av försöket får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten. Om ett test av subkronisk toxicitet med oral tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning skall samma djurart användas i båda undersökningarna.

Antal och kön

I fråga om gnagare skall minst 100 djur (50 hondjur och 50 handjur) används på varje dosnivå och motsvarande kontrollgrupp. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av försöksdjur under försöket skall det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt skall avlivas innan försöket slutförs.

Den eller de behandlade satellitgrupper som används för utvärdering av andra patologiska verkningar än tumörer skall omfatta 20 djur av varje kön, medan kontrollsatellitgruppen skall omfatta tio djur av varje kön.

Dosnivåer och exponeringsperioder

Vid testning av cancerogenicitet skall minst tre dosnivågrupper användas förutom motsvarande kontrollgrupp. Den högsta dosen bör framkalla minimala toxicitetstecken, t. ex. en liten minskning av kroppsvikten (mindre än 10 %), utan att leda till väsentliga ändringar av den normala livslängden, med undantag för fall av tumörer.

Den lägsta dosen bör inte påverka normal tillväxt, utveckling och livslängd eller framkalla några tecken på toxicitet. I allmänhet bör den inte vara mindre än 10 % av den högsta dosen.

Medeldosen (eventuellt flera) bör ligga mitt emellan den högsta och den lägsta dosen.

Vid val av dosnivåer bör hänsyn tas till data från tidigare tester och undersökningar av toxicitet.

Vid testning av kronisk toxicitet skall ytterligare försöksgrupper och en motsvarande satellitkontrollgrupp användas i försöket. Den högsta dosen som djuren i den eller de behandlade satellitgrupperna exponeras för bör framkalla tydliga tecken på toxicitet.

Djuren doseras normalt dagligen med testämnet. Om ämnet administreras via dricksvattnet eller via fodret bör detta finnas tillgänglig kontinuerligt.

Kontrollgrupper

En kontrollgrupp som är identisk som och behandlas på samma sätt som försöksgrupperna, bortsett från tillförsel av testämnet, skall användas.

Under särskilda omständigheter, t. ex. vid inhalationstester där aerosoler används, eller där en emulgator med okänd biologisk verkan används i tester med oral tillförsel, skall en ytterligare kontrollgrupp som inte exponeras för vehikel användas.

Tillförselvägar

Det finns tre huvudsakliga tillförselvägar: oral tillförsel, dermal tillförsel respektive tillförsel genom inhalation. Valet av tillförselväg beror på testämnets fysikaliska och kemiska egenskaper och det sätt på vilket människor sannolikt exponeras för testämnet.

Oral tillförsel

Om testämnet absorberas i mag-tarmkanalen och om människor utsätts för tillförsel genom munnen, föredras den orala tillförselvägen såvida inte kontraindikationer föreligger. Djuren tillförs testämnet via fodret, upplöst i dricksvattnet, eller via en kapsel. Idealt tillförs djuren testämnet sju dagar i veckan eftersom en begränsning av doseringen till fem dagar i veckan kan leda till återhämtning eller abstinenstoxicitet mellan exponeringsperioderna, vilket kan påverka resultaten och värderingen av resultaten. Av praktiska skäl godkänns dock dosering fem dagar i veckan.

Påföring på huden

Exponering på huden genom pensling kan väljas som modell för framkallande av hudlesioner i avsikt att simulera en huvudsaklig form av exponering för människor.

Tillförsel genom inhalation

Eftersom inhalationstester inbegriper mer komplexa tekniska problem än andra tillförselvägar för testämnen ges här en mer detaljerad vägledning av detta administrationssätt. Det bör påpekas att intratrakeal instillation kan vara ett alternativ under vissa omständigheter.

Försök med långtidsexponering utförs normalt på grundval av möjlig mänsklig exponering varvid djuren exponeras sex timmar om dagen fem dagar i veckan sedan jämvikt uppnåtts för koncentrationen i kammaren (intermittent exponering), eller så utgår man från möjlig miljöexponering varvid djuren exponeras sju dagar i veckan 22-24 timmar om dagen (kontinuerlig exponering) med omkring en timme om dagen vid ett bestämt klockslag för utfodring av djuren och rengöring av kamrarna. I båda fallen exponeras djuren normalt för bestämda exponeringskoncentrationer. En viktig skillnad mellan intermittent och kontinuerlig exponering, som man bör vara uppmärksam på, är att intermittent exponering inbegriper en exponeringsfri period av 17-18 timmar per dag, och en ännu längre period under helgerna, då djuren kan återhämta sig från verkningarna av varje daglig exponering.

Valet mellan intermittent och kontinuerlig exponering beror på syftet med försöket och den mänskliga exponering som simuleras. Man måste dock ta hänsyn till en rad tekniska problem. Fördelen vid kontinuerlig exponering, när det handlar om att simulera miljöbetingelser, kan t. ex. gå förlorad till följd av nödvändigheten att vattna och utfodra djuren under exponeringsperioden och även behovet av bättre utvecklade (och pålitliga) tekniker för generering och kontroll av aerosoler och luftfuktighet.

Exponeringskammare

Djuren skall testas i en inhalationskammare som utformats så att den upprätthåller en dynamisk luftcirkulation med minst 12 luftväxlingar per timme, för att säkerställa en tillräcklig syrehalt och en jämnt fördelad exponerings-atmosfär. Kontroll- och exponeringskammare skall vara identiska i fråga om konstruktion occ utformning för att säkerställa att exponeringsförhållandena är de samma i alla avseende förutom exponering för testämnet. Ett lätt undertryck skall normalt upprätthållas i kammaren för att förhindra att testämnet sipprar ut i det omgivande rummet. Exponeringskammaren skall vara så utformade att trängseln bland försöksdjuren minimeras. Som en allmän regel för att säkerställa en stabil atmosfär i en kammare, skall försöksdjurens totala "volym" inte överstiga 5 % av exponeringskammarens volym.

Följande skall mätas eller kontrolleras:

i) Luftgenomströmningen: Luftgenomströmningen i kammaren skall helst kontrolleras fortlöpande.

ii) Koncentrationen: Under den dagliga exponeringsperioden skall koncentrationen inte avvika mer än ± 15 % från den genomsnittliga koncentrationen. Under hela försöksperioden skall den dagliga koncentrationen hållas så konstant som möjligt.

iii) Temperatur och luftfuktighet: För gnagare hålls temperaturen vid 22 ± 2 °C och fuktigheten i kammaren mellan 30 % och 70 %, förutom när vatten används för suspension av testämnet i kammarens atmosfär. Helst skall båda kontrolleras fortlöpande.

iv) Mätning av partikelstorlek: Om atmosfärer med flytande eller fasta aerosoler används i kammare bör man analysera fördelningen av partikelstorleken. Aerosolpartiklarna skall vara möjliga att inhalera för de försöksdjur som används. Provtagning skall ske av kammarens atmosfär i djurens respirationsszon. Luftproven skall vara representativa för den partikelfördelning som djurens exponeras för och det skall genom gravimetrisk analys vara möjligt att på grundval av desas luftprover beskriva hela aerosolen, även om en stor del av den inte är möjlig att inhalera. Under inkörning av urustningen bör analys göras av partikelstorleken för att bestämma aerosolkoncentrationens stabilitet och därefter skall analyser göras under exponeringsperioden så ofta som det är nödvändigt för att korrekt bestämma om den fördelning av partikelstorleken som djuren exponeras för är konstant.

Exponeringsperiod

Den del av testet som handlar om cancerogenicitet skall omfatta merparten av försöksdjurens normala livslängd. Om mus eller hamster används bör försöket vara i 18 månader, och om råttor används, i 24 månader. Vid användning av vissa djurstammar med längre livslängd och/eller en låg spontan förekomst av tumörer bör försöket vara i 24 månader med mus och hamster och i 30 månader med råtta. Det accepteras dock att ett sådant förlängt försök avslutas när antalet överlevande djur i den grupp som exponeras för den lägsta dosen, eller kontrollgruppen har nått 25 %. Om det är en uppenbar skillnad i djurens kön bör varje kön betraktas som ett försök för sig själv, och försökets längd anpassas till detta. Om prematura dödsfall uppträder i den grupp som exponeras för den högsta dosen och om det är uppenbart att detta orsakats av toxiska verkningar, är det inte nödvändigt att avsluta försöket, under forutsättning att de toxiska verkningarna inte skapar problem i andra grupper. För att ett negativt testresultat skall kunna accepteras får högst 10 % av varje grupp falla utanför försöket på grund av autolys av vävnader, kannibalism eller förväxling, och överlevandeprocenten i alla grupper får inte vara lägre än 50 % efter 18 månaders försök med användning av mus och hamster, och efter 24 månader med användning av råtta.

Satellitgrupperna, som består av 20 doserade djur av varje kön och en kontrollgrupp med tio djur per kön och som används för test av kronisk toxicitet, skall hållas under försöksbetingelserna i minst 12 månader. Tidpunkten för avlivning av dessa djur bör fastställas utifrån en bedömning av patologiska rön i förhållande till testämnet, och på ett sådant sätt att eventuella geriatriska förändringar inte har en negativ inverkan.

Förfarande

Observationer

Daglig observation av djuren i burarna skall omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster.

Djuren i den eller de doserade satellitgruperna skall undersökas kliniskt med passande mellanrum.

Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. Så snart döende djur upptäcks skall dessa avlägsnas, avlivas och obduceras.

Kliniska tecken, inbegripet neurologiska förändringar och förändringar i ögonen, samt dödlighet skall registreras för varje djur. Särskilt uppmärksamhet skall ägnas åt tumörutveckling: den tidpunkt då tecken uppträder för första gången, lokalisering, dimensioner, framträdande och utveckling av alla tydligt synliga eller palpabla tumörer skall registreras.

Foderintaget (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) skall mätas en gång i veckan under försöksperiodens första 13 veckor och därefter omkring var tredje månad, såvida inte djurens hälsotillstånd eller förändring i kroppsvikten kräver annat.

Varje enskild djur skall vägas en gång i veckan under försöksperiodens första 13 veckor och därefter minst en gång var fjärde vecka.

Kliniska undersökningar

Hematologisk undersökning

En hematologisk undersökning (t. ex. hemoglobinkoncentration, hematokrit, erytrocyträkning, total leukocyträkning, räkning av blotplättar samt mått på koaguleringsförmågan) skall företas efter tre månader, sex månader samt därefter ca var sjätte månad samt vid försökets avslutning på blodprover från 10 råttor av varje kön i alla grupper. Om det är möjligt skall proverna tas från samma råttor varje gång.

Om kliniska observationer av djuren i burarna tyder på att djurens hälsotillstånd har försämrats under försöket skall en differentialräkning på prover från de ifrågavarande djuren företas.

En differentialräkning skall företas på prover från djur i högdos- och kontrollgrupperna. En differentialräkning på prover från djur i den grupp som har fått den näst högsta dosen skall endast företas om det är stor skillnad mellan den högst doserade gruppen och kontrollgruppen, eller om den patologiska undersökningen tyder på detta.

Urinanalys

Urinprov för analys skall tas från tio råttor av varje kön i alla grupper, helst från samma råttor varje gång med samma intervaller som vid den hematologiska undersökningen. Följande undersökningar skall utföras på prover antingen från varje enskild djur eller, i fråga om råttor, på en samlad urinprov/kön/grupp:

— Utseende: volym och densitet för enskilda djur.

— Protein, glukos, keton, ockult blod (semikvantitativt).

— Sedimentmikroskopi (semikvantitativt).

Klinisk-kemisk undersökning

Omkring var sjätte månad samt vid försökets avslutning skall blodprov tas för klinisk-kemisk undersökning från varje enskild djur när det gäller icke-gnagare och från tio råttor av varje kön i alla grupper, helst från samma råttor varje gång. I fråga om icke-gnagare skall dessutom prov tas innan försöket inleds. Plasma från proverna skall underkastas följande undersökningar:

— Total proteinkoncentration.

— Albuminkoncentration.

— Leverfunktion t. ex. alkalisk fosfataktivitet, glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminasaktivitet(1), och glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminasaktivitet(2), gamma-glutamyl-transpeptidas, ornitin dekaroxylas.

— Kolhydratmetabolism, t. ex. fasteglukos.

— Njurfunktion, t. ex. urinämne.

(1) Numera känt som serum alanine aminotransferase.
(2) Numera känt som serum aspartate aminotransferase.

Makroskopisk undersökning

Alla försöksdjur, även de som dör under försöket eller döende djur som avlivas under försöket skall underkastas en fullständig makroskopisk undersökning. Vid avlivning skall blodprov tas från alla djur för differentialräkning. Alla makroskopiska synliga lesioner, tumörer eller lesioner som misstänks vara tumörer, skall bevaras. Makroskopiska observationer skall så långt det går korreleras med mikroskopiska rön.

Alla vävnader och organ bör bevaras för histopatologisk undersökning. Detta gäller normalt följande organ och vävnader: hjärnan(1), (medulla/pons, lilllhjärnbarken och hjärnbarken), hypofysen, sköldkörteln (inbegripet bisköldkörteln), thymus, lungor (inbegripet luftstrupe), hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever(1), mjälte, njurar(1), binjurar(1), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, lymfkörtlar, bukspottskörtel, könskörtlar(1), associerade könsorgan, kvinnliga bröstkörtlar, hud, muskulatur, nerver från det perifera nervsystemet, ryggmärg (på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från ländområdet), bröstbenet med benmärg och femur (inbegripet ledyta), och ögon.

Det bästa sättet att bevara lungor och urinblåsa är att blåsa upp dem med ett fixeringsmedel. I samband med inhalationstester är det av grundläggande betydelse för de hispatologiska testerna att lungorna blåses upp. Vid inhalationstester skall hela luftsystemet undersökas, inbegripet näsa, svalg och luftrör.

Om andra kliniska undersökningar utförs skall den information som erhålls från dessa finnas tillgänglig innan en mikroskopisk undersökning företas, eftersom detta kan vara av betydande värde för patologen.

Histopatologisk undersökning

För den del av undersökningen som gäller kronisk toxicietet gäller följande:

En detaljerad undersökning skall göras av alla bevarade organ från alla djur i högdossatellit- och kontrollgrupperna Om det finns patologiska tecken som kan sättas i samband med testämnet i högdossatellitgruppen skall målorganen hos djuren i övriga doserade satellitgrupper samt i de doserade grupperna i den del av undersökningen som gäller cancerogenicitet underkastas en fullständig och detaljerad histologisk undersökning vid försökets avslutning.

För den del av undersökning som gäller cancerogenicitet gäller följande:

a) En fullständig histopatologisk undersökning skall göras av organ och vävnader från de djur som dör eller avlivas under försöket samt djuren i högdos- och kontrollgrupperna.

b) En mikroskopisk undersökning av alla klart synliga tumörer, samt lesioner som misstänks för att vara tumörer skall göras i alla grupper.

c) Om det föreligger väsentlig skillnad på förekomsten av neoplastiska lesioner i den högst doserade gruppen och kontrollgruppen skall de relevanta organen eller vävnaderna underkastas en histopatologisk undersökning i de övriga grupperna.

d) Om antalet överlevande i högdosgruppen är väsentligt lägre än i kontrollgruppen skall den grupp som är doserad med den näst högsta dosen underkastas en fullständig histopatologisk undersökning.

e) Om undersökningen av högdosergruppen ger anledning att misstänka att det är fråga om induktion av toxiska eller andra verkningar som kan ha betydelse för en neoplastisk reaktion, bör den näst högst doserad gruppen underkastas en fullständig histopatologisk undersökning.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp anges antal djur i början av försöket, antal djur som uppvisar tumörer eller toxiska verkningar under försöket, tidpunkten för registrering samt antal djur med tumörer som upptäckts efter avlivning. Utvärderingen av resultaten skall ske på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statisktiska metoder för användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

(1) Dessa organ, från tio djur per kön per grupp för gnagare, skall vägas.

— Försöksbetingelser:

Beskrivning av exponeringsapparaturen:

Inklusive utformning, typ, dimensioner, luftkälla, system för framställning av finfördelade ämnen och aerosoler, metod att konditionera luften och sätt att hålla djuren i en försökskammare när sådan används. Utrustning för mätning av temperatur, luftfuktighet och finfördelade aerosolers koncentration och storlek skall beskrivas.

Exponeringsdata:

Dessa skall ställas upp i tabellform och presenteras med medelvärden och ett spridningsmått (t. ex. standardavvikelse) och skall, om möjligt, omfatta

a) luftgenomströmningen genom inhalationsutrustningen,

b) luftens temperatur och fuktighet,

c) nominella koncentrationer (total mängd testämne som tillförts inhalationsutrustningen, dividerat med luftvolymen);

d) typ av vehikel, om sådan används;

e) faktiska koncentrationer i försökets respirationszon;

f) partiklarnas medianstorlek.

— Doseringsnivåer (med angivelse av vehikel om en sådan har använts) och koncentrationer.

— Upplysningar om förekomsten av tumörer indelat efter kön, dos och slag av tumör.

— Tidpunkt för dödsfall under försöket eller om djuren överlevde försöket.

— Uppgifter om toxisk reaktion indelat efter kön och dos.

— Beskrivning av toxisk eller annan verkan.

— Tidpunkt för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Oftamologiska rön.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Utförda hematologiska analyser och alla resultat.

— Utförda klinisk-biokemiska undersökningar och alla resultat (inbegripet eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Statistisk bearbetning av resultaten och beskrivning av den använda metoden.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

REPRODUKTIONSTOXICITETSTEST PÅ EN GENERATION

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs i graderade doser till flera grupper av handjur och hondjur. Handjuren bör tillföras ämnet under tillväxtperioden och under minst en fullständig spermiebildande cykel (ca 56 dagar för mus och 70 dagar för råtta) för att framkalla eventuella hälsomässiga oönskade verkningar som testämnet kan ha på spermatogenes.

Hondjur i föräldra- (F_0) generationen tillförs testämnet under minst två fullständiga brunstighetscykler för att framkalla eventuella skadliga verkningar som testämnet kan ha på brunsten. Därefter paras djuren. Båda kön tillförs testämnet under parningsperioden, och därefter tillförs endast hondjuren testämnet under dräktighetsperioden och diperioden.

Vid tillförsel genom inhalation måste metoden anpassas.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Före försöket fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. I minst fem dagar före försöket skall djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring.

Det rekommenderas att testämnet tillförs via fodret eller dricksvattnet. Andra tillförselvägar är också godtagbara Samma tillförselmetod skall användas för alla djur under hela behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen skall det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska verkningar.

Djuren bör tillföras testämnet sju dagar i veckan.

F ö r s ö k s d j u r

Val av djurart

I första hand skall råttor och möss användas. Unga friska djur, som inte tidigare har använts i försök, skall användas. Stammar med låg fertilitet bör inte användas. Försöksdjuren bör vara representativa för sin art, stam, kön, vikt och/eller ålder.

För att korrekt kunna bedöma fertiliteten skall både han- och hondjur testas. Alla försöks- och kontrolldjur skall vara avvanda innan dosering inleds.

Antal och kön

Varje behandlings- och kontrollgrupp skall bestå av ett tillräckligt högt antal djur för att resultera i omkring 20 dräktiga hondjur som är nära eller vid födslotidpunkten.

Syftet med detta är att säkerställa att det föds tillräckligt många ungar för att säkerställa en meningsfull utvärdering av hur testämnet kan påverka fertiliteten, dräktigheten och moderdjurens beteende i F_0-generationen samt diandet, tillväxten och utvecklingen i F_1-generationen från nedkomsten till avvänjning.

Försöksbetingelser

Foder och vatten ges ad libitum. När födslotidpunkten närmar sig placeras de dräktiga hondjuren i var sin födslo- eller dräktighetsbur och djuren kan eventuellt förses med material för att bygga bo.

Dosnivåer

Minst tre olika dosnivågrupper samt en kontrollgrupp skall användas. Om vehikel används för tillförsel av testämnet skall kontrollgruppen tillföras samma mängd vehikel som högdosgruppen. Om ett testämne leder till ett minskat foderintag eller påverkar absorption eller metabolism kan det vara nödvändigt att använda en motsvarande restriktivt utfodrad kontrollgrupp. Såvida det inte finns några begränsningar till följd av testämnets fysikaliska-kemiska eller biologiska egenskaper bör den högsta dosen idealt förorsaka toxiska verkningar, men inte dödsfall i föräldra (F_0)-generationen. Medeldosnivåerna (eventuellt flera) bör framkalla minsta möjliga observerbara toxiska verkningar som orsaktas av testämnet, och den lägsta dosen bör inte ha någon toxisk effekt på föräldragenerationen eller avkomman. Om ämnet tillförs via magsond eller i kapsel bör den dos som varje enskilt djur mottar beräknas på grundval av djurets kroppsvikt och varje vecka justeras med hänsyn till förändringar i kroppsvikt. Doser som tillförs dräktiga hondjur kan beräknas efter kroppsvikt vid dag 0 eller 6 av dräktigheten, om så önskas.

Gränstest

Om ett testämne med låg toxicitet i en dosnivå på 1 000 mg/kg kroppsvikt inte har någon påverkan på reproduktionen kan ytterligare tester anses vara överflödiga. Om en inledande undersökning, i vilken endast den högsta dosen används, klart visar på toxisk verkan på moderdjuren, men inte har någon skadlig verkan på fertiliteten, kan ytterligare tesert anses vara överflödig. a

Förfarande

Försöksschema

Daglig dosering av föräldra (F_0)-generationen inleds när djuren är mellan fem och nio veckor gamla, och efter det att de är avvanda och har acklimatiserat sig i minst fem dagar. Om råttor används fortsätter doseringen i tio veckor före parningsperioden (för möss åtta veckor). Handjuren bör avlivas och undersökas antingen vid slutet av parningsperioden eller så kan man fortsätta att tillföra dem testämnet fram till en eventuell produktion av en andra kull, varefter de avlivas och undersöks någongång före försökets avslutning. Dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur inleds efter minst fem dagars acklimatisering och fortsätter under minst två veckor före parning. Daglig dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur fortsätter under den tre veckor långa parningsperioden, under dräktighetsperioden och fram till det att F_1-generationen är avvand. Man bör överväga eventuella justeringar av försöksschemat om det föreligger uppgifter om testämnet, t. ex. induktion av metabolism eller bioackumulering.

Parning

Parning kan utföras i förhållandet 1:1 (ett handjur till ett hondjur) eller 1:2 (ett handjur till två hondjur) i undersökningar av reproduktionstoxicitet.

Om parning i förhållandet 1:1 används förs ett handdjur och ett hondjur samman tills dräktighet inträffar eller tre veckor har förflutit. Varje morgon skall hondjuren undersökas för närvaron av spermier eller vaginalproppar. Som dag 0 i dräktighetsperioden räknas den dag då man observerar en vaginalpropp eller sperma.

De par som inte parar sig bör undersökas för att fastställa orsaken till den påtagliga ofruktsamheten. Detta kan göras genom att djuren t. ex. får möjlighet att para sig med han- eller hondjur vars frukbarhet är fastställd, genom mikroskopisk undersökning av reproduktionsorganen och genom undersökning av brunstighetsperioden eller speratogenes.

Kullstorlekar

De djur som doseras i fertilitetsundersökningen bör ha möjlighet att föda normalt och att behålla sin avkomma tills den är avvand utan standardisering av kullar.

Om kullar standardiseras föreslås följande förfarande: Mellan dag 1 och 4 efter födseln standardiseras varje kull genom att extra ungar avlägsnas så att varje kull så långt det är möjligt består av fyra handjur och fyra hondjur. Om det på grund av antalet han- och hondjur inte är möjligt att standardisera varje kulle att de innehåller fyra handjur och fyra hondjur kan en delvis standardisering godkännas (t. ex. fem handjur och tre hondjur). Ingen standardisering skall ske på kullar som består av mindre än åtta ungar.

Observationer

Djuren skall inspekteras minst en gång om dagen under hela försöket. Relevanta beteendeförändringar, tecken på svårartad eller förlängd födsel och alla toxicitetstecken, inbegripet dödlighet, skall registreras. Före och under parningstiden registreras foderintaget en gång i veckan. Efter födseln och under diperioden skall foderintaget (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) mätas varje vecka. Han- och hondjur av F_0-generationen vägs den dag då doseringen inleds och därefter en gång i veckan. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje enskilt djur.

Dräktighetsperioden beräknas från dag 0. Varje kull undersöks så snart som möjligt efter födseln för att fastställa ungarnas antal och kön, antal dödfödda och levande ungar och förekomsten av makroskopiskt synliga abnormiteter.

Döda ungar och ungar som avlivas dag 4 skall bevaras och undersökas för eventuella defekter. Levande ungar skall räknas och kullen vägas morgonen efter födseln, på dag 4 och dag 7 och därefter en gång i veckan tills försöket avslutats då djuren skall vägas individuellt. Fysiska eller beteendemässiga abnormiteter som observeras i hondjuret eller avkomman skall registreras.

Patologisk undersökning

Makroskopisk undersökning

F_0-generationsdjur som avlivas efter eller dör under försöket skall undersökas makroskopiskt för strukturella abnormiteter eller patologiska förändringar, med särskilt uppmärksamhet riktad mot organen i reproduktionssystemet. Döda eller döende ungar skall undersökas för defekter.

Histopatologisk undersökning

Äggstockar, livmoder, livmoderhals, slida, testiklar, bitestiklar, sädesblåsa, prostata, koaguleringskörtlar, hypofys och målorgan (eventuellt flera) från alla djur i F_0-generationen skall bevaras för mikroskopisk undersökning. Om dessa organ inte har undersökts i andra försök med multipel dosering skall organen från djuren i högdos- och kontrollgrupperna, samt de djur som dör under försöket, undersökas mikroskopiskt om detta är praktiskt möjligt.

De organ från dessa djur som uppvisar abnormiteter skall även undersökas hos alla andra djur i F_0-generationen. I dessa fall skall alla vävnader som uppvisar makroskopiska patologiska förändringar undersökas mikroskopiskt. Liksom det föreslås i parningsavsnittet kan även reproduktionsorganen från djur som antas vara ofruktsamma undersökas mikroskopiskt.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och för varje grupp anges antal djur i början av försöket, antal fertila handjur, antal dräktiga hondjur, slag av förändring och den procent djur som upvisar varje slag av förändring.

Utvärderingen av resultaten skall om möjligt grundas på en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och avkommans livsduglighet.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket eller tidpunkt för planenlig avlivning.

— Tabell med angivelse av vikten för varje enskild kulle, ungarnas genomsnittsvikt och varje enskild unges vikt vid försökets avslutning.

— Toxiska och andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt.

— Tidpunkten för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt för F_0-generationen.

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla mikroskopiska rön.

— Eventuell satistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

REPRODUKTIONSTOXICITETSTEST PÅ TVÅ GENERATIONER

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs i graderade doser till flera grupper av handjur och hondjur. Handjur i föräldra(F_0)-generationen bör tillföras ämnet under tillväxtperioden och under minst en fullständig spermiebildande cykel (ca 56 dagar för mus och 70 dagar för råtta) för att framkalla eventuella hälsomässiga oönskade verkningar som testämnet kan ha på spermatogenes.

Hondjur i föräldra(F_0)-generationen bör tillföras testämnet under minst två fullständiga brunstighetscyklar för att framkalla eventuella skadliga verkningar som testämnet kan ha på brunsten. Därefter paras djuren. Båda kön tillförs testämnet under parningsperioden, och därefter tillförs endast hondjuren testämnet under dräktighetsperioden och diperioden. Efter avvänjning forsätter tillförseln av testämnet till F_1-avkomman under deras tillväxt, parning och produktion av en F_2-generation, tills F_2-generationen är avvand. Vid tillförsel genom indandning måste metoden justeras.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Före försöket fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. I minst fem dagar före försöket skall föräldra(F)-djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Det rekommenderas att testämnet tillförs via fodret eller i dricksvattnet. Andra tillförselvägar är också godtagbara. Samma tillförselmetod skall användas för alla djur under hela behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen skall det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska verkningar. Djuren bör tillföras testämnet sju dagar i veckan.

Försöksdjur: val av djurart

I första hand skall råttor och möss användas.

Friska (F)-djur, som inte tidigare har använts i försök, skall användas. Stammar med låg fertilitet bör inte användas. Försöksdjuren bör vara representativa för sin art, stam, kön, vikt och/eller ålder.

För att korrekt kunna bedöma fertiliteten skall både han- och hondjur testas. Alla försöks- och kontrolldjur skall vara avvanda innan dosering inleds.

Antal och kön

Varje behandlings- och kontrollgrupp skall bestå av ett tillräckligt högt antal djur för att resultera i omkring 20 dräktiga hondjur som är nära eller vid födslotidpunkten. Syftet med detta är att säkerställa att det föds tillräckligt många ungar för att säkerställa en meningsfull utvärdering av hur testämnet påverkar fertiliteten, dräktigheten och moderdjurens beteende samt diandet, tillväxten och

utvecklingen i F_1-avkomman från nedkomst till fullt utvuxna och utvecklingen av deras F_2-avkomma till avvänjning.

Försöksbetingelser

Foder och vatten ges ad libitum. När födslotidpunkten närmar sig placeras de dräktiga hondjuren i var sin födslo- eller maternitetsbur, och djuren kan eventuellt förses med material för att bygga bo.

Dosnivåer

Minst tre olika dosnivågrupper samt en kontrollgrupp skall användas. Om vehikel används för tillförsel av testämnet skall kontrollgruppen tillföras samma mängd vehikel som högdosgruppen. Om ett testämne leder till ett minskat foderintag eller påverkar absorption eller metabolism kan det vara nödvändigt att använda en motsvarande restriktivt utfodrad kontrollgrupp. Såvida det inte finns några begränsningar till följd av testämnets fysikaliska-kemiska eller biologiska egenskaper bör den högsta dosen idealt förorsaka toxiska verkningar, men inte dödsfall i föräldra (F_0)-generationen. Medeldosnivåerna (eventuellt flera) bör framkalla minsta möjliga observerbara toxiska verkningar som orsaktas av testämnet, och den lägsta dosen bör inte ha någon toxisk effekt på föräldragenerationen eller avkomman. Om ämnet tillförs via magsond eller i kapsel bör den dos som varje enskilt djur mottar beräknas på grundval av djurets kroppsvikt och varje vecka justeras med hänsyn till förändringar i kroppsvikt. Doser som tillförs dräktiga hondjur kan beräknas efter kroppsvikt vid dag 0 eller 6 av dräktigheten, om så önskas.

Gränstest

Om ett testämne med låg toxicitet vid en dosnivå på 1 000 mg/kg kroppsvikt inte har någon påverkan på reproduktionen kan ytterligare tester anses vara överflödig. Om en inledande undersökning, i vilken endast den högsta dosen används, klart visar på toxisk verkan på moderdjuren, men inte har någon skadlig verkan på fertiliteten kan ytterligare test anses vara överflödig.

Förfarande

Försöksschema

Daglig dosering av föräldra (F_0)-generationen inleds när djuren är mellan fem och nio veckor gamla, och efter det att de är avvanda och har acklimatiserat sig i minst fem dagar. Om råttor används fortsätter doseringen i tio veckor före parningsperioden (för möss åtta veckor). Handjuren bör avlivas och undersökas antingen vid slutet av parningsperioden eller så kan man fortsätta att tillföra dem testämnet fram till en eventuell produktion av en andra kull, varefter de avlivas och undersöks någon gång före försökets avslutning. Dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur inleds efter minst fem dagars acklimatisering och fortsätter under minst två veckor före parning. Daglig dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur fortsätter under den tre veckor långa parningsperioden, under dräktighetsperioden och fram till det att F_1-generationen är avvand. Man bör överväga eventuella justeringar av försöksschemat om det föreligger uppgifter om testämnet, t. ex. induktion av metabolism eller bioackumulering.

Dosering av F_1-generationen inleds när den är avvand och pågår tills djuren avlivas.

Parning

Parning kan utföras i förhållandet 1:1 (ett handjur till ett hondjur) eller 1:2 (ett handjur till två hondjur) i undersökningar av reproduktionstoxicitet.

Om parning i förhållandet 1:1 används förs ett handjur och ett hondjur samman tills dräktighet inträffar eller tre veckor har förflutit. Varje morgon skall hondjuren undersökas för närvaron av spermier eller vaginalproppar. Som dag 0 i dräktighetsperioden räknas den dag då man observerar en vaginalpropp eller sperma. Med beaktande av spermatogenes bör F_1-generationen inte paras förrän djuren är minst 11 veckor gamla i fråga om mus, och 13 veckor gamla i fråga om råttor. Vid parning av F_1-generationen väljs ett han- och hondjur ut från varje kull och korsas med ett djur från en annan kull inom samma försöksgrupp i syfte att producera en F_2-generation. De han- och hondjur från F_1-generationen som inte väljs ut för parning avlivas när de är avvanda.

De par som inte parar sig bör undersökas för att fastställa orsaken till den påtagliga ofruktsamheten. Detta kan göras genom att djuren t. ex. får möjlighet att para sig med han- eller hondjur vars frukbarhet är fastställd, genom mikroskopisk undersökning av reproduktionsorganen och genom undersökning av brunstighetsperioden eller spermatogenes.

Kullstorlekar

De djur som doseras i fertilitetsundersökningen bör ha möjlighet att föda normalt och att behålla sin avkomma tills den är avvand utan standardisering av kullar.

Om kullar standardiseras föreslås följande förfarande: Mellan dag 1 och 4 efter födseln standardiseras varje kull genom att extra ungar avlägsnas så att varje kull så långt det är möjligt består av fyra handjur och fyra hondjur. Om det på grund av antalet han- och hondjur inte är möjligt att standardisera varje kull så att de innehåller fyra handjur och fyra hondjur kan en delvis standardisering godkännas (t. ex. fem handjur och tre hondjur). Ingen standardisering skall ske på kullar som består av mindre än åtta ungar. F_2-kullarna standardiseras på samma sätt.

Observationer

Djuren skall inspekteras minst en gång om dagen under hela försöket. Relevanta beteendeförändringar, tecken på svårartad eller förlängd födsel och alla toxicitetstecken, inbegripet dödlighet, skall registreras. Före och under parningstiden registreras foderintaget en gång i veckan. Under dräktighetstiden kan foderintaget registreras dagligen. Efter födseln och under diperioden skall foderintaget registreras samma dag som kullarna vägs. Han- och hondjur av F_0 och F_1-generationen vägs den dag då doseringen inleds och därefter en gång i veckan. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje könsmoget djur.

Dräktighetsperioden beräknas från dag 0. Varje kull undersöks så snart som möjligt efter födseln för att fastställa ungarnas antal och kön, antal dödfödda och levande ungar och förekomsten av makroskopiskt synliga abnormiteter.

Döda ungar och ungar som avlivas dag 4 skall bevaras och undersökas för eventuella defekter. Levande ungar skall räknas och kullen vägas morgonen efter födseln, på dag 4 och dag 7 och därefter en gång i veckan tills försöket avslutats då djuren skall vägas individuellt. Fysiska eller beteendemässiga abnormiteter som observeras i hondjuret eller avkomman skall registreras.

Patologisk undersökning

Makroskopisk undersökning

Alla vuxna F_0- och F_1-generationsdjur bör avlivas när de inte längre är nödvändiga för undersökningen av reproduktionen. Avkomma i F_1-generationen som inte väljs ut för parning och avkomma i F_2-generationen skall avlivas efter avvänjning.

Vid tidpunkten för avlivning eller dödsfall under försöket skall alla föräldradjur (F_0 och F_1) undersökas mikroskopiskt för strukturella abnormiteter eller patologiska förändringar, med särskilt uppmärksamhet riktad mot organen i reproduktionssystemet. Döda eller döende ungar skall undersökas för defekter.

Histopatologisk undersökning

Äggstockar, livmoder, livmoderhals, slida, testiklar, bitestiklar, sädesblåsa, koaguleringskörtlar, prostata, hypofys och målorgan (eventuellt flera) från alla djur i F_0- och F_1-generationerna skall bevaras för mikroskopisk undersökning. Om dessa organ inte har undersökts i andra försök med multipel dosering skall de undersökas mikroskopiskt i alla djur i högdos-, kontroll F_0- och F_1-grupperna som valts ut för parning och, om det är praktiskt möjligt, i de djur som dör under försöket. Om abnormiteter i organen från dessa djur konstateras skall dessa organ även undersökas hos alla andra djur dosgrupperna. I dessa fall skall alla vävnader som uppvisar makroskopiska patologiska förändringar undersökas mikroskopiskt. Liksom det föreslås i parningsavsnittet kan även reproduktionsorganen från djur som antas vara ofruktsamma undersökas mikroskopiskt.

2. DATA

Bearbetning av resultat

Data skall ställas upp i tabellform och för varje grupp anges antal djur i början av försöket, antal dräktiga djur, slag av förändring och den procent djur som uppvisar varje slag av förändring.

Utvärderingen av resultaten skall om möjligt grundas på en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och avkommans livsduglighet.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket eller tidpunkt för planenlig avlivning.

— Tabell med angivelse av vikten för varje enskild kull, ungarnas genomsnittsvikt och varje enskild unges vikt vid försökets avslutning.

— Toxiska och andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt.

— Tidpunkten för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt för F_0- och F_{a1}-generationerna.

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla mikroskopiska rön.

— Eventuell satistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

TOXIKOKINETIK

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Testämnet tillförs på ett passande sätt. Beroende på syftet med försöket kan testämnet ges i en enkel dos eller i flera doser fördelat över fastställda perioder till en eller flera grupper av försöksdjur. Beroende på vilken typ av undersökning som utförs fastställs ämnet och/eller dess metaboliter i kroppsvätska, vävnader och/eller exkret.

Försöket kan ske med "radioaktivt markerat" eller "omarkerat" testämne. Om radioaktivt markerat testämne används skall detta ingå i en sådan form i testämnet det ger största möjliga antal upplysningar om ämnets öde.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket skall unga friska djur acklimatiseras till testbetingelserna. Före försöket fördelas djur slumpmässigt i behandlingsgrupper. I vissa fall kan mycket unga, dräktiga eller förbehandlade djur användas.

Försöksbetingelser

Försöksdjur

Toxikokinetiska försök kan utföras på en eller flera lämpliga djurarter och bör ta hänsyn till vilka djurarter man har använd eller planerar att använda i andra toxikologiska undersökningar av samma testämne. Om gnagare använts får djurens vikt vid inledningen av försöket inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten.

Antal och kön

Vid undersökning av absorption och utsöndring används fyra djur i varje doseringsgrupp. Inga krav ställs på djurens kön men i vissa fall kan det vara nödvändigt att använda djur av båda könen. Om könstbetingade skillnader uppträder skall fyra djur av varje kön användas. I försök med ickegnagare kan ett mindre antal djur användas.

Vid undersökning av fördelning i vävnader fastställs den storlek som försöksgrupperna skall ha vid försökets inledning, med hänsyn till hur många djur som skall avlivas vid på förhand fastställda tidspunkter och hur många sådana tidpunkter försöket skall omfatta.

Vid undersökning av metabolism fastställs gruppstorleken efter behov.

Vid undersökning med flera doser och flera undersökningstidpunkter fastställs gruppstorleken med hänsyn till planenlig avlivning och antal undersökningstidpunkter. Varje grupp måste dock bestå av minst två djur. Gruppstorleken skall vara tillräcklig för att korrekt kunna få fram data om absorption, koncentrationsnivåer och uttömning (i tillämpliga fall) av testämnet och/eller dess metaboliter.

Dosnivåer

När testämnet ges i en enkel dos används minst två olika doseringsnivåer. Det bör finnas en lågdosnivå vid vilken ingen toxisk verkan observeras, och en högdosnivå där det kan vara tal om toxikokinetiska parametrar eller toxiska verkningar.

Om testämnet ges i flera doser räcker det normalt att använda den låga dosen. I vissa fall kan det dock vara nödvändigt att även använda en hög dos.

Tillförselväg

Vid toxikokinetiska undersökningar ges testämnet på samma sätt och om möjligt med hjälp av samma vehikel som i redan företagna eller planerade toxikologiska undersökningar av samma testämne. Normalt tillförs testämnet antingen oralt med magsond eller via fodret, genom påföring på huden eller genom inhalation under på förhand fastställda perioder till grupper av försöksdjur. Intravenös tillförsel av testämnet kan vara användbart för att bestämma relativ absorption genom andra tillförselvägar. Dessutom kan nyttig information komma fram om distributionsmönstret kort efter intravenös tillförsel av ett ämne.

Man bör ta hänsyn till möjligheten att vehikeln påverkar testämnet. Samtidigt måste man vara uppmärksam på skillnader i absorption mellan tillförsel av testsubsansen via magsond och via fodret och att det därför behövs en exakt bestämning av dosens, särskilt när testämnet tillförs via fodret.

Observationsperiod

Samtliga djur skall observeras dagligen och tecken på toxicitet och andra kliniska symptom skall registreras, inbegripet när de uppträdde för första gången, graden och varaktigheten.

Förfarande

Sedan försöksdjuren vägts tillförs testämnet på lämpligt sätt.. Vid behov kan kan man låta djuren fasta innan testämnet tillförs.

Absorption

Den mängd av den tillförda ämnet som absorberas, och den hastigheten med vilken den absorberas, kan värderas med hjälp av olika metoder med eller utan referensgrupper(1), t. ex. genom

— bestämning av mängden testämne och/eller dess metaboliter i exkret, t. ex. i urin, galla, avföring, utandningsluft samt i kroppen efter avlivning,

— jämförelse av biologisk verkan (t. ex. i undersökningar av akut toxicitet) i försöks-, kontroll- och referensgrupper,

— jämförelse av mängden av testämne och/eller dess metaboliter som utsöndras genom njurarna i försöks- och referensgrupper,

— bestämning av arean under kurvan för testämnets plasmakoncentration och/eller dess metaboliter som en funktion av tiden och jämförelse med data från en referensgrupp.

(1) I den metod som beskrivs här avses med referensgrupp en grupp som tillförs testämnet genom en annan tillförselväg som säkerställer att hela dosen tillförs.

Distribution

Det är i dag möjligt att analysera distributionsmönstret på två olika sätt:

— Kvalitativ information erhålls genom användning av helkroppsautoradiografisk teknik.

— Kvantitativ information erhålls genom avlivning av djur vid olika tidpunkter efter exponering och bestämning av mängd och koncentration av testämne och/eller dess metaboliter i vävnader och organ.

Utsöndring

Vid undersökning av utsöndring uppsamlas urin, avföring och utandningsluft samt, i vissa fall, galla. Mängden av testämne och/eller dess metaboliter i dessa exkret bör mätas flera gånger efter exponering, tills ca 95 % av den tillförda dosen har utsöndrats, dock högst i sju dagar.

I vissa fall kan det vara nödvändigt att ta hänsyn till utsöndring av testämne i mjölken från digivande försöksdjur.

Metabolism

För att bestämma metabolismens intensitet och mönster analyseras biologiska prover med hjälp av en för detta syfte lämplig metod. Om frågor som uppstått vid tidigare toxikologiska undersökningar måste besvaras klargörs metaboliternas struktur och förslag ges om möjliga metabolismvägar. Undersökningar *in vitro* kan bidra till att skaffa fram upplysningar om metabolismvägar.

Ytterligare information om sambanden mellan metabolism och toxisk verkan kan fås genom biokemiska undersökningar, t. ex. genom bestämning av verkningar på metaboliserande enzymsystem, reduktion av mängden endogena icke-protein-sulfhydrylförbindelser och testämnet bindning till makromolekyler.

2. DATA

Beroende på vilken slags undersökning som utförts skall data ställas upp i tabellform och stödjas, när så är möjligt, av grafiska framställningar. Om det är möjligt skall för varje försöksgrupp anges medelvärde och statistisk variation av alla mätningar i förhållande till tid, doser, vävnader och organ. Den absorberade och utsöndrade mängden samt utsöndringens hastighet bestäms genom för detta syfte lämpliga metoder. Vid undersökningar av metabolism klargörs de identifierade metaboliternas struktur och möjliga metabolismvägar läggs fram.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Beskrivning av markerade ämnen, om sådana har använts.

— Dosnivåer och använda intervaller.

— Tillförselväg och eventuella vehikler.

— Toxisk och annan verkan.

— Metoder för bestämning av testämne och/eller dess metaboliter i biologiska prover, inbegripet inhaltionsluft.

— Mätresultat uppställda i tabellform efter kön, doser, andra testparametrar, tid, vävnader och organ.

— Presentation av den avsorberade och utsöndrade mängden som en funktion av tiden.
— Metoder för att karakterisera och identifiera metaboliter i biologiska prov.
— Metoder för biokemiska mätningar i sambnad med metabolism
— Förslag av väg för metabolism.
— Diskussion om resultaten.
— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. **REFERENSER**

Se allmän inledning till del B.

MUTAGENICITETSTEST OCH SCREENING FÖR CANCEROGENICITET

GENMUTATION — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

En rad olika haploida och diploida stammar av jästen *Saccaromyces cerevisiae* kan användas vid undersökning av genmutationer, som induceras av kemiska ämnen med och utan metabolisk aktivering.

Man har använt framåtmutationssystem med haploida stammar vid t. ex. bestämning av mutation från röda, adeninberoende mutanter (*ade*-1, *ade*-2) till dubbelt adeinberoende vita mutanter och selektiva system t. ex. induktion av canavanin-resistens och cycloheximid-resistens.

De bäst validerade tillbakamutationssystemen bygger på användning av den haploida stammen XV 185-14C, som är bärare av de ockra nonsensmutationerna *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 och *trp* 5-48, som tillbakamuterar med basparsubstitutionsmutagener, som inducerar punktmutationer eller ockra suppressormutationer. XV 185-14C är också bärare av *his* 1-7 markören som är en missensemutation som huvudsakligen tillbakamuterar vid mutationer i andra loci, och markören *hom* 3-10 som tillbakamuterar med frameshift-mutagener

I diploida stammar av *Saccaromyces cerevisiae* är D_7, som är homozygot för *ilv* 1-92, den enda med omfattande användning.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Lösningar av testämne och kontrollämne framställs omedelbart före försöket med hjälp av en passande vehikel. Om organiska kemiska förbindelser som inte går att lösa i vatten används, bör organiska lösningsmedel som etanol, aceton eller dimetylsulfoxid (DMSO) användas i koncentrationer på upp till 2 % v/v. Koncentrationen av vehiklen bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft eller växtegenskaper.

Metabolisk aktivering

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiverings-system.

Det mest använda systemet består av en post-mitokondrial fraktion som kompletterats med en co-faktor, framställd från lever av gnagare som förbehandlats med enzyminducerande medel. Användningen av andra arter, vävnade, post-mitokondriala faktorer, eller förfarande kan också vara lämplig för metabolisk aktivering.

Testbetingelser

Teststammar

Den haploida stammen XV 185-14C och den diploida stammen D_7 är de mest vanligen använda i genmutationstester. Även andra stammar kan vara lämpliga.

Media

Vid bestämning av överlevnadsgrad och antal mutanter används lämpliga kulturmedier.

Användning av negativa och positiva kontroller

Positiva kontroller, obehandlade kontroller och kontroller med lösningsmedel skall användas jämsides. Lämpliga positiva kontrollämnen skall användas för varje enskild genetisk endpoint.

Exponeringskoncentration

Minst fem olika koncentrationer av testämnet med passande intervaller mellan koncentrationerna skall användas. För toxiska ämnen skall den högsta koncentrationen som testas inte miska överlevnadsgranden till mindre än 5-10 %. Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet med användning av lämliga förfaranden. De högsta koncentrationerna av icke-toxiska testämnen som är fritt lösliga i vatten fastställs från test till test.

Inkubationsbetingelser

Plattorna inkuberas i 4-7 dagar vid 28-30 °C i mörker.

Spontana mutationsfrekvenser

Subkulturer bör användas med spontana mutationsfrekvenser inom allmänt accepterade gränser.

Antal parallella plattor

Minst tre parallella plattor används för varje koncentration vid bestämning av prototrofer som framkommit vid genmutation, och av cellernas livskraft. När man testar markörer med, som t. ex. *hom* 3-10, en låg mutationsfrekvens, kan antalet plattor ökas så att en statistiskt relevant mängd data erhålls.

Testförfarande

Stammar av *Saccaromyces cerevisiae* exponeras normalt genom ett test i vätska som inbegriper antingen celler i stationär fas eller celler i växtfas. Inledande undersökningar bör utföras med celler i växtfas. 1-5 x 10^7 celler per ml exponeras för testämnet i upp till 18 timmar vid 28-37 °C under skakning. Om det behövs tillsätts en passande mängd metabolisk aktiveringssystem under exponeringen. Efter behandlingen centrifugeras och tvättas cellerna varefter de utsås på ett lämpligt kulturmedium. Efter inkubationen registreras induktionen av genmutationer och antal överlevande per platta.

Om det första testet utfaller negativt bör ett andra utföras med användning av celler i stationär fas. Om det första testet utfaller positivt skall det bekräftas genom ett oberoende test.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och ange antal räknade kolonier, antal mutanter, överlevnadsfrekvens och mutationsfrekvens. Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test. Utvärderingen av resultaten bör ske på grundval av en lämplig statistisk metod.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapporten

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda stammar.

— Testbetingelser: stationär fas eller växtceller, sammansättning av media, inkubationstemperatur och inkubationsperiod, metaboliskt aktiveringssystem.

— Exponeringsbetingelser; exponeringskoncentrationer, förfarande och varaktighet, exponeringstemperatur positva och negativa kontroller.

— Antal räknade kolonier, antal mutanter, överlevnadsfrekvens och mutationsfrekvens, förhållandet mellan dos och effekt när detta är möjligt. statisktisk utvärdering av data.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

MITOTISK REKOMBINATION — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Hos *Saccaromyces cerevisiae* kan mitotisk rekombination mellan gener (eller mer generellt mellan en gen och dess centromer) och inom samma gen konstateras. Den förstnämnda formen kallas mitotisk överkorsning och framkallar reciproka produkter medan den andra formen för det mesta inte är reciprok och kallas genkonversion. Överkorsning bestäms normalt genom framkallande av recessiva homozygotiska kolonier eller sektorer i en heterozygotisk stam, medan genkonversion bestäms genom framkallande av prototrofa revertanter i en auxotrof heteroallelisk stam, som är bärare tll olika, defekta alleler av samma gen. De mest använda stammarna vid undersökning av mitotisk genkonversion är D_4 (med heteroallel *ade* 2 och *trp* 5), D_7 (med heteroallel *trp* 5), BZ_{34} (med heteroallel *arg* 4) och JD_1 (med heteroallel *his* 4 och *trp* 5). Mitotisk överkorsning som framkallar röda och ljusröda homozygotiska sektorer kan undersökas i D_5 eller i D_7 (som även mäter mitotisk genkonversion och omvänd mutation av *ilv* 1-92), eftersom bägge stammar är heteroalleliska för att komplettera alleler av *ade* 2.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Lösningar av testämne och kontroll- eller referensämne framställs omedelbart före försöket med hjälp av passande vehikel. Om organiska kemiska förbindelser som inte går att lösa i vatten används, bör organiska lösningsmedel som etanol, aceton eller dimetylsulfoxid (DMSO) användas i koncentrationer på upp till 2 % v/v. Koncentrationen av vehiklen bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft eller växtegenskaper.

Metabolisk aktivering

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiveringssystem.

Det vanligen använda systemet består av en post-mitokondrial fraktion som kompletterats med en co-faktor, framställd från lever av gnagare som förbehandlats med enzyminducerande medel. Användningen av andra arter, vävnader, post-mitokondriala faktorer, eller förfaranden kan också vara lämplig för metabolisk aktivering.

Testbetingelser

Teststammar

De mest vanligen använda stammarna är de diploida D_4, D_5, D_7 och JD_1. Även andra stammar kan vara lämpliga.

Media

Vid bestämning av överlevnadsgrad och mitotisk rekombination används lämpliga kulturmedier.

Användning av negativa och positiva kontroller

Positiva kontroller, obehandlade kontroller och kontroller med lösningsmedel skall användas jämsides. Lämpliga positiva kontrollämnen skall användas för varje enskild genetisk endpoint.

Exponeringskoncentration

Minst fem olika koncentrationer av testämnet med passande intervaller mellan koncentrationerna skall användas. Här måste man ta hänsyn till faktorer som cytotoxicitet och löslighet. De lägsta koncentrationerna bör inte ha någon verkan på cellernas överlevnadsfrekvens. För toxiska ämnen skall den högsta koncentrationen som testas inte minska överlevnadsgraden till mindre än 5-10 %. Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet. Den högsta koncentrationen av icke-toxiska testämnen, som är fritt lösliga i vatten, fastställs från test till test.

Celler i stationär fas eller växtfas kan exponeras för testämnet i upp till 18 timmar. Om långa exponeringsperioder används bör dock kulturerna undersökas mikroskopiskt för sporbildning vars närvaro gör testet värdelöst.

Inkubationsbetingelser

Plattorna inkuberas i 4-7 dagar vid 28-30 °C i mörker. Plattor som används för bestämning av röda och ljusröda homozygota sektorer, som framkallats genom mitotisk överkorsning, förvaras i kylskåp (ca 4 °C) i ytterligare 1-2 dagar innan räkning för att möjliggöra utveckling av lämpliga pigmenterade kolonier.

Spontana mitotiska rekombinationsfrekvenser

Subkulturer bör användas med spontana mutationsfrekvenser inom allmänt accepterade gränser.

Antal parallella plattor

Minst tre parallella plattor används för varje koncentration vid bestämning av prototrofer som framkommit vid genmutation, och av cellernas livskraft. När man testar recessiva homozygoter, som framkallats genom mitotisk överkorsning, ökas antalet plattor så att ett lämpligt antal kolonier erhålls.

Testförfarande

Stammar av *Saccaromyces cerevisiae* exponeras normalt genom test i vätska som inbegriper antingen celler i stationär fas eller celler i växtfas. Inledande undersökningar bör utföras med celler i växtfas. 1-5 x 10^7 celler per ml exponeras för testämnet i upp till 18 timmar vid 28-37 °C under skakning. Om det behövs tillsätts en passande mängd metabolisk aktiveringssystem under exponeringen.

Efter behandlingen centrifugeras och tvättas cellerna varefter de utsås på ett lämpligt kulturmedium. I slutet av inkubationen registreras induktionen av genmutationer och antal överlevande per platta.

Om det första testet utfaller negativt bör ett andra utföras med användning av celler i stationär fas. Om det första testet utfaller positivt skall det bekräftas genom ett oberoende test.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och ange antal räknade kolonier, antal rekombinanter samt rekombinationsfrekvens.

Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test.

Utvärderingen av resultaten bör ske på grundval av en lämplig statistisk metod.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda stammar.

— Testbetingelser: stationär fas eller växtceller, sammansättning av medier, inkubationstemperatur och inkubationsperiod, metaboliskt aktiveringssystem.

— Exponeringsbetingelser; exponeringskoncentrationer, förfarande och varaktighet, exponeringstemperatur positiva och negativa kontroller.

— Antal räknade kolonier, antal mutanter, överlevnadsfrekvens och mutationsfrekvens, förhållandet mellan dos och effekt när detta är möjligt, statisktisk utvärdering av data.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

GENMUTATIONSTEST *IN VITRO* PÅ DÄGGDJURSCELLER

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Cellkulturer från däggdjur kan användas för upptäckt av mutationer som framkallas av kemiska ämnen. Normalt används muslymfomaceller L5178Y samt cellinjerna CHO och V-79 från kinesiska hamstrar. Vanligtvis används dessa cellinjer för bestämning av mutationer i följande loci: thymidin-kinas (TK), hypoxantin-guanin-fosforibosyl-tranferas (HPRT)([1]), och Na^+/K^+ ATPase. I TK- och HPRT-mutationssystemen upptäcks basparmutationer, frameshift-mutationer och mindre deletioner. I Na^+/K^+ systemet upptäcks endast basparmutationer.

Celler som saknar thymidin-kinas (TK) på grund av framåtmutationen $TK^+ \rightarrow TK^-$ är resistenta för bromodeoxyuridin (BrdU), fluordeoxyuridin (FdU) eller trifluorthymidin (TFT) eftersom dessa antimetaboliter inte kan inkorporeras i cellens nukleotider genom "salvage"-enzymsystemet thymidinkinas. De nukleotider som behövs för cellens metabolism syntetiseras uteslutande *de novo*. Om cellerna har funktionsduglig thymidin-kinas inkorporeras BrdU, FdU eller TFT dock i nukleotiderna. Därmed hämmas cellernas metabolism och en cytotoxisk effekt uppstår. Muterade celler kan därmed fortsatt dela sig i en miljö som innehåller BrdU, FdU eller TFT, vilket normala celler, som innehåller thymidin-kinas, inte kan. På samma sätt är celler, som saknar HPRT, resistenta för 8-azaguanin (AG) eller 6-thioguanin (TG). Celler med ändrat Na^+/K^+ ATPase är resistenta för ouabain.

Den cytotoxiska effekten bestäms på grundval av testämnets verkan på kolonibildandet (kloniseringseffektiviteten) eller kulturernas växtfrekvens. Mutationsfrekvensen bestäms genom utsåning av ett känt antal celler i en media som innehåller den valda agenten, varefter antalet muterade celler registreras. Efter en passande inkubationsperiod räknas kolonierna. Mutationsfrekvensen beräknas på grundval av antalet muterade kolonier korrigerat på grundval av överlevnadsgraden.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Celler

En lång rad cellinjer kan användas för denna test, inbegripet subkloner av L5178Y, CHO celler eller V-79 celler med en bevisad följsamheten för kemiska mutagener, en hög kloniseringseffektivitet och en låg spontan mutationsfrekvens. Cellerna kan regelbundet kontrolleras för karyotypstabilitet och bör kontrolleras för mykoplasma-förorening. Även andra celltyper kan användas, förutsatt att deras validitet för bestämning av kemiskt framkallade genmutationer fullständigt kan dokumenteras.

([1]) Tidigare HGPRT.

Media

Ett lämpligt kulturmedium och lämpliga inkubationsbetingelser (t. ex. temperatur, odlingskärl, CO_2-koncentrationer och fuktighet) skall användas. Medium och serum bör väljas i överensstämmelse med de selektiva system och celltyper som används.

Testämne

Testämnen tillsätts i ett kulturmedium eller upplöses eller suspenderas i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras. Den slutliga koncentrationen av vehikeln bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft eller växtegenskaper.

Metabolisk aktivering

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiverings-system från däggdjursceller. Om celltyper med endogen metabolisk aktivering används bör det vara bevisat att aktiveringsform och -hastighet är lämpligt för den kemiska klass som testas.

Testbetingelser

Användning av negativ och positiv kontroller

Som positiva kontroll används vid varje enskilt försök både en direkt verkande kemisk förbindelse och en förbindelse som kräver metabolisk aktivering. Dessutom företas negativ (vehikel) kontroll. Följande kemiska förbindelser kan t. ex. användas till positiv kontroll:

— direktverkande förbindelser:

  — etylmetansulfonat,

  — hycanthon,

— indirekt verkande förbindelser:

  — 2-acetylaminofluoren,

  — 7,12-dimetylbenzanthracen,

  — N-nitrosodimetylamin.

När det är möjligt bör en supplerande positiv kontroll göras med användning av en kemisk förbindelse av samma typ som testämnet.

Exponeringskoncentration

Flera koncentrationer av testämnet skall användas. Dessa koncentrationer bör framkalla en koncentrationsrelaterad toxisk verkan. Den högsta koncentrationen bör medföra en låg överlevnadsgrad och överlevnadsgraden vid den lägsta koncentrationen bör vara av samma storlek som vid det negativa kontrollförsöket.

Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet. Den högsta koncentrationen av icke-toxiska testämnen, som är fritt lösliga i vatten, fastställs från test till test.

Testförfarande

Antalet använda celler per kultur fastställs med beaktande av den spontana mutationsfrekvensen. En en allmän regel är att använda så många livskraftiga celler som motsvarar tio gånger det omvända proportionella värdet av den spontana mutationsfrekvensen.

Cellerna bör exponeras under en passande period, i de flesta fall räcker det med 2-5 timmar. Celler vars endogena metaboliska akrivering är otillräcklig testas både med och utan ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Efter exponeringen tvättas cellerna fria från testämne. Därefter odlas de i syfte att bestämma deras livskraft och i syfte att låta den muterade fenomtypen komma till uttryck.

Odlingsperioden bör vara tillräckligt lång för att de framkallade mutationerna så långt det går skall kunna ta sig optimalt fenotypiskt uttryck. Därefter odlas cellerna i medium med och utan selektiva agenser i syfte att bestämma antal mutanter och livskraft.

Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test.

2. DATA

Data ställs upp i tabellform. Antal framkallade mutanter och överlevande anges för varje enskild platta. Dessutom anges det genomsnittliga antalet kolonier per platta och standardavvikelse. Mutationsfrekvensen beräknas som antal mutanter dividerat med antal överlevande celler. Överlevnadsgraden och kloningseffektiviteten beräknas som en procentdel av kontrollkulturen. Utvärderingen av data grundas på lämpliga statisktiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd cellinje, antal cellkulturer, metoder för bibehållande av cellkulturer.

— Testbetingelser: Sammansättning av mediet, CO_2-koncentration, testämnekoncentration, använd vehikel, inkubationstemperatur, inkubationstid, odlingsperioder (inbegipet antal utsådda celler och subkulturer och mediatillsättningar, om lämpligt), exponeringsperiod, celltäthet under exponeringen, använt metaboliskt aktiveringssystem från däggdjursceller, positiva och negativa kontroller, använd selektiv agens.

— Motivering för val av doser.

— Metoder för räkning av livskraftiga och muterade celler.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

DNA-SKADA OCH DNA-REPARATION – FELAKTIG DNA-SYNTES – DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Vid test av sporadisk DNA-syntes (UDS) mäts DNA-reparationssyntesen efter bortskärning och avlägsnade av det avsnitt av DNA-strängen som innehåller det skadade område som inducerats av kemiska eller fysiska agenser. Testen bygger på inkorporering av tritiummarkerat thymidin (^{3}H-TdR) i däggdjurscellers DNA när dessa celler inte är i S-fasen av cellcykeln. Upptaget av ^{3}H-TdR kan besämmas genom autoradiografi eller genom vätskescintillationsräking (LSC) av DNA från de exponerade cellerna. Såvida inte primärkulturer av råtthepatocyter används, exponeras odlade däggdjursceller för testämnet med och utan ett exogent metaboliskt aktiveringssystem. UDS-test kan också företas i *in vivo*-system.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Testämne samt kontroll- och referensämnen tillsätts i ett kulturmedium eller upplöses eller suspenderas i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras. Koncentrationen av vehikeln bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft.

Primärkulturer av råtthepatocyter, humana lymfocyter eller etablerade cellinjer (t. ex. humana diploida fibroblaster) kan användas.

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem.

Försöksbetingelser

Antal kulturer

Vid autoradiografisk bestämning av UDS används minst två och vid LSC sex kulturer (eller mindre om det är vetenskapligt berättigat) för varje experimentpunkt.

Användning av negativa och positiva kontroller

Positiva och negativa (obehandlade och/eller vehikel) kontroller skall användas jämsides med och utan metabolisk aktivering i varje försök.

Som positiv kontroll vid användning av råtthepatocyter kan t. ex. 7,12-DMBA (7,12-dimetylbenzanthracen) eller 2-AAF (2-acetylaminofluoren) användas. Som positiv kontroll vid användning av etablerade cellinjer kan t. ex. 4-NQO (4-nitrouinloin-N-oxid) användas både i samband med autoradiografisk registering och LSC utan metabolisk aktivering. När metaboliska aktiveringssystem används kan t. ex. N-dimetylnitrosamin användas för positiv kontroll.

Exponeringskoncentration

En rad olika koncentrationer av testämnet med passande intervaller mellan koncentrationerna som täcker alla verkningar skall användas. Den högsta koncentrationen bör ha en viss cytotoxisk verkan. Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet. Den högsta koncentrationen av icke-toxiska testämnen, som är fritt lösliga i vatten, fastställs från test till test.

Celler

Lämpligt växtmedium, CO_2-koncentration, temperatur och fuktighet för att bibehålla kulturerna skall användas. Etablerade cellinjer skall kontrolleras regelbundet för mykoplasma-förorening.

Metabolisk aktivering

I samband med primärkulturer av hepatocyter används inte metaboliska aktiveringssystem. Etablerade cellinjer och lymfocyter exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem.

Förfarande

Förberedelse av kulturer

Etablerade cellinjer framställs på grundval av stamkulturer (t. ex. genom trypsinering eller skakning) och utsås med passande täthet i odlingskärl, varefter de inkuberas vid 37 °C.

Primärkulturer av råtthepatocyter etableras när hepatocyter omedelbart efter isolering förs över i ett passande medium och tillåts att häfta sig vid den växande ytan.

Humana lymfocytkulturer odlas genom därtill lämpade metoder.

Exponering av kulturerna för testämnet

Primärkulturer av råtthepatocyter

Färskt isolerade råtthepatocyter exponeras för testämnet under lämplig tid i ett medium som innehåller ^{3}H-TdR. Efter exponering avlägsnas cellerna från mediet och tvättas, fixeras och torkas. Objektglasen bör doppas i autoradiografisk emulsion (alternativt kan "stripping" film användas) och belyses, framkallas, färgas och räknas.

Etablerade cellinjer och lymfocyter

Autoradiografisk teknik: Cellkulturerna exponeras först för testämnet under en passande tid och därefter för ^{3}H-TdR. Exponeringsperioderna beror på ämnenna, de metaboliska aktiveringssystemen och celltyperna. Exponering för ^{3}H-TdR bör ske samtidigt eller inom några minuter efter exponering för testämnet så att UDS mäts vid den tid då aktiviteten är störst. Valet mellan dessa två förfaranden beror på risken för interaktion mellan testämnet och ^{3}H-TdR. För att skilja mellan UDS och semi-konservativ DNA-replikation kan den senare inhiberas genom användning av t. ex. argininfattiga medier, ett lågt seruminnehåll eller tillsättning av hydroxyurinämne till kulturmediet.

LSC-mätning av UDS: Före exponering för testämnet blockeras cellernas övergång till S-fasen som beskrivits ovan. Därefter exponeras cellerna på samma sätt som vid den autoradiografiska tekniken. Omedelbart efter inkubationen extraheras cellernas DNA och det totala DNA-innehållet samt mängden av inkorporerat ^{3}H-TdR mäts.

När de nämnda teknikerna används på humana lymfocyter är det inte nödvändigt att hämma den semi-konservativa DNA-replikationen, såvida det inte rör sig om stimulerade kulturer.

Analys

Autoradiografisk bestämning

Vid mätning av UDS i odlade celler medräknas inte kärnor i S-fasen. Minst 50 celler per koncentration skall räknas. Objektglasen bör kodmärkas innan räkning. På varje platta bör flera olika slumpmässigt valda områden med stort inbördes avstånd räknas. Mängden av inkorporerat ^{3}H-TdR i cytoplasman bestäms genom räkning i tre områden i kärnstorlek i varje räknad cells cytoplasma.

LSC-mätning

Vid LSC-mätning av UDS används ett passande antal kulturer per koncentration och per kontrollförsök. Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test.

2. DATA

Data ställs upp i tabellform

2.1. Autoradiografisk mätning

Mängden av inkorporerat ^{3}H-TdR i cytoplasman och antalet korn som registreras i cellkärnområdet anges separat.

Fördelning av mängden av inkorporerat ^{3}H-TdR i cytoplasman och antalet korn per kärna kan beskrivas genom användning av medel, median eller modus.

2.2. LSC-mätning

Vid LSC-mätning anges inkorporeringen av ^{3}H-TdR som dpm/µg DNA. Disributionen av inkorporeringen kan beskrivas genom användning av medel dpm/µg DNA med tillhörande standardavvikels. Utvärderingen av resultaten skall grundas på en lämplig statistisk metod.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använda celler, täthet och antal passager på exponeringstidpunkten, antal cellkulturer

— Metoder för bibehållande av cellkulturer, inbegripet medium, temperatur och CO_2-koncentration.

— Testämne, vehikel, koncentrationer och motivering för val av använda koncentrationer.

— Detaljerad information om de metaboliska aktiveringssystemen.

— Exponeringsschema.

— Positiva och negativa kontroller.

— Använd autoradiografisk teknik.

— Förfarande vid blockering av cellernas övergång till S-fasen.

— Förfarande vid extraktion av DNA och bestämning av det totala DNA-innehållet vid LSC-mätningen.

— Förhållandet mellan dos och reaktion när detta är möjligt.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

TEST AVSEENDE SYSTERKROMATIDBYTEN *IN VITRO*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Test av systerkromaidbyten (SCE) är ett korttidstest för bestämning av reciprok utväxling av DNA mellan två systerkromatider i en kromosom under replikation. Vid SCE sker en utväxling av DNA-replikationsprodukter vid skenbart homolog loci. Man tror att utväxlingsprocessen sannolikt omfattar brytning och återförening av DNA-koder, men det finns nästan ingen kännedom om dess molekylbas. För att kunna upptäcka SCE är det nödvändigt att differentialmärka systerkromatiderna, vilket kan göras genom att inkorporera bromdeoxyuridin (BrdU) i kromosomernas DNA under två cellcykler.

Däggdjursceller exponeras *in vitro* för testämnet med och utan ett exogent metaboliskt aktiveringssystem från däggdjur, om detta anses relevant, och odlas under två cellcykler i ett medium som innehåller BrdU. Sedan cellerna behandlats med en spindelfiberinhibitor (t. ex. kolchicin) för att cellerna skall ackumuleras i ett metafasliknande stadium av mitosen (c-metafas), skördas de och prepareras för kromosomanalys.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

— För detta test kan primärkulturer (t. ex. humana lymfocyter) eller etablerade cellinjer (t. ex. äggstocksceller från kinesisk hamster) användas. Cellinjer bör kontrolleras för mykoplasmaförorening.

— Lämpligt kulturmedium och lämpliga inkubationsbetingelser (t. ex. temperatur, odlingskärl, CO_2-koncentrationer och fuktighet) skall användas.

— Testämnet tillsätts i ett kulturmedium eller upplöses eller suspenderas i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras. Koncentrationen av vehiklen bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft eller växtegenskaper. En eventuell påverkan av SCE-frekvensen kontrolleras genom odling av en kontrollkultur i lösningsmedlet.

— Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiveringssystem från däggdjursceller. Om celltyper med endogen metabolisk aktivering används bör det vara bevisat att aktiveringsform och -hastighet är lämpliga för den kemiska klass som testas.

Testbetingelser

Antal kulturer

För varje experimentell punkt används minst två parallella kulturer.

Användning av negativ och positiv kontroller

Som positiva kontroll används vid varje enskilt försök både en direkt verkande kemisk förbindelse och en förbindelse som kräver metabolisk aktivering. Dessutom företas vehikelkontroll.

Följande kemiska förbindelser kan t. ex. användas till positiv kontroll:

— direktverkande förbindelser:

  — etylmetansulfonat,

— indirekt verkande förbindelser:

  — cyclofosfamid.

Vid behov kan en supplerande positiv kontroll göras med användning av en kemisk förbindelse av samma typ som testämnet.

Exponeringskoncentration

Minst tre koncentrationer av testämnet med passande intervaller mellan koncentrationerna skall användas. Den högsta koncentrationen bör ha en tydlig cytotoxisk verkan men får inte förhindra den nödvändiga celldelningen. Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet. Den högsta koncentrationen av icke-toxiska testämnen, som är fritt lösliga i vatten, fastställs från test till test.

Testförfarande

Odling

Etablerade cellinjer framställs på grundval av stamkulturer (t. ex. genom trypsinering eller skakning) och utsås med passande täthet i odlingskärl, varefter de inkuberas vid 37 °C. För monolagskulturer justeras antalet celler per kulturkärl så att kulturena vid tidpunkten för skörden högst täcker 50 % av växtarealen. Cellerna kan också odlas i suspension. Humana lymfocytkulturer odlas med användning av därtill lämpliga metoder på grundval av hepariniserat blod och inkuberas vid 37 °C.

Exponering

Celler i den exponentiella växtfasen exponeras för testämnet under en passande period. I de flesta fall räcker det med 1-2 timmar men i vissa fall kan exponeringsperioden förlängas till att omfatta två hela cellcykler. Celler vars endogena metaboliska aktivering är otillräcklig exponeras både med och utan tillsättning av ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Efter exponeringen tvättas cellerna fria från testämne. Därefter odlas de under två replikationscykler i ett medium som innehåller BrdU. Alternativt kan cellerna exponeras för testämnet och BrdU samtidigt under en period som motsvarar två cellcykler.

Kulturer från humana lymfocyter exponeras medan de befinner sig i semisynkront tillstånd.

Cellerna analyseras under deras andra delning efter exponering vilket säkerställer att exponeringsperioden täcker den största delen av de följsamma faserna i cellcykeln. Alla kulturer som tillsatts BrdU bevaras och manipuleras i mörker eller i svagt ljus från glödlampor tills dess att cellerna skördas för att minimiera fotolysen av BrdU-haltigt DNA.

Skörd av celler

Cellkulturerna behandlas med en spindelfiberinhibitor (t. ex. kolchicin) i 1-4 timmar innan de skördas. Varje kultur skördas för sig och behandlas separat för kromosompreparering

Kromosompreparation och färgning

Vid kromosompreparation används cytogeniska standardtekniker. Färgning på objektglas för att visa SCE kan ske på flera olika sätt (t. ex. fluorescens plus Giemsametoden).

Analys

Antalet av de celler som skall analyseras grundas på den spontana SCE-frekvensen i kontrolltest. Normalt analyseras minst 25 väl utspridda metafaser per kultur för SCE. Objektglas kodas före analys. Vid analys av humana lymfocyter analyseras endast metafaser med 46 centromerer. Vid analys av etablerade cellinjer analyseras endast metafaser med det modala antal centromerer ± 2. Det bör anges huruvida omväxling i märkningen omkring centromeret betraktas som SCE. Resultaten bör bekräftas genom ett oberoende test.

2. DATA

Data ställs upp i tabellform. Antal SCE för varje metafas samt antalet SCE per kromosom för varje metafas bör anges separat för alla exponerade kulturer och kontrollkulturer. Utvärderingen av data grundas på lämpliga statisktiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Använda celler, metoder för bibehållande av cellkulturer.

— Testbetingelser: Sammansättning av mediet, CO_2-koncentration, testämnekoncentration, använd vehikel, inkubationstemperatur, exponeringsperiod, använd spindelfiberinhibitor plus upplysningar och dess koncentration och behandlingens varaktighet, använt metaboliskt aktiveringssystem, positiva och negativa kontroller.

— Antal cellkulturer per experimentell punkt.

— Detaljerade upplysningar om objektprepareringstekniken.

— Antal analyserade metafaser (ata anges separat för varje kultur).

— Genomsnittligt antal SCE per cell och per kromosom (data anges separat för varje kultur).

— Kriterier för utvärdering av SCE.

— Motivering för val av doser.

— Förhållandet mellan dos och reaktion när detta är möjligt.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

KÖNSBUNDEN RECESSIV LETAL TEST PÅ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Vid könsbunden recessiv letal test (SLRL) på *Drosophila melanogaster* undersöks förekomsten av både punktmutationer och mindre deletioner hos insektens avkomma. Det är en framåtmutationstest genom vilken det är möjligt att undersöka ca 800 loci på X-kromosomen i syfte att registrera mutationer. Detta antal utgör ca 80 % av alla X-kromosomens loci. X-kromosomen utgör omkring en femtedel av den samlade haploida kromosommängden.

Mutationer i *Drosophila melanogasters* X-kromosom kommer till fenotypiskt uttryck hos handjur som är bärare av den muterade genen. När mutationen under hemizygota betingelse är letal konstateras detta genom frånvaron av en av de två typer av handjur som normalt finns i ett meterozygotiskt hondjurs avkomma. I SLRL-testet utnytjas detta förhållande med hjälp av speciellt märkta och arrangerade kromosomer.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Stammar

Handjur av väldefinierade vildtypstammat och hondjur från Muller-5-stammen kan användas. Lämpligt märkta hondjur från andra stammar och multipelt inverterade X-kromosomer kan också användas.

Testämne

Testämnet upplöses i vatten. Ämnen som är oupplösliga i vatten kan upplösas eller suspenderas i lämpliga vehikler (t. ex. en blandning av etanol och Tween-60 eller -80) och därefter spädas ut i vatten eller salin före tillförsel. Dimetylsulfoxid (DMSO) bör undvikas som vehikel.

Antal

Testet bör utformas så att följsamheten och betydelsen av testet är fastställt på förhand. Den spontana mutationsfrekvens som registreras i kontrollförsök är av stor betydelse för bestämning av det antal exponerade kromosomer som skall analyseras.

Tillförselväg

Exponeringen kan ske genom oral tillförsel, injektion eller genom exponering för gaser eller ångor. Testämnet kan eventuellt tillföras i en sockerlösning. Vid behov kan den upplösas i en 0,7 % NaCl-lösning och injiceras i bröstkorgen eller buken.

Användning av negativa och positiva kontroller

En negativ (vehikel) och en positiv kontroll skall utföras. Om det finns data från tidigare laboratorieförsök är det dock inte nödvändigt att utföra sidlöpande kontroll.

Exponeringskoncentration

Tre koncentrationsnivåer skall användas. För en preliminär undersökning kan en enkel koncentration användas som antingen kan vara den högsta koncentration som insekterna tål eller en koncentration som orsakar en viss grad av toxisk verkan. Vid icke-toxiska testämnen exponeras insekterna för de största möjliga koncentrationerna.

Testförfarande

Vildtyphandjur (3-5 dagar gamla) exponeras för testämnet och paras individuellt med flera jungfruliga hondjur från Muller-5-stammen eller från andra lämpligt märkta stammar (med multipelt inverterade X-kromosomer). Hondjuren byts ut mot nya jungfruliga hondjur var annan eller var tredje dag tills hela könscellcykeln är täckt. Hondjurens avkomma registreras för att konstatera letala verkningar som motsvarar exponeringens verkan på mogen sperma, spermatider i sena stadier eller medelstadier, spermatider i tidiga stadier, spermatocyter och spermatogonia.

Heterozygota F_1-hondjur från de ovan nämnda korsningarna paras individuellt (dvs. ett hondjur per flaska) med sina bröder. I F_2-generationen registreras varje kultur för bestämning av frånvaron av vildtyphandjur. Om en kultur har uppstått från ett F_1-hondjur som bär en letal gen i den parentala X-kromosomen (dvs. det finns inga handjur med den exponerade kromosomen) testas döttrar till detta hondjur med samma genotyp för att konstatera om den letala verkan upprepas i nästa generation.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och ange antal testade X-kromosomer, antal ofruktsamma handjur, antal letala kromosomer för varje exponeringskoncentration och för var och en av de exonerade handjurens parningsperioder. Dessutom anges antalet klungor av olika storlek per handjur. Resultaten bör bekräftas genom ett oberoende test.

Utvärderingen av en könsbunden recessiv letal test skall grundas på lämpliga statistiska metoder. Kluster av generationer med recessiva letala gener som stammar från ett enda handjur skall registreras och utvärderas på grundval av en lämpligt statistisk metod.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Stammar: Använda *drosophila*-stammar, insekternas ålder, antal exponerade handjur, antal sterila handjur, antal etablerade F_2-bestånd, antal F_2-bestånd utan avkomma, antal kromosomer med letala gener i varje könscellstadium.

— Kriterier för fastställande av storleken av de exponerade grupperna.

— Testbetingelser: Detaljerade beskrivning av exponerings- och stickprovsschema, exponeringskoncentrationer, toxicitetsdata, negativ (lösningsmedel) och eventuella positiva kontroller.

— Kriterier för registrering av letala mutationer.

— Förhållandet mellan dos och reaktion när detta är möjligt.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

CELLTRANSFORMATIONSTEST PÅ DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definition

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Kulturer av däggdjursceller kan användas för upptäckt av fenotypiska förändringar *in vitro* som inducerats av kemiska förbindelser i samband med maligna transformationer *in vivo*. De mest använda celltyperna är C3H10T1½, 3T3, SHE, Fischer-råtta, och testerna bygger på förändringar i cellmorfologin, fokusbildning eller egenskapen att kunna växa i mjuk agar. Det finns också mindre vanligt använda stammar som används för undersökning av andra fysiologiska eller morfologiska förändringar i celler till följd av exponering för cancerogena kemiska förbindelser. Inga direkta verkningsmekanismförbindelser mellan cancer och de genetiska endpoints som används i dessa tester *in vitro* finns beskrivna. Några av testsystemen kan användas för upptäckt av tumörpromotorer. Den cytotoxiska effekten kan bestämmas genom mätning av testämnets verkan på kolonibildande (kloniseringseffektiviteten) eller kulturernas växtfrekvens. Syftet med mätningen av den cytotoxiska effekten är att konstatera om exponering för testämnet är toxikologiskt relevant, men kan inte användas för beräkning av transformationsfrekvensen i alla tester, eftersom vissa kräver lång inkubationstid och/eller överföring till nya plattor.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Celler

En rad olika cellinjer eller primärlinjer kan användas beroende på vilken transformationstest som görs. Försöksledaren måste säkerställa att använda celler genomgår relevanta fenotypiska förändringar efter exponering för kända cancerogener, och försöksledarens eget laboratorium måste ha bevisat och dokumenterat det använda testets validitet och trovärdighet.

Medium

Medium och försöksbetingelser som är lämpliga för transformationstest skall användas.

Testämne

Testämnet tillsätts i ett kulturmedium eller upplöses eller suspenderas i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras. Koncentrationen av vehikeln bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft eller växtegenskaper.

Metabolisk aktivering

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiverings-system. Om celltyper med endogen metabolisk aktivering används bör det vara bevisat att aktiveringsform och -hastighet är lämpligt för den kemiska klass som testas.

Testbetingelser

Användning av negativa och positiva kontroller

Som positiva kontroll används vid varje enskilt försök både en direkt verkande kemisk förbindelse och en förbindelse som kräver metabolisk aktivering. Dessutom företas negativ (vehikel) kontroll.

Följande kemiska förbindelser kan t. ex. användas till positiv kontroll:

— direktverkande förbindelser:

  — etylmetansulfonat,

  — μ-propiolacton,

— förbindelser som kräver metabolisk aktivering:

  — 2 -acetylaminofluoren,

  — 4-dimetylaminoazobenzen,

  — 7,12-dimetylbenzanthracen.

Vid behov kan en supplerande positiv kontroll göras med användning av en kemisk förbindelse av samma typ som testämnet.

Exponeringskoncentration

Flera koncentrationer av testämnet skall användas. Dessa koncentrationer bör framkalla en koncentrationsrelaterad toxisk verkan. Den högsta koncentrationen bör medföra en låg överlevnadsgrad och överlevnadsgraden vid den lägsta koncentrationen bör vara av samma storlek som vid det negativa kontrollförsöket. Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet. Den högsta koncentrationen av icke-toxiska testämnen, som är fritt lösliga i vatten, fastställs från test till test.

Testförfarande

Cellerna bör exponeras under för det använda testsystemet passande period. Detta kan inbegripa upprepad dosering åtföljt av en ändring av medium (och vid behov ny metabolisk aktivering) om det är fråga om långvarig exponering. Celler vars endogena metaboliska aktivering är otillräcklig testas både med och utan ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Efter exponeringen tvättas cellerna fria från testämne. Därefter odlas de i syfte att låta den transformerade fenotyp som testet bygger på komma till uttryck och i syfte att bestämma transformationsfrekvensen. Alla resultat skall bekräftas genom ett oberoende test.

2. DATA

Data skall ställs upp i tabellform och kan ta sig olika uttryck beroende på använt testsystem. Det kan t. ex. röra sig om räkning av plattor, positiva plattor eller antal transformerade celler. Vid behov anges överlevnadsgraden som en procentdel av överlevnaden i kontrollförsöken, och transformationsfrekvensen uttrycks som antal transformerade celler per överlevande. Utvärderingen av data grundas på lämpliga statistiska metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd celltyp, antal cellkulturer, metoder för bibehållande av cellkulturer.

— Testbetingelser: Testämnekoncentration, använd vehikel, inkubationstid, testets varaktighet och frekvens, celltäthet under exponeringen, använt exogent metaboliskt aktiveringssystem, positiva och negativa kontroller, specifikation av den fenotyp som testet bygger på, använt selektivt system (om sådant har använts), motivering för val av doser.

— Metoder för registrering av livskraftiga och transformerade celler.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

DOMINANT LETAL TEST PÅ GNAGARE

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Dominanta letala verkningar leder till att embryot eller fostret dör. När dominanta letala mutationer framkallas genom exponering för en kemisk ämne är det ett tecken på att försöksdjurartens könscellvävnader har skadats. Det råder bred enighet om att dominanta letala gener uppstår till följd av kromosomskador (strukturella och numeriska anomalier). Om exponerade handjurs avkomma dör på det embryonala stadiet kan även detta skyllas på toxiska verkningar.

Normalt exponeras handjur för testämnet och paras med jungfruliga hondjur. Könscellernas olika stadier kan undersökas separat genom att använda på varandra följande parningsperioder. Ökningen av antalet döda implantater per hondjur i den exponerade gruppen i förhållande till antalet döda implantater per hondjur i kontrollgruppen visar den letala verkan efter implantation. Det letala verkan före implantation kan bedömas på grundlag av räkning av corpora lutea eller genom sammanslagning av det totala antalet implantater per hondjur i de exponerade grupperna och kontrollgruppen. Den totala dominanta letala verkan är summan av de letala verkningar före och efter implantation. Beräkningen av den totala dominanta letala verkan grundas på sammanräkning av antalet levande implantater per hondjur i försöksgruppen och antalet levande implantater per hondjur i kontrollgruppen. En minskning av antalet implantater under bestämda tidsperioder kan skyllas på celldöd (av spermacyter och/eller spermatogoner).

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Testämnet upplöses eller suspenderas i fysiologisk saltlösning. Kemiska förbindelser som inte är lösliga i saltlösning skall lösas eller suspenderas i lämplig vehikel. Den vehikel som används får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter. Nyligen framställda lösningar av testämnet skall användas.

Försöksbetingelser

Tillförselväg

Testämnet skall vanligen endast tillföras en gång. På grundval av toxikologisk information kan upprepad behandling användas. Vanligtvis tillförs testämnet genom oral intubering eller intraperitoneal injicering. Även andra tillförselvägar kan användas

Försöksdjur

Råttor och möss rekommenderas som försöksdjur. Friska könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Antal och kön

Ett lämpligt antal handjur bör användas, med hänsyn tagen till den spontana variationen i den biologiska egenskap som utvärderas. Beslutet om hur många djur som skall användas bör grundas på den på förhand fastställda känsligheten för upptäckt och betydelsegrad. Vid ett typiskt försök skall det finnas tillräckligt med handjur för att uppnå 30-50 dräktiga hondjur varje parningsperiod.

Användning av negativa och positiva kontroller

Normalt görs sidlöpande positiva och negativa (vehikel) kontroller för varje försök. Om det finns godtagbara positiva kontrollresultat från nyligen genomförda försök i samma laboratorium kan dock dessa användas i stället för sidlöpande positiv kontroll. Positiva kontrollämnen används i tillräcklig låga doser (t. ex. MMS i. p., 10 mg/kg) för att visa testens känslighet.

Dosnivåer

Normalt används tre olika dosnivåer. Den högsta dosnivån bör orsaka tecken på toxiska verkningar eller minskad fertilitet hos de exponerade djuren. I vissa fall räcker det med en enda hög dosnivå.

Gränstest

Icke-toxiska ämnen testas vid 5 g/kg i en enda dos eller vid upprepad tillförsel av 1 g/kg/dag.

Förfarande

Flera olika doseringsscheman kan användas. Normalt ges hela dosen på en gång men andra behandlingsscheman kan också användas.

Efter behandling paras handjuren med lämpliga intervaller individuellt med 1-2 jungfruliga hondjur. Hondjuren placeras hos handjuren under en period som motsvarar minst en äggcykel, eller tills parning har skett, vilket konstateras genom närvaron av sperma i vaginan eller närvaron av en vaginalpropp.

Antal parningar efter behandlingen fastställs på grundval av doseringsschemat och bör säkerställa att alla könscellsstadier är representerade efter doseringen.

Hondjuren avlivas under den andra hälften av dräktigheten och innehållet i livmodern undersöks för bestämning av antalet levande och döda implantat. Äggstockarna undersöks för bestämning av antalet corpora lutea.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform och ange antal handjur samt antal dräktiga och icke dräktiga hondjur. Resultaten av varje enskild parning, inbegripet identifiering av varje han- och hondjur, skall anges separat. För varje hondjur anges parningsvecka, handjurets dos och antalet levande och döda implantat.

Beräkningen av den totala dominanta letala verkan grundas på jämförelse av antal levande implantat per hondjur hondjur i försöksgruppen och antalet levande implantat per hondjur i kontrollgruppen. Förhållandet mellan döda och levande implantat i försöksgruppen i jämförelse med förhållandet i kontrollgruppen analyseras för bestämning av den letala verkan efter implantation.

Om data registreras som tidiga eller sena dödsfall skall detta framgå av tabellerna. Om en utvärdering av den letala verkan sker före implantation skall denna anges. Den letala verkan före implantation kan beräknas som skillnaden mellan antalet *corpora lutea* och antalet implantater eller som en minskning av det genomsnittliga antalet implantat per livmoder i jämförelse med kontrollparningarna.

Utvärderingen av resultat skall grundas på en lämplig statistisk metod.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, de använda djurens ålder och vikt, antal djur av varje kön i försöks- och kontrollgrupperna.

— Testämne, vehikel, testade dosnivåer och motivering för val av doser, negativa och positiva kontroller.

— Tillförselväg och dosens varaktighet.

— Parningsschema.

— Metod för bestämning av om parning skett.

— Tidpunkt för avlivning.

— Kriterier för registrering av dominanta letala gener.

— Förhållandet mellan dos och reaktion när detta är möjligt.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

CYTOGENETISK TEST PÅ KÖNSCELLER FRÅN DÄGGDJUR *IN VITRO*

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Detta cytogenetiska test *in vitro* används för upptäckt av strukturella kromosomförändringar i spermatogonier. Den bygger på analyser av mitoser i spermatogonier för bestämning av kromatid- och kromosomförändringar.

I metoden används preparat av testiklar från däggdjur som har exponerats för testämnet på ändamålsenligt sätt och sedan avlivats med följdriktiga intervaller. Före avlivning behandlas djuren dessutom med en spindelfiberinhibitor, t. ex. kolchicin för att celler skall ackumuleras i ett metafasliknande stadium av mitosen (c-metafas). Lufttorkade kromosompreparat bereds, färgas och analyseras mikroskopiskt.

Analys av spermatocyter i diakines-metafas I för translokationsmultivalens efter exponering för testämnet kan ge användbara kompletterande information.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Testämnet upplöses i isotoniskt saltlösning. Ämnen som inte är lösliga i saltlösning skall lösaseller uppslammas i lämplig vehikel. Nyligen framställda lösningar av testämnet skall användas. Vehikel som används får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska verkningar.

Tillförselväg

Vanligtvis tillförs testämnet oralt eller genom intraperitoneal injicering. Även andra tillförselvägar kan användas.

Försöksdjur

Vanligtvis används möss och kinesiska hamstrar. Även andra däggdjur kan användas.

Friska könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Antal djur

Minst fem handjur skall ingå i varje försöks- och kontrollgrupp.

Användning av negativa och positiva kontroller

Vanligtvis företas sidlöpande positiva och negativa (vehikel) kontroller för varje försök.

Positiva kontrollämnen används i tillräcklig låga doser (t. ex. mitomycin C, i. p., 0,3 mg/kg) för att visa testens känslighet.

Dosnivå

En dos av testämnet används - antingen den maximalt tolererade dosen eller en dos som ger viss toxisk verkan Om denna dos medför omfattande celldöd används dessutom en lägre dos med cytotoxisk verkan. Om man vill fastställa förhållandet mellan dos och reaktion används minst tre doser (t. ex. för bestämning av en svag positiv reaktion). Icke-toxiska testämnen testas genom användning av så höga doser som möjligt, både när hela dosen ges på en gång och vid upprepad tillförsel.

Förfarande

Vanligtvis behandlas försöksdjuren en gång med hela dosen. Prov tas tre gånger efter behandling. Den viktigste provtagningen görs efter 24 timmar, men eftersom testämnet kan påverka cellcykelkinetiken skall provtagning dessutom göras en gång före och en gång efter 2 timmar vid lämpliga intervaller på 6–48 timmar. Om ytterligare dosnivåer används skall prov tas vid de särskilt känsliga intervallerna, eller om dessa inte är kända, 24 timmar efter behandling.

Alternativt kan upprepad tillförsel av testämnet användas varvid djuren avlivas 24 timmar efter den sista behandlingen. Ytterligare provtagningar vid lämpliga intervaller mellan 6-24 timmar kan göras.

Testikelpreparering

För att analysera mitoser i spermatogonerna injiceras spindelfiberinhibitor, t. ex. kolchicin, intraperitonealt i försöksdjuren. Efter en passande tidsperiod avlivas djuren. För möss är denna tidsperiod 3-5 timmar medan det för kinesiska hamstrar kan krävas över fem timmar.

Lufttorkningsteknik används. Användningen av olika djurarter kan kräva att standardförfarandet modifieras. Cellsuspensionen bereds, behandlas med hypotonisk lösning och fixeras. Därefter breds den ut på objektsglas och färgas. Innan den mikroskopiska analysen genomförs kodas objektsglasen.

Analys

Minst 100 väl fördelade mitotiska metafaser med komplett antal centromerer analyseras för strukturella kromosomförändringar. Dessutom kan förhållandet mellan spermatogoniala mitoser i den första och andra meiotiska metafasen bestämmas i ett utval på 100 celler i delningsfasen per djur för bestämning av eventuell toxisk verkan.

2. DATA

Data skall ställas upp i tabellform. Alla former av förändringar skall anges separat för varje djur i försöks- och kontrollgrupperna. Det totala analet analyserade celler och antalet avvikande celler anges. För alla parametrar anges medelvärde och standardavvikelse. Det genomsnittliga förhållandet mellan spermatogoniernas mitoser och första och andra meiotiska metafasen anges för varje försöks- och kontrollgrupp i tabellform, om detta har fastställts.

Utvärderingen av resultat skall grundas på en lämplig statistisk metod.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Handjurens art, stam, ålder och vikt.

— Antal djur i varje försöks- och kontrollgrupp.

— Försöksbetingelser, detaljerad beskrivning av behandling, dosnivåer, lösningsmedel, injicerad spindelfiberinhibitor.

— Antal analyserade celler per djur i varje grupp.

— Avvikelsernas antal och art angett separat för varje djur i försöks- och kontrollgrupperna.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

FLÄCKTEST PÅ MUS

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Fläcktestet är ett *in vivo*-test på mus där musfoster på det embryonala stadiet exponeras för kemiska förbindelser. Målcellerna i fostren är melanoblasterna, och målgenerna är de gener som bestämmer pälshårens pigmentering. Fostren är heterozygota i ett antal av dessa pälsfärger. Vid mutation eller förlust av det dominanta allele i en melanoblaster genom en rad genetiska händelser kommer den recessiva fenotypen till uttryck i de celler som bildas från denna cellstam, vilket medför en annorlunda färgade fläckar i musens päls. Mängden av avkommor med sådana fläckar, dvs. mutationer, registreras och jämförs med motsvarande mängd blandad avkomma av hondjur som har exponerats för lösningsmedlet. Vid fläcktest på mus bestäms förmodade somatiska mutationer i fosterceller.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Testämnet upplöses eller suspenderas i isotonisk saltlösning. Kemiska förbindelser som inte är lösliga i vatten skall lösas eller suspenderas i lämplig vehikel. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter. Nyligen framställda lösningar av testämnet skall användas.

Försöksdjur

Mus av stammen T-stock (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) paras med antingen HT-stock (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, In fz/In fz; pearl pe/pe) eller C57 BL (nonagouti, a/a). Andra lämpliga korsningar såsom NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) och DBA (nonagouti, a/a; brown b/b; dilute, d/d) kan användas under förutsättning att avkomman är nonagouti.

Antal och kön

Tillräckligt många dräktiga hondjur för att producera en passande mängd avkomma för var och en av de använda doserna används. Det antal som är lämpligt kan fastställas på grundval av antalet observerade fläckar hos de exponerade mössen och kontrolldatas storleksordning. Ett negativt resultat är acceptabelt först sedan minst 300 ungar av hondjur som exponerats för den största dosen har undersökts.

Användning av negativa och positiva kontroller

Sidlöpande kontrolldata från möss som endast exponerats för vehikel (negativa kontroller) bör finnas tillgängliga. Kontrolldata från tidigare försök vid samma laboratorium kan räknas med för att höja testets känslighet, under förutsättning att de är homogena. Positiva kontrolldata bör finnas

tillgängliga från försök som nyligen genomförts i samma laboratorium med en kemisk förbindelse som är känd för att visa mutagenicitet vid denna test, om det inte konstateras någon mutagenicitet av testämnet.

Tillförselväg

Normalt tillförs testämnet genom oral intubering eller intraperitoneal injicering i de dräktiga hondjuren. Inhalation och andra tillförselvägar kan vara lämpliga.

Dosnivåer

Minst två dosnivåer används, av vilka den ena skall medföra tecken på toxisk verkan eller minskad kullstorlek. Icke-toxiska ämnen testas genom användning av så höga doser som möjligt.

Förfarande

Vanligen ges försöksdjuren hela dosen på en gång under dräktighetsperiodens dag 8, 9 eller 10, varvid dag 1 räknas som den dag vaginalproppen observeras för första gången. Dessa dagar motsvarar dag 7,25, 8,25 och dag 9,25 efter befruktning. Upprepad behandling kan behövas på dessa dagar.

Analys

Avkomman blindkodas och eventuella pigmenterade fläckar registreras 3-4 veckor efter födseln. Man skiljer på tre typer av fläckar:

a) Vita fläckar inom ett avstånd av 5 mm från den ventrala mittlinjen. Dessa fläckar antas vara ett resultat av celldöd (WMVS).

b) Gula agouti-aktiga fläckar på eller omkring spene, genitalia, strupe, axillär- och inguinalområden, och mitt i pannan. Dessa fläckar antas vara ett resultat av feldifferentiering (MDS).

c) Pigmenterade och vita fläckar slumpmässigt fördelade i pälsen. Dessa fläckar antas vara ett resultat av somatiska mutationer (RS).

Alla tre typer registreras men endast den sistnämnda, RS, är genetiskt relevant. Om det är svårt att skilja mellan MDS och RS kan fluorecensmikroskopi av hårprover användas.

Synliga morfologiska abnormiteter hos avkomman registreras också.

2. DATA

Det totala antalet undersökta ungar och antal ungar med en eller flera fläckar som antas vara ett resultat av somatisk mutation anges. Data från försöksgrupper och negativ kontrollgrupp jämförs med hjälp av lämpliga statistiska metoder. Data anges även per kull.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Korsning av använda stammar.

— Antal dräktiga hondjur i försöks- och kontrollgrupperna.

— Den genomsnittliga kullstorleken i försöks- och kontrollgrupperna vid födseln, och när ungarna är avvanda.

— Dosnivåer.

— Använt lösningsmedel.

— Den dag i dräktighetsperioden då dosering sker.

— Tillförselväg.

— Det totala antal undersökta ungar och antal ungar med WMVS, MDS och RS i försöks- och kontroll-grupperna.

— Makroskopiska morfologiska abnormiteter.

— Förhållandet mellan dos och reaktion för RS när detta är möjligt

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. **Utvärdering och tolkning**

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

TEST AVSEENDE ÄRFTLIG TRANSLOKATION PÅ MUS

1. METOD

1.1. Inledning

Se allmän inledning till del B.

1.2. Definitioner

Se allmän inledning till del B.

1.3. Referensämnen

Inga.

1.4. Testmetodsprincip

Vid test av ärftlig translokation hos mus konstateras strukturella och numeriska kromosomförändringar i däggdjursceller uttryckt i förstagenerationens avkomma. De kromosomförändringar som mäts är reciproka translokationer och, när avkomman även omfattar hondjur, förlust av en X-kromosom. Bärare av translokationer och XO-hondjur har nedsatt fertilitet, vilket utnyttjas vid valet av F_1-avkomma för cytogenetisk analys. Vissa typer av translokationer (X-autosome och c-t-typen) orsakar fullständig sterilitet. Translokationer konstateras cytogenetiskt i meiosens diakinesmetafas hos handjur, som antingen kan vara av F_1-generationen eller söner till F_1-hondjur. XO-hondjur identifieras cytogenetiskt genom att kromosomtalet i benmärgsmitoser endast är 39.

1.5. Kvalitetskriterier

Inga.

1.6. Metodbeskrivning

Förberedelser

Testämnet upplöses i isotonisk sallösning. Ämnen som inte är lösliga i saltlösning skall lösas eller uppslammas i lämplig vehikel. Nyligen framställda lösningar av testämnet skall användas. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter.

Tillförselväg

Vanligen tillförs testämnet genom oral intubering eller intraperitoneal injicering. Även andra tillförselvägar kan användas.

Försöksdjur

Som försöksdjur används mus eftersom det är enklast med hänsyn till uppfödning och cytologisk verifikation. Ingen särskild stam krävs. Om man planerar att testa fertiliteten bör den använda stammens genomsnittliga kullstorlek vara över åtta och relativt konstant. Friska könsmogna djur används.

Antal djur

Det antal djur som behövs beror på den spontana translokationsfrekvensen och den induktionsfrekvens som är nödvändigt för att uppnå ett positivt resultat.

Normalt görs testet genom undersökning av F_1-handjur. Minst 500 F_1-handjur undersöks per dos. Om även kvinnlig F_1-avkomma används undersöks 300 av varje kön.

Användning av negativa och positiva kontroller

Tilllräckliga kontrolldata från sidlöpande och tidigare kontrollförsök skall finnas tillgängliga. Om det finns godtagbara positiva kontrollresultat från tidigare försök vid samma laboratorium kan dessa användas istället för en sidlöpande positiv kontroll.

Dosnivåer

En dos testas, normalt den högsta dosen med minimal toxisk verkan, men utan inflytande på reproduktion eller överlevnad. Om förhållandet mellan dos och reaktion skall bestämmas används ytterligare två lägre doser. Icke-toxiska ämnen testas genom användning av så höga doser som möjligt.

Förfarande

Exponering efter parning

Två olika behandlingsscheman kan användas. I det mest använda schemat ges hela dosen på en gång. Testämnet kan också ges sju dagar i veckan i 35 dagar. Antalet parningar efter exponeringen beror på exponeringsschemat och skall vara tillräckligt stort för att säkerställa att alla exponerade könscellstadier kan undersökas. Efter parningen placeras hondjuren i var sin bur. Vid födseln registreras datumet, kullstorleken och avkommans kön. Alla handjuren bland avkomman avvans och hondjuren avlägsnas såvida de inte inbegrips i försöket

Test av heterozygoti efter translokation

En av två möjliga metoder används:

— Fertilitetsundersökning av F_1-generationen med efterföljande verifikation av eventuella translokationsbärare genom cytologisk analys.

— Cytogenetisk analys av alla F_1-handjur utan föregående urval på grundval av fertilitetsundersökningar.

a) Fertilitetsundersökning

Nedsatt fertilitet hos F_1-generationens medlemmar kan konstateras vid observation av kullstorleken och/eller analys av de parade hondjurens livmoderinnehåll.

Kriterier för bestämning av normal och nedsatt fertilitet måste fastställas innan fläcktestet på mus inleds.

Observation av kullstorlek: De F_1-handjur som skall undersökas placeras i var sin bur tillsammans med hondjur från samma försök eller från bestånden. Från och med den 18:e dagen efter parning iakttas burarna dagligen. Kullstorleken och kön i F_2-generationen registreras vid födseln, varefter kullarna avlägsnas. Om F_1-hondjur testas bevaras de små F_2-kullarna för ytterligare undersökningar. Konstatering av om hondjur är translokationsbärare sker genom cytogenetisk analys av translokation hos någon av deras manliga avkomma. XO-hondjur identifieras genom ändring av förhållandet mellan han- och hondjur i deras avkomma från 1:1 till 1:2. Vid ett sekvensiellt ordnat förfarande elimineras normalt F_1-djur från den vidare undersökningen om storleken av den första F_2-kullen är lika med eller större än ett på förhand fastställt normalvärde. I motsatt fall observeras den andra eller tredje F_2-kullen.

F_1-djur som inte kan klassificeras som normala efter observation av upp till tre F_2-kullar underkastas antingen ytterligare undersökning genom analys av de parade hondjurens livmoderinnehåll eller direkt cytogenetisk analys.

Analys av innehållet i livmodern: Den mindre kullstorleken hos translokationsbärare skylls på att fostren dör på de embryonala stadiet vilket innebär att ett stort antal döda implantat tyder på translokation hos försöksdjuret. De F_1-handhyr som skall undersökas paras vart och ett separat med upp till tre hondjur. Vid daglig undersökning mellan kl 10 och kl 12 på förmiddagen av förekomsten av vaginalpropp, konstateras om befruktning har skett. Hondjuren avlivas 14-16 dagar senare och antalet levande och döda implantat i livmodern registreras.

b) Cytogenetisk analys

Testpreparat framställs genom lufttorkningsteknik. Translokationsbärarna identifieras på grundval av multivalenta konfigurationer i primärar spermatocyters diakines-metafas I. Om det observeras minst två celler med multivalenta konfigurationer anses det bevisat att försöksdjuret är translokationsbärare.

När inget urval görs på grundval av fertilitetsundersökningar undersöks alla F_1-handjur cytogenetiskt. Mikroskopisk undersökning görs av minst 25 diakines-metafaser I per handjur. F_1-handjur med små testiklar och defekt meiose innan diakines, samt F_1-hondjur som förmodas vara XO-bärare, underkastas undersökning av mitotiska metafaser i spermatogoner eller benmärg. Om ovanligt långa och/eller korta kromosomer ovserveras i tio celler anses det bevisat att det är tal om en translokation som gör handjur sterila (c-typen). Vissa X-automsoma translokationer som gör handjur sterila kan endast identifieras genom bandanalys av mitosekromosomer. Om 39 kromosomer observeras i tio mitoser anses det bevisat att det är tal om ett XO-hondjur.

2. DATA

Data ställs upp i tabellform.

Den genomsnittliga kullstorleken och könsfördelningen i föräldragenerationens avkomma vid födseln och vid avvänjning anges för varje parningsperiod.

För bedömning av F_1-djurens fertilitet anges den genomsnittliga kullstorleken efter de normala parningarna och varje enskild kullstorlek efter parning av F_1-translokationsbärare. Efter analys av livmoderinnehåll anges det genomsnittliga antalet levande och döda implantat efter normala parningar och antalet levande och döda implantat efter varje enskild parning av F_1-translokationsbärare.

Efter cytogenetisk analys av diakines-metafaser I anges antalet multivalenta konfigurationer och det totala antalet undersökta celler för varje enskild translokationsbärare.

Det totala antalet parningar och parningsperiodernas längd anges för sterila F_1-djur. Detaljerade upplysningar lämnas om testikelvikt och cytogenetisk analys.

Den genomsnittliga kullstorleken, F_2-avkommans könsfördelning och resultaten av den cytogenetiska analysen anges för XO-hondjur. Om eventuella F_1-translokationsbärare väljs ut vid fertilitetsundersökningar skall tabellerna innehålla upplysningar om hur många av de utvalda djuren som senare visade sig vara heterozygota efter translokation.

Data från negativa och positiva kontrollförsök rapporteras på liknande sätt.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Musstam, djurens ålder, de doserade djurens vikt, antal djur av varje kön i försöks- och kontrollgrupperna i föräldragenerationen.

— Antal föräldradjur av varje kön i försöks- och kontrollgrupperna.

— Försöksbetingelser, detaljerad beskrivning av behandlingen av djuren, dosnivå, lösningsmedel, parningsschema.

— Avkommans antal och kön för varje enskilt hondjur, antal och kön av avkomma som föds upp för translokationsanalys.

— Tidpunkt och kriterier för translokationsanalys.

— Antal translokationsbärare samt detaljerad beskrivning av dessa, inbegripet avlivningsdata och upplysningar om livmoderinnehåll, om sådana finns.

— Cytogenetiska förfaranden och detaljerade upplysningar om den mikroskopiska analysen, helt med bilder.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. Utvärdering och tolkning

Se allmän inledning till del B.

4. HÄNVISNINGAR

Se allmän inledning till del B.

DEL C: METODER FÖR BESTÄMNING AV EKOTOXICITET

ALLMÄN INLEDNING: DEL C

De undersökningsmetoder som beskrivs nedan är metoder för bestämning av vissa av de ekotoxikologiska egenskaper som förtecknas i bilaga 8 till direktiv 79/831/EEG. Anmälaren bör vara uppmärksam på att testet inte omfattar metoder för bestämning av följande egenskaper som omfattas av nivå 1 i bilaga 8:

— Förlängd toxicitetsundersökning med Daphnia magna.

— Test på en högre växt.

— Förlängd toxicitetsundersökning med fisk

— Test med avseende på ackumulering i en art.

När lämpliga testmetoder för bestämning av dessa egenskaper har utvecklats skall de offentliggöras i form av en ytterligare anpassning till den tekniska utvecklingen. Fram till dess skall anmälaren använda passande internationellt erkända metoder som meddelas av den behöriga myndigheten.

TEST AVSEENDE TILLVÄXTHÄMNING HOS ALGER

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna test är att bestämma verkningarna av ett ämnes på encelliga grönalgarters tillväxt. Vid relativt kortvariga tester kan verkningarna över flera generationer utvärderas. Denna metod kan justeras så att den kan användas i samband med flera encelliga algarter varvid en beskrivning av den använda metoden måste anges tillsammans med testrapporten.

Denna metod är enklast att använda för vattenlösliga ämnen som under testbetingelserna sannolikt kommer att förbli i vattnet.

För ämnen vars löslighet i testmediet är begränsad är det kanske inte möjligt att bestämma EC_{50} kvantitativt (se definitionerna nedan).

Metoden kan användas för ämnen som inte har direkt inverkan på mätningen av algtillväxt.

Följande upplysningar kan vara till hjälp när denna test genomförs:

— Löslighet i vatten.

— Ångtryck.

— Strukturformel.

— Ämnets renhetsgrad.

— Kemisk stabilitet i vatten och ljus.

— Metoder för kvantitativ analys av ämnet i vatten.

— pK_a-värde.

— n-oktanol/vatten-fördelningskoefficient.

— Resultaten av ett test för lätt bionedbrytbarhet.

1.2. Definitioner och enheter

Cellkoncentrationen är antalet celler per ml.

Tillväxt är förökningen av cellkoncentrationen under testperioden.

Tillväxttakten är förökningen av cellkoncentrationen per tidsenhet.

I denna metod avses med EC_{50} den testämnekoncentration som medför en 50-procentig reduktion av antingen tillväxten eller tillväxttakten i förhållande till kontrollproven.

I denna metod avses med NOEC (no observed effect concentration) den högsta testkoncentration där de uppmätta koncentrationerna inte visar någon betydande tillväxthämning i förhållande till kontrollvärdet.

1.3. Referensämnen

Ett referensämne kan användas för att påvisa otillfredsställande testbetingelser. Om en referensämne används bör resultaten anges i testrapporten. Som referensämne kan man använda kaliumdikromat.

1.4. Testmetodsprincip

Kulturer av utvalda grönalger med expotentiell tillväxt exponeras för olika koncentrationer av testämnet över flera generationer under väl definierade testbetingelser. Tillväxthämningen i förhållande till en kontrollkultur bestäms under en fastställd period.

1.5. **Kvalitetskriterier**

1.5.1. *Betingelser för testens giltighet*

Cellkoncentrationen i kontrollkulturerna skall ha ökats med en faktor på minst 16 inom tre dagar.

Att testämnet försvinner från vattnet in i biomassan betyder inte nödvändigtvis att testet är ogiltigt.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Förberedelser*

1.6.1.1. Apparatur och material

— Normal laboratorieutrustning.

— Testkolvar av passande volym (250 ml koniska flaskor är t. ex. lämpligt när testämnets volym är 100 ml).

— Odlingsapparatur: ett skåp eller en kammare med en temperatur av 21–25 °C med en tolerans av ± 2 °C och med oavbruten enhetlig belysning i spektralområdet 400–700 nm. (Ett kvantumflöde på 0,72 × 10^{20} fotoner/m^2s med en tolerans av ± 20 % rekommenderas. Detta flöde motsvarar 120 µE/m^2s och kan uppnås med universella fluorescerande vita lampor (ljustemperatur på ca 4 200 K) som avger ca 8 000 lux mätt med en sfärisk kollektor).

— Apparater för bestämning av cellkoncentrationer, t. ex. elektronisk partikelräkning, mikroskop med räkningskammare, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter (OBS: För att erhålla effektiva mätningar av låga cellkoncentrationer genom användning av spektrofotometer kan det vara nödvändigt att använda kyvetter med en lysväg på minst 4 cm).

1.6.1.2. Algmedier

Följande medium rekommenderas:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l,
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l,
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l,
KH_2PO_4:	1,6	mg/l,
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l,
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l,
H_3BO_3:	0,185	mg/l,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l,
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l,
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l,
$NaHCO_3$:	50	mg/l.

Efter ekvilibrering med luft är detta mediums pH ca 8.

Ovanstående rekommendation utesluter inte att andra medier används, förutsatt att följande gränser för huvudbeståndsdelarna iakttas:

P:	≤	0,7 mg/l,
N:	≤	10 mg/l,
Kelater:	≤	10^{-3} mmol/l,
Vattnets hårdhet (Ca + Mg):	≤	0,6 mmol/l.

Det rekommenderade medierna och de medier som anges i hänvisning 1 uppfyller detta krav.

1.6.1.3. Testorganismer

Val av art

Det föreslås att den grönalg som används är en snabbväxande art som är lämplig för odling och test. Följande arter anses lämpliga:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Om andra arter används måste stammen anges.

1.6.1.4. Testets utformning

Initial testkoncentration

Det rekommenderas att den initiala cellkoncentrationen i testkulturerna är ca 10^4 celler/ml för *Selenastrum capricornutum* och *Scenedesmus subspicatus*. Om andra arter används skall biomassan vara jämförbar.

Testämnekoncentrationer

Det testområde där det är sannolikt att verkningar uppstår bestäms på grundval av resultaten av ett förtest. För testet bör minst fem koncentrationer ordnade i en geometrisk serie väljas ut. Den lägsta koncentrationen bör inte ha några synbara verkningar på algens tillväxt. Den högsta koncentration som testas bör hämma tillväxten med minst 50 % i förhållande till kontrollkulturen och helst stoppa tillväxten helt.

Replikater och kontrollkoncentrationer

Testets utformning bör inbegripa helst tre replikater vid varje testkoncentrationsnivå och helst dubbelt så många kontrollkulturer. Om det finns rimliga skäl kan testets utformning ändras så att antalet koncentrationer ökas och antalet replikater per koncentration minskas.

Om vehikel används för att lösa upp testämnet bör testets utformning inbegripa ytterligare kontrollkulturer som innehåller vehikeln i den högsta koncentrationen som används i testkulturerna.

1.6.2. *Förfarande*

Detta avsnitt innehåller riktlinjer för att testa lättupplösliga, svårupplösliga och flyktiga ämnen.

1.6.2.1. Test av ämnen som är lättupplösliga i vatten

De testkulturer som innehåller de önskade testämnekoncentrationerna och den önskade mängden alginokulum framställs genom att förtunna lämpliga mängder stamlösningar av testämnet och algsuspension med filtrerat algmedium.

Odlingskolvarna skakas och placeras i en odlingsapparat. Under testet är det nödvändigt att hålla algerna i suspension och underlätta överföring av CO_2. I detta syfte kan en skakning, omrörning eller luftning användas. Kulturerna hålls vid en temperatur av 21–25 °C med en tolernas av ± 2 °C.

Cellkoncentrationen i varje kolv bestäms minst 24,48 och 72 timmar efter testets inledning. Filtrerat algmedium används för att bestämma bakgrunden när partikelräknare används, eller som blindprov när spektrofotometer används.

pH-värdet mäts i början av testet och efter 72 timmar.

Lösningarnas pH-värde bör normalt inte avvika med mer än en enhet under testet.

1.6.2.2. Test av lösningar med begränsad löslighet i vatten

När testämnets löslighet ungefär motsvarar den högsta koncentration som används i testet är endast en liten avvikelse från ovan nämnda förfarande nödvändig för att tillreda testlösningarna. En mättad lösning kan utgöra testämnets stamlösningar. En annan metod är att upplösa testämnet i den önskade koncentrationen i algmediet innan algsuspensionen tillsätts.

Stamlösningar av ämnen med låg löslighet i vatten kan framställas genom mekanisk dispergering eller med användning av vehikler med låg toxicitet för alger, t. ex. organiska lösningsmedel, emulgatorer eller dispergeringsmedel. Om vehikel används bör koncentrationen inte överstiga 100 mg/l och extra kontrollkulturer, i vilka vehikeln ingår i den högsta koncentration som används i testlösningarna, skall inbegripas i tetets utformning.

1.6.2.3. Test av flyktiga ämnen

Det finns ännu ingen allmänt erkänd metod för test av flyktiga ämnen. Om man vet att ett ämne har en tendens att förångas kan slutna testkolvar med ökat luftutrymme ovanför vätskan användas. Förslag på variationer av denna metod har lagts fram (se hänvisning 1).

Man bör försöka att bestämma den mängd ämne som återstår i lösningar, varvid ytterlig försiktighet bör iakttas vid tolkning av resultaten av tester med flyktiga kemikalier i ett slutet system.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

De uppmätta cellkoncentrationerna i testkulturerna och kontrollkulturerna skall ställas upp i tabellform tillsammans med koncentrationerna av testämnena och tidpunkterna för mätningarna. Medelvärdet av cellkoncentrationen för varje testämnekoncentration och för kontrollkulturerna ritas in mot tiden, så att växtkurvor erhålls.

För bestämning av förhållandet mellan koncentration och verkan bör följande metod användas:

2.1. **Jämförelse av arealer under växtkurvorna**

Arealen under växtkurvorna kan beräknas efter denna formel:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

där:

A = areal
N_0 = nominellt antal celler per ml vid tidpunkten t_0
N_1 = uppmätt antal celler vid tipunkten t_1
N_n = uppmätt antal celler vid tidpunkten t_n
t_1 = tidpunkt för första mätning efter testets inledning
t_n = tidpunkt för n^{de} mätning efter testets inledning.

Den procentuella hämning av celltillväxten för varje testkoncentration (I_A) beräknas som skillnaden mellan arealen under kontrollväxtkurvan (A_c) och arealen under växtkurvan för varje testämnekoncentration (A_t), som

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

I_A-värdena avbildas på semilogaritmiskt papper eller semilogaritmiskt probitpapper mot motsvarande koncentrationer. Om punkterna är ritade på ett probitpapper dras med ögonmått en rät linje mellan dem, eller så dras en beräknad regressionslinje när man kan utgå från att värdena följder den logaritmiska normalfördelningen.

EC_{50}-värde framkommer som en skärningpunkt mellan (regressions) linjen och en linje parallell med x-koordinaten vid I_A = 50 %. Som en entydig beteckning för detta värde föreslås att man i samband med denna beräkningsmetod använder symbolen E_bC_{50}. I samband med denna testmetod, som anger mätningar efter 24, 48 och 72 timmar, blir symbolen E_bC_{50} (0 – 72 h).

Andra EC-värden som t. ex. E_bC_{10} kan också härledas genom avbildning av I_A mot logaritmen till koncentrationen.

2.2. **Jämförelse av tillväxttakt**

Den genomsnittliga specifika tillväxttakten (μ) för kulturer med exponentiell tillväxt kan beräknas som:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Alternativt kan den genomsnittliga specifika tillväxttakten för varje tillväxttakt härledas av regressionslinjens lutning i en avbildning av ln N mot tiden.

Den procentuella reduktionen av den genomsnittliga tillväxttakten för varje testämnekoncentration jämfört med kontrollvärdena avbildas mot logaritmen till koncentrationen. Deras EC_{50} kan avläsas av den därvid framkommande grafen. Som en entydig beteckning för det EC_{50}-värde som beräknas med denna metod föreslås att man använder symbolen E_rC_{50}. Tidpunkterna för mätningarna skall anges. Om t. ex. värdet gäller observationstidpunkterna 24 och 48 timmar blir symbolen E_rC_{50} (24–48 h).

Obs.: Tillväxttakten är en logaritmisk term, och små ändringar i tillväxttakten kan medföra stora ändringar i biomassan. E_bC och E_rC är därför inte numeriskt jämförbara värden.

3. RAPPORTERING

3.1. **Testrapport**

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Testämne: Data för kemisk identifiering.

— Testorganismer: Härkomst, laboratoriekultur, stammnummer, odlingsmetod.

— Testbetingelser:

  — Datum för inledning och avslutning av testet samt testets varaktighet.

  — Temperatur.

  — Mediets sammansättning.

— Odlingsapparat.

— pH-värde av lösningar vid början och slutet av testet (om pH-värdet avviker med mer än en enhet måste orsaker till detta anges).

— Använd vehikel och metod för lösning av testämnet samt vehikelns koncentration i testlösningen.

— Ljusintensitet och kvalitet.

— Testade koncentrationer (uppmätta eller nominella).

— Resultat:

— Cellkoncentration för varje kolv vid varje mättidpunkt och metod för mätning av cellkoncentration.

— Genomsnittligt värde av cellkoncentrationer.

— Tillväxtkurvor.

— Grafisk framställning av förhållandet mellan koncentration och verkan.

— EC-värde och beräkningsmetod.

— NOEC.

— Andra observerade verkningar.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guidelines 201*, rådets beslut C(81) 30 slutlig.

2. Umweltsbundesamt, Berling, 1984, Verfahrensvorschalg "Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*", i: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Tillägg

EXEMPEL PÅ EN METOD FÖR ODLING AV ALGER

Allmänna kommentarer

Syftet med odling på grundval av nedanstående metoder är att framställa algkulturer för toxicitetstest.

Lämpliga metoder används för att säkerställa att algkulturerna inte infekteras med bakterier (ISO 4833). Axeniska kulturer kan under vissa omständigheter vara önskvärda men det är väsentligt att kulturerna uteslutande består av alger.

Alla operationer skall företas under sterila förhållanden för att undvika förorening med bakterier eller med andra alger.

Utrustning och material

Se punkt 1.6.1: Förberedelser och testorganismer.

Metoder för framställning av algkulturer

Framställning av näringslösningar (medier)

Alla mediers näringssalt framställs som koncentrerade stamlösningar och förvaras mörkt och kallt. Dessa lösningar steriliseras genom filtrering eller autoklavering.

Mediet framställs genom att tillsätta en korrekt mängd stamlösning till sterilt destillerat vatten, varvid man ser till att ingen infektion sker. För att få ett fast medium tillsätts 0,8 % agar.

Stamkultur

Stamkulturerna är små algkulturer som regelbundet överförs till ett friskt medium och som används som utgångstestmaterial. Om kulturerna inte används regelbundet stryks de ut på böjda agarrör. De överförs till ett färskt medium minst var annan månad.

Stamkulturerna odlas i koniska kolvar med det lämpliga mediet (volymen ca 100 ml). När algerna inkuberas vid 20 °C i konstant ljus krävs veckovis överföring.

Under överföringen avsätts en viss mängd "gammal" kultur med sterila pipetter i en kolv med färskt medium så att initialkoncentrationen i fråga om de snabbväxande arterna är ca 100 gånger mindre än i den gamla kulturen.

En arts tillväxttakt kan bestämmas utifrån tillväxtkurvan. Om denna är känd är det möjligt att se vid vilken täthet kulturen skall överföras till det nya mediet. Detta måste göras innan kulturen når dödsfasen.

Förkultur

Avsikten med förkulturen är att få en mängd alger som är lämpliga för inokulering av testkulturer. Förkulturen inkuberas under testbetingelser och används medan den fortfarande växer exponentiellt, normalt efter en inkubationsperiod på omkring tre dagar. Om algkulturerna innehåller missbildade eller abnorma celler skall de slängas.

TOXICITET HOS DAGGMASKAR

TEST I SYNTETISK JORD

1. METOD

1.1. Inledning

Vid detta laboratorietest tillsätts testämnet till syntetisk jord i vilken daggmaskar placeras i 14 dagar. Efter denna period (alternativt efter sju dagar) undersöks ämnetd dödliga verkan på daggmaskarna. Detta test är en metod för att under en relativt kort tid undersöka kemikaliers verkan på daggmaskar vid upptagning genom huden eller via fodret.

1.2. Definitioner och enheter

LC_{50}: Koncentrationen av ett ämne som kan förväntas orsaka att 50 % av försöksdjuren dör under testperioden.

1.3. Referensämne

En referensämne används regelbundet för att visa att testsystemets känslighet inte har ändrats signifikant.

Som referensämne rekommenderas analytiskt rent kloracetamid.

1.4. Testmetodsprincip

Eftersom jord är ett variabelt medium används en noggrant definierad syntetisk lerjord för detta test. Vuxna daggmaskar av arten *Eisenia foetida* (se anmärkningen i tillägget) hålls i en definierad syntetisk jord som behandlats med olika koncentrationer av testämnet. Behållarnas innehåll sprids ut på en bricka 14 dagar (alternativt sju dagar) efter inledningen av testet och det antal daggmaskar som överlever vid varje koncentration räknas.

1.5. Kvalitetskriterier

Testet är beräknat att vara så reproducerbart som möjligt med hänsyn till testsubstrat och organism. Om dödligheten hos kontrolldjuren överstiger 10 % vid testets avslutning är testet ogiltigt.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Material*

1.6.1.1. Testsubstrat

Väldefinierad syntetisk jord används som bassubstrat.

a) Bassubstrat (viktprocent torrämne)

— 10 % sphagnum (så nära pH-värde 5,5–6 som möjligt utan synliga plantrester och finfördelat).

— 20 % kaolinhaltig lera, helst med över 50 % kaolinit.

— Cirka 69 % industriell kvartssand (övervägande finsand med över 50 % med en partikelstorlek av 0,05–0,2 mm). Om testämnet inte är tillräckligt lätt uppslammad i vatten sätts 10 g per testbehållare åt sidan för senare blandning med testämnet.

— Cirka 1 % kalciumkarbonat ($CaCO_3$), pulvriserat, kemiskt rent, tillsatt för att få ett pH-värde av 6,0 ± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består av bassubstrat, testämne och avjoniserat vatten.

Vatteninnehållet motsvarar ca 25–42 viktprocent av bassubstratets torrvikt. Substratets vatteninnehåll bestäms genom torkning av ett prov till konstant vikt vid 105 °C. Ett viktigt kriterium är att den syntetiska jorden har fuktats så mycket det går, men det får inte finnas något stående vatten. Blandningen sker omedelbart så att det blir en jämn fördelning av testämnet och substratet. Den metod som används för att tillsätta testämnet till substratet skall rapporteras.

c) Kontrollsubstrat

Kontrollsubstratet består av bassubstrat, testämne och avjoniserat vatten. Om en tillsättningsämne används skall ett extra kontrollsubstrat innehålla samma mängd tillsättningsämne.

1.6.1.2. Testbehållare

Glasbehållare med ett omfång av ca 1 liter (korrekt täckta med plastlock, plattor eller plastfolie med ventilationshål) fyllda med en mängd våt test- eller kontrollsubstrat motsvarande 500 g av substratets torrvikt.

1.6.2. *Testbetingelser*

Behållarna förvaras i klimatkammare vid en temperatur av 20 °C med en tolerans av ± 2 °C och i konstant ljus. Ljusintensiteten bör vara 400–800 lux.

Testperioden varar i 14 dagar, men dödligheten kan eventuellt bedömas sju dagar efter testets inledning.

1.6.3. *Förfarande*

Testkoncentrationer

Testämnets koncentrationer uttrycks som ämnets vikt i förhållande till grundsubstratets torrsvikt (mg/kg).

Förtest

Det koncentrationsområde som orsakar 0–100 % dödlighet kan bestämmas genom ett förtest för att få information om vidden av koncentrationer som skall användas vid det definitiva testet.

Ämnet bör testas i följande koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 och 0,1 mg/ämne/kg testsubstrat (torrvikt).

Om en fullständig definitiv test skall göras räcker det att för förtestet använda en uppsättning per koncentration och en för den obehandlade kontrollen med vardera tio daggmaskar.

Definitivt test

Resultaten av förtestet används för att välja minst fem koncentrationer i en geometrisk serie som täcker 0–100 % dödlighet och där den konstanta faktorn inte får överstiga 1,8.

Vid test med dessa koncentrationer bör det vara möjligt att med största möjliga exakthet bedöma LC_{50}-värdet och dess konfidensgränser.

Vid det definitiva testet används minst fyra testgrupper per koncentration och fyra obehandlade kontrollgrupper med vardera tio daggmaskar. Resultaten av dessa parallellgrupper anges som ett medelvärde och en standardavvikelse.

Om två på varandra följande koncentrationer, med ett förhållande av 1,8, endast ger 0 och 100 % dödlighet är dessa två värden tillräckliga för att ange LC_{50}-intervallet.

Blandning av bassubstratet och testämnet

Testämnet bereds, när så är möjligt, utan tillsättning av annat än vatten. Omdelbart före inledningen av testet blandas en emulsion eller dispersion av tesämnet i avjoniserat vatten eller annat lösningsmedel med bassubstratet eller sprayas ut jämnt över detta med en fin kromatografispruta eller liknande.

Om testämnet inte går att lösa i vatten kan det lösas i minsta möjliga mängd av ett passande organiskt lösningsmedel (t. ex. hexan, aceton eller kloroform).

Endast medel som inte går att lösa i vatten för användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testämnet. Testsubstratet luftas innan användning. Den förångade vattenmängden ersätts. Kontrollsubstratet får innehålla eventuella tillsättningsämnen i samma mängd.

Om det inte går att lösa, dispergera eller emulgera testämnet i organiska lösningsmedel blandas en blandning av finsand av malen kvarts och den kvantitet av testämnet som är nödvändig för att behandla 500 g torrvikt av syntetisk jord med 490 g torrvikt av testämnet.

För varje testgrupp placeras en mängd våt testsubstrat motsvarande 500 g torrvikt i varje glasbehållare och tio daggmaskar, som under 24 timmar har invänjts i ett liknande vått bassubstrat och därefter snabbt sköljts av och avdroppats på filterpapper innan användning, placeras på testsubstratets yta.

Behållarna täcks med perforerade plastlock, plattor eller plastfolie för att förhindra att substratet torkar, och de förvaras under testbetingelse i 14 dagar.

Utvärderingen sker 14 dagar (alternativt sju dagar) efter testets inledning. Substratet sprids ut på en platta av glas eller rostfritt stål. Daggmaskarna undersöks och antalet överlevande daggmaskar fastställs. Daggmaskar anses vara döda om de inte reagerar på en lätt mekanisk påverkan av framänden.

När undersökningen sker efter sju dagar hälls substratet tillbaka i behållaren och överlevande daggmaskar läggs tillbaka på testsubstratets yta.

1.6.4. *Testorganismer*

Testorganismerna bör vara daggmaskar av arten *Eisenia foetida* (se anmärkningen i tillägget) (minst två månader gamla med clitellum) och väga (vått tillstånd) 300–600 mg. (För uppfödning se tillägget).

2. DATA

2.1. Behandling och utvärdering av data

De använda koncentrationerna av testämnet rapporteras med angivelse av den procentuella dödligheten för varje koncentration.

När erhållna data inte är tillräckliga kan LC_{50} och dess konfidensgränser (p = 0,05) bestämmas genom användning av standardmetoder (Lichtfield and Wilcoxon, 1949, eller motsvarande metod). Lc_{50} anges som mg testämne per kg testsubstrat (torrvikt)

Om koncentrationskurvans böjning vid ett förhållande av 1,8 endast ger 0 och 100 % dödlighet är dessa två värden tillräckliga för att ange LC_{50}-intervallet.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla:

— Angivelse av att testet utförts i överensstämmelse med ovanstående kvalitetskriterier.

— Angivelse av det genomförda testet (förtest och/eller definitivt test).

— Noggrann beskrivning av testbetingelserna eller angivelse av att testet utförts i överensstämmelse med metoden. Eventuella avvikelser skall rapporteras.

— Noggrann beskrivning av hur testämnet blandats i bassubstratet.

— Uppgifter om testorganismer (art, ålder, medelvikt samt lägsta och högsta vikt, betingelserna för uppfödning och hållning samt leverantör).

— Använd metod för bestämning av LC_{50}.

— Testresultaten, inbegripet alla använda data.

— Beskrivning av observerade symptom eller beteendeförändringar hos testorganismerna.

— Dödlighet i kontrollgrupperna.

— LC_{50} eller högsta testkoncentration utan dödlighet och lägsta testkoncentration med en dödlighet av 100 % 14 dagar (alternativt sju dagar) efter testets inledning.

— Ritning av koncentrations/reaktionskurvan.

— Resultat som erhållits med referensämnet antingen i samband med det ifrågavarande testet eller vid tidigare kvalitetskontrollundersökningar.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, rådets beslut C(81) 30 slutlig.

2. Edwards, C. A. och Lofty, 1977. *Biology of Earthworms*. London: Chapman and Hall, s.331.

3. Bouche, M. B., 1972. *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, s. 671.

4. Litchfield, J. T. och Wilcoxon J., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Esp. Therap.*, vol. 96, s. 99-113.

5. Europeiska gemenskapernas kommission, *Development of a standard laboratory method for assaying the toxicity of chemical substances to earthworms*. Rapport EUR 8714 EN.

6. Umweltsbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- unde Forstwirtschaft, Berling, 1984, Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden, i: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Tillägg

Uppfödning och hållning av daggmaskar före test

Vid uppfödning av djuren placeras 30--50 vuxna daggmaskar i en avelsbur med färsk substrat och avlägsnas efter 14 dagar. Dessa djur kan användas för uppfödning av senare grupper. De daggmaskar som kläcks ur kokongerna används för test när de är könsmogna (under föreskrivna villkor efter 2–3 månader).

Förhållanden för hållning och uppfödning

Klimatkammare:	Temperatur 20 °C med en tolerans av ± 2 °C, helst med konstant belysning (ljusintensitet 400–800 lux).
Avelsburar:	Lämpliga låga burar med en volym av 10–20 l.
Substrat:	*Eisennia foetida* kan födas upp i olika djurexkrement. Som uppfödningsmedium rekommenderas en blandning av lika delar av torv och ko- eller hästgödsel. Substratet bör ha ett pH-värde av 6–7 (reglerat med kalciumkarbonat) och låg jonledningsförmåga (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration).
	Substratet bör vara fuktigt men inte för vått.
	Andra lämpliga metoder utöver ovan nämnda kan användas.

Anmärkning: Det finns två raser av *Eisenia foetida* som vissa systematiker har klassificerat som arter (Bouche, 1972). De är morfologiskt liknande men den ena, *Eisenia foetida foetida* har typiskt tvärgående ränder på segmenten medan den andra, *Eisenia foetida andrei*, saknar dessa, och har en rödbrokig färg. Så långt det går bör *Eisenia foetida andrei* användas. Andra arter kan användas om den nödvändiga metodiken finns tillgänglig.

BIOLOGISK NEDBRYTBARHET

ZAHN-WELLENS TEST

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos vattenlösliga, icke flyktiga organiska föreningar när de utsätts relativt höga koncentrationer av mikroorganismer under ett statiskt test.

Fysikaliska-kemiska reaktioner kan förekomma på de uppslammade artiklarna vilket man måste ta hänsyn till vid tolkning av resultaten. (se 3.2).

De ämnen som skall undersökas används i koncentrationer motsvarande DOC-värden av 50–400 mg/l (DOC = dissolved organic carbon, dvs. upplöst organiskt kol), eller COD-värden motsvarande 100–1 000 mg/l (COD = chemical oxygen demand, dvs. kemiskt syrebehov). Fördelen med dessa relativt höga koncentrationer är att de är pålitliga ur analyshänseende.

Vid denna metod mäts koncentrationer av upplöst organiskt kol eller det kemiska syrebehovet i syfte att bedöma testämnets fullständiga bionedbrytbarhet.

Samtidig användning av en specifik analysmetod kan möjliggöra värdering av ämnets primära bionedbrytbarhet (dvs. försvinnandet av den ursprungliga kemiska förbindelsen).

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den använda testkoncentrationen

— är vattenlösliga inom ramen för testbetingelserna

— har försumbart ångtryck inom ramen för testbetingelserna,

— inte hämmar bakterier,

— endast absorberas i testsystemet i begränsad omfattning

— inte försvinner från testlösningen till följd av skumning.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.2. Definitioner och enheter

Nedbrytningen vid testets avslutning definieras som "bionedbrytbarhet i Zahn-Wellens test":

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

där:

D_T = Bionedbrytning i procent DOC som avgått vid tid T.

C_A = DOC (eller COD)-värdena i försöksblandningen, mätt tre timmar efter inledning av testet (mg/l).
(DOC = dissolved organic carbon/upplöst organiskt kol, COD = chemical oxygen demand/ kemiskt syrebehov.)

C_T = DOC- eller COD-värdena i försöksblandningen vid tidpunkten för provtagningen (mg/l).

C_B = DOC- eller COD-värdena i blindprovet vid tidpunkten för provtagningen (mg/l).

C_{BA} = DOC- eller COD-värdena i blindprovet, mätt tre timmar efter inledning av testet (mg/l).

Nedbrytningsgraden avrundas till närmaste hela procenttal.

Den procentuella nedbrytningen anges som den procent DOC (eller COD) som försvunnit från testämnet.

Skillnaden mellan det värde som mätts efter tre timmmar och det beräknade, helst uppmätta, initiala värdet kan ge nyttiga information om ämnets eliminiering (se 3.2: "Tolkning av resultat").

1.3. **Referensämnen**

När ett nytt ämne skall undersökas kan referensämnen i vissa fall vara användbara. Det går dock ännu inte att rekommendera bestämda referensämnen.

1.4. **Testmetodsprincip**

Aktiverat slam, oorganiska näringsämnen och testämnet, som är den enda kolämnekällan i vattenlösning, placeras i en glasbehållare med en volym av 1–4 liter, som är försedd med omrörning och luftning. Blandningen rörs och luftas vid 20–25 °C i indirekt ljus eller i mörker i upp till 28 dagar. Nedbrytningen följs genom mätning av DOC- (eller COD-) värden i den filtrerade lösningen en gång om dagen eller regelbundet med en annan lämplig tidsintervall. Förhållandet mellan eliminerat DOC- (eller COD) efter varje tidsintervall och värden tre timmar efter testets inledning yttrycks som procentuell bionedbrytning och är ett värde för nedbrytningsgraden vid denna tidpunkt.

Om en specifik analysmetod används kan ändringar av det ursprungliga ämnets koncentration till följd av bionedbrytning mätas (primär bionedbrytning).

1.5. **Kvalitetskriterier**

Metodens reproducerbarhet har fastställts genom ett ringtest.

Metodens känslighet beror till största delen på variationer i blindprovet och till mindre del på noggrannheten vid bestämning av upplöst organiskt kol och testämnekoncentration i vätskan.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Förberedelser*

1.6.1.1. Reagenser

Testvatten: Dricksvatten innehållande mindre än 5 mg organiskt kol per liter. Koncentrationen av kalcium- och magnesiumjoner får tillsammans inte överstiga 2,7 mmol per liter. I motsatt fall måste den förtunnas på passande sätt med avjoniserat eller destillerat vatten.

Svavelsyra, analytisk reagens (AR.):	50 g/l.
Natriumhydroxidlösning, AR.:	40 g/l.
Lösning av oorganiska näringsämnen: i 1 liter avjoniserat vatten löses	
ammoniumklorid, NH_4Cl, AR:	38,40 g,
natriumdihydrogenfosfat, $NaH_2PO_4 . 2H_2O$, AR:	33,40 g,
kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4, AR:	8,50 g,
dikaliumhydrogenfosfat, K_2HPO_4, AR:	21,75 g.

1.6.1.2. Apparatur

Glasbehållare med en volym av 1–4 liter (t. ex. cynlindrisk behållare).

Omrörare med rörhuvud av glas eller metall på en passande axel (omröraren bör rotera 5–10 cm över behållarens botten). Som ett alternativ kan en magnetomrörare med en 7–10 cm lång magnetstav användas.

Glasrör med en invändig diameter av 2–4 mm för luftning. Rörets öppning bör ligga ca 1 cm ovanför behållarens botten.

Centrifug (ca 3 550 g).

pH-mätare.

Apparat för mätning av upplöst syre.

Pappersfilter.

Membranfiltreringsapparat.

Membranfilter med en porstorlek av 0,45 µm. Membranfilter är endast lämpligt om det har säkerställts att de varken avger kolämne eller absorberar ämnet under filtreringen.

Analysapparatur för bestämning av innehållet av organiskt kol och den kemiska syrebehovet.

1.6.1.3. Förberedelse av inokulat

Aktiverat slam från ett biologiskt reningsverk tvättas (flera gånger) med testvatten (se ovan) genom centrifugering eller dekantering.

Det aktiverade slammet skall vara i ett lämpligt tillstånd. Sådant slam kan fås från ett väl fungerande reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten. För att få så många olika bakteriestammar som möjligt kan det vara bättre att blanda inokulat från olika källor (t. ex. från olika reningsverk, från jord, från flodvatten, etc.).

De aktiverade slammets livskraft kontrolleras, se. "lämplighetskontroll".

1.6.1.4. Framställning av testlösningarna

I testbehållarna placeras 500 ml vatten, 2,5 ml lösning av oorganiska näringsämnen per liter samt en mängd aktiverat slam som motsvarar 0,2–1,0 g torrämne per liter färdig blandning. Tillsätt tillräckligt med stamlösning av testämnet så att den färdiga blandningen får en DOC-koncentration av 50–400 mg/l. Motsvarande COD-intervall är 100 –1 000 mg/l. Fyll upp med testvatten till en total volym av 1–4 liter. Den totala volym som väljs beror på det antal prover som skall tas för DOC- eller COD-bestämning, och den nödvändiga analysvolymen.

Normalt kan en volym av 2 l anses tillräcklig. Minst en kontrollbehållare (blindprov) skall göras i ordning samtidigt med varje testserie. Den innehåller endast aktiverat slam och lösning av oorganiska näringsämnen utspätt med vatten till samma totalvolym som i testbehållarna.

1.6.2. *Testförfarande*

Testbehållarna omrörs med magnetomrörare eller propelleromrörare i indirekt belysning eller i mörker vid 20 — 25 °C- Luftning sker med komprimerad luft som om nödvändigt rensas med ett vaddfilter och en tvättflaska. Man måste se till att slammet inte sätter sig och att syrekoncentrationen inte sjunker under 2 mg/l.

pH-värdet måste kontrolleras regelbundet (t. ex. dagligen) och vid behov justeras till pH 7–8.

Strax före provtagning kompenseras vattenförlust på grund av förångning genom tillsättning av avjoniserat eller destillerat vatten. Man kan t. ex. märka vätskehöjden i behållaren innan testet inleds. Nya markeringar ritas dit efter varje provtagning (utan luftning och omrörning). De första proverna tas alltid tre timmar efter testets inledning så att man kan konstatera om testmaterialet absorberas på det aktiverade slammet.

Elimineringen av testämnet följs genom DOC- eller COD-bestämningar antingen dagligen eller regelbundet med andra intervaller. Proverna från testbehållaren och blindprovet filtreras genom ett noggrant tvättat pappersfilter. De första 5 ml av filtratet kasseras. Slam som är svårt att filtrera kan avlägsnas först genom centrifugering i tio minuter. Minst dubbla bestämningar av DOC och COD skall göras. Testet varar i upp till 28 dagar.

Obs! Prover som stadigt är grumliga filtreras genom ett membranfilter. Membranfiltren får varken frigöra eller absorbera organiska material.

Funktionskontroll av aktiverat slam

I varje testserie bör det ingå en behållare som innehåller ett känt ämne så att man kan kontrollera funktionen av det aktiverade slammet. I detta syfte är dietynglykol lämpligt.

Adaption

Om analyser utförs med relativt korta mellanrum (t. ex. dagligen) kommer adaption att framgå tydligt av nedbrytningskurvan (se figur 2). Testet bör därför inte inledas omedelbart före helgen.

Om adaption förekommer i slutet av testet kan testet förlängas tills nedbrytningen är avslutad.

Obs! Om det finns behov av att veta mer om det adapterade slammets beteende utsätts samma aktiverade slam ytterligare en gång för samma testmaterial enligt följande förfarande:

Stäng av omröraren och luftaren och låt det aktiverade slammet sätta sig. Avlägsna överstående vätska, fyll på upp till 2 liter med testvatten och rör om i 15 minuter och låt sedan blandningen sätta sig igen. Sedan överstående vätska avlägsnats används det överblivande slammet för att upprepa testet i enlighet med 1.6.1.4 och 1.6.2 ovan. Det aktiverade slammet kan även isoleras genom centrifugering istället för utfällning.

Det adapterade slammet kan blandas med färskt slam till en koncentration av 0,2–1,0 g torrvikt/l.

Analys

Normalt filtreras prover genom ett noggrant tvättat pappersfilter (för tvättning används avjoniserat vatten).

Prover som stadigt är oklara filtreras genom ett membranfilter (0,45 µm).

En dubbelbestämning av DOC-koncentrationen i provfiltraten görs (de första 5 ml kasseras) med TOC-instrument. Om filtratet inte kan analyseras samma dag skall det förvaras i kylskåp till nästa dag. Längre tids förvaring rekommenderas inte.

COD-koncentrationen bestäms i provfiltraten med COD-koncentrationsutrustning i enlighet med det förfarande som beskrivs i hänvisning 2 nedan.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Minst dubbelbestämning av DOC- och COD-koncentrationerna i proverna görs i enlighet med 1.6.2. Nedbrytbarheten vid tidpunkten T beräknas med hjälp av den formel (med definitioner) som anges i 1.2.

Nedbrytningsgraden beräknas till närmaste hela procenttal. De nedbrytning som erhålls vid slutet av testet anges som "bionedbrytbarheten vid Zahn-Wellens test".

Obs! Om fullständig nedbrytning inte uppnås innan testperioden är slut och detta resultat bekräftas genom en ytterligare analys följande dag kan testet avslutas.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla minst följande:

— Testämnets initiala koncentration.

— Alla andra upplysningar och försöksresultat i fråga om testämnet, en eventuell referensämne och blindförsöket.

— Koncentrationen efter tre timmar.

— Kurva över bionedbrytningen med förklaring.

— När och var provorganismerna är tagna, adaptionsgrad, använd koncentration, etc.

— Vetenskapliga motiveringar för eventuella ändringar av testförfarandet.

3.2. Tolkning av resultat

Den förlust av DOC (COD) som sker gradvis över dagar eller veckor är ett tecken på bionedbrytbarhet hos testämnet.

Fysikalisk-kemisk absorption kan dock i vissa fall spela en viss roll och ett tecken på detta är att före de första tre timmarna sker fullständig eller delvis förlust och att skillnaden mellan överstående vätska från kontroll- och testproverna förblir på en oväntat låg nivå.

Det är nödvändigt att göra ytterligare tester om man skall kunna skilja på bionedbrytning (eller delvis bionedbrytning) och absorption.

Detta kan göras på flera olika sätt, men det mest övertygande är att använda överstående vätska som inokulum i en bassettest (helst ett respirometriskt test).

Testämnen som visar en hög förlust av DOC (COD), som inte beror på absorption, vid denna test bör betraktas som potentiellt bionedbrytbara. Delvis förlust som inte beror på absorption, betyder att kemikalien i varje fall i en viss omfattning bryts ned biologiskt.

Låg eller ingen förlust av DOC (COD) kan bero på att testämnet hämmar mikroorganismerna. Detta kan med tiden också visa sig genom att slammet upplöses och försvinner, varvid överstående vätska blir grumlig. Testet bör upprepas med en lägre koncentration testämne.

Användning av ett ämnesspecifik analysmetod eller ^{14}C-markerat testämne kan ge större känslighet. Om ^{14}C-markerat testämne används kommer återhämtning av $^{14}CO_2$ bekräfta att det rör sig om bionedbrytbarhet.

Om resultaten anges som primär bionedbrytbarhet bör det om möjligt anges en förklaring på den kemiska strukturförändringen som leder till avsaknaden av analysresultat för det ursprungliga testämnet.

Valet av analysmetoder skall motiveras och analysresultaten för blindproven skall anges.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* rådets beslut C(81) 30 slutlig.

2. Bilaga V C.9 Nedbrytning – kemiskt syrebehov. Kommissionens direktiv 84/449/EEG, *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*, nr L 251 av den 19.9.1984.

Tillägg

EXEMPEL PÅ UTVÄRDERING

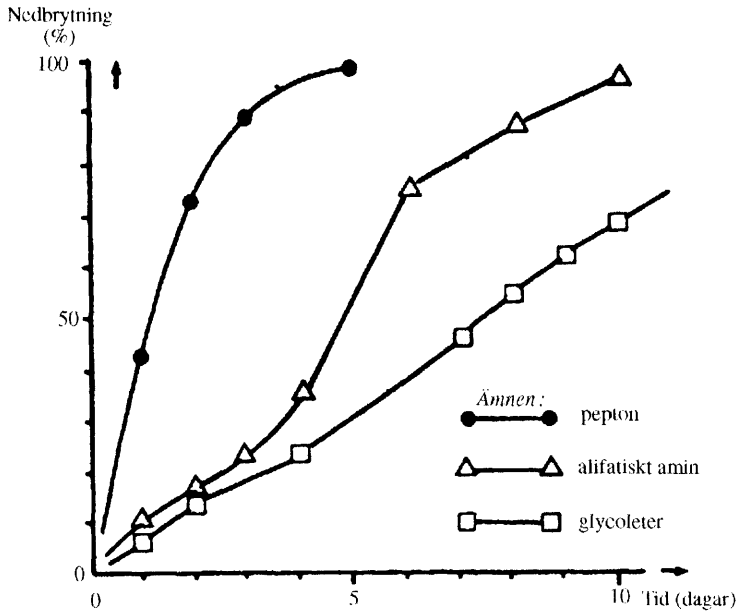
Organisk förbindelse:	4-etoxybenzoesyra
Teoretis testkoncentration:	600 mg/l
Teoretisk DOC:	390 mg/l
Inoculat:	Reningsverk.....
Koncentration:	1 g torrämne per liter
Enventuell adaption:	inte adapterat
Analys:	DOC-bestämning
Testmängd:	3 ml
Kontrollämne:	Dietylenglykol
Ämnets toxicitet:	Ingen toxicitet under 1 000 mg/l Använt test: fermenteringsglastest

Tidpunkt	Kontrollämne				Testämne		
	Blindprov DOC(1) (mg/l)	DOC(1) (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Nedbrytning (%)	DOC(1) (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Nedbrytning (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 timmar	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dagar	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dagar	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dagar	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dagar	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dagar	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dagar	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dagar	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Medelvärde av tre bestämningar.

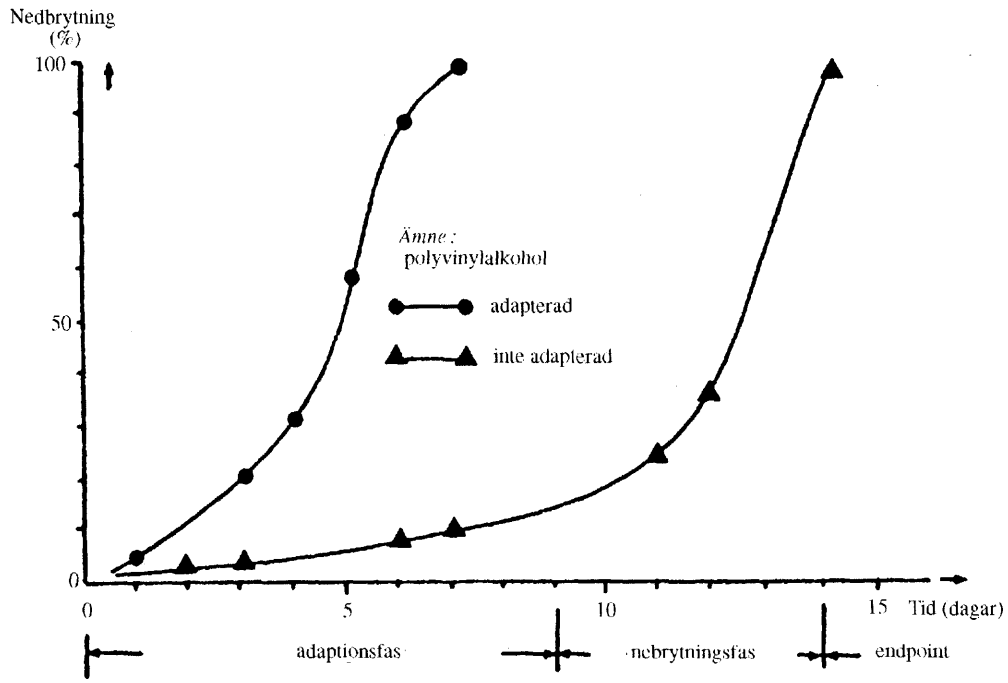
Figur 1

Exempel på kurvor över bionedbrytning



Figur 2

Exempel på slamadaption



BIOLOGISK NEDBRYTBARHET

AKTIVERAT SLAM — SIMULATIONSTEST

1. METOD

1.1. Inledning

1.1.1. *Allmänna kommentarer*

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den använda testkoncentrationen

— är vattenlösliga i den omfattning som krävs för att tillreda testlösningarna,

— har försumbart ångtryck inom ramen för testbetingelserna,

— inte hämmar bakterier.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.1.2. *Bestämning av fullständig bionedbrytbarhet (DOC/COD-analys)*

Syftet med metoden är att bestämma den fullständiga bionedbrytbarheten vid mätning av avlägsnande av ämnet och eventuella metaboliter i en aktivslamanläggningsmodel vid en koncentration motsvarande 12 mg/l (eller ca 40 mg COD/l). 20 mg DOC/l verkar vara optimalt. (DOC = dissolved organic carbon, dvs. upplöst organiskt kol, COD = chemical oxygen demand, dvs. kemiskt syrebehov.)

Testämnets innehåll av organiskt kol (eller dess kemiska syrebehov) skall fastställas.

1.1.3. *Bestämning av primär bionedbrytbarhet (specifik analys)*

Syftet med metoden är att bestämma den primära bionedbrytbarheten vid mätning av avlägsnandet av ämnet vid en koncentration av ca 20 mg/l genom användning av en specifik analysmetod (lägre eller högre koncentration kan användas om analysmetoden och hänsyn till toxicitet tillåter detta). Detta möjliggör värdering av subtansens primära bionedbrytbarhet (dvs. försvinnandet av den ursprungliga kemiska förbindelsern).

Syftet med denna metod är *inte* att bestämma testämnets mineralisering.

En passande analysmetod för bestämning av testämnet måste föreligga.

1.2. Definitioner och enheter

1.2.1. *DOC/COD-analys*

Nedbrytningen definieras som den del av testämnet som avlägsnas och beräknas enligt följande formel:

$$DR = \frac{T - (E - E_O)}{T} \times 100\ \% \qquad [1(a)]$$

där:

DR = procent DOC (eller COD) som avlägsnats inom den givna medeluppehållstiden med hänsyn till testämnet.

T = testämnekoncentrationen i inflödet i mg DOC/l (eller mg COD/l).

E = DOC- (eller COD-)koncentrationen i testenhetens utflöde i mg DOC/l /eller mg COD/l).

E_O = DOC- (eller COD-)koncentrationen i blindprovenhetens utflöde i mg DOC/l /eller mg COD/l).

Nedbrytningen anges som den procent DOC (eller COD) som försvunnit under en given retentionstid i fråga om testämnet.

1.2.2. *Specifik analys*

Den procentdel testämne som elimineras från vattenfasen (R_W) inom den givna medeluppehållstiden, beräknas enligt följande formel:

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

där:

C_1 = Ämnekoncentrationen i testenhetens inflöde (mg ämne/l, bestämd genom specifik analys).
C_0 = Ämnekoncentrationen i testenhetens utflöde (mg ämne/l, bestämd genom specifik analys).

1.3. **Referensämnen**

När ett nytt ämne skall undersökas kan referensämnen i vissa fall vara användbara. Det går dock ännu inte att rekommendera bestämda referensämnen.

1.4. **Testmetodsprincip**

Vid bestämning av den slutliga bionedbrytbarheten används parallellt med med aktiverat slam pilotenheter (OECD confirmatory testenheter eller porous potenheter). Testämnet tillförs till den ena enhetens inflöde (syntetiskt spillvatten eller spillvatten från hushåll) medan den andra enheten endas tillförs spillvatten. Vid bestämning av primär bionedbrytning med specifik analys i inflödet och utflödet används endast en enhet.

DOC- koncentrationer (eller COD-koncentrationer) mäts i utflödena eller så bestäms ämneskoncentrationen genom specifik analys.

DOC som beror på testämnet mäts inte utan anges enbart.

Vid DOC-mätningar (eller COD-mätningar) antas skillnaden mellan test- och kontrollutflödenas genomsnittskoncentrationer bero på onedbrutet testämne.

Om en specifik analysmetod används kan ändringen av stamförbindelsens koncentration mätas (primär bionedbrytning).

Enheterna kan användas enligt "kopplingsmetoden" genom transinokulering.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Den initiala koncentrationen är avhängig den typ av analys som företas och dess begränsningar.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Förberedelser*

1.6.1.1. Apparatur

Förutom när det rör sig om specifika analyser krävs det två modelltyper av samma slag. Två slags modelltyper kan användas:

OECD confirmatory test

Utrustningen (tillägg 1) består av ett lagringskärl (A) för syntetiskt spillvatten, doseringspump (B), luftningskärl (C), sedimenteringskärl (D), luftpump (E) för återföring av det aktiva slammet samt kärl (F) för uppsamling av det behandlade spillvattnet.

Kärlen (A) och (F) måste vara av glas eller lämplig plast och rymma minst 24 liter. Pump (B) måste ge ett konstant flöde syntetiskt spillvatten till luftningskärlet. Varje lämpligt system kan användas, under förutsättning att inflödet och koncentration är säkerställt. Normalt är sedimenteringskärlets

höjd (D) så inställd att luftningskärlet innehåller 3 liter blandad vätska. En sintrad luftningskub (G) är upphängd i kärl (C) vid den koniska delens spets. Den luftmängd som blåses genom luftaren skall kontrolleras med en flödesmätare (H).

"Porous pot":

Den porösa krukan är gjord av plattor av poröst polyetylen (2 mm tjocka, maximal porstorlek 95 µm) som formas till en cylinder med en diameter av 14 cm och en konisk botten som bildar en vinkel på 45° med sidorna (figurerna 1 och 2 i tillägg 2). Den porösa krukan sätts ned i en ogenomtränglig behållare av lämpligt plastmaterial med en diameter av 15 cm som på sin cylindriska del har ett utlopp på 17,2 cm höjd vid en volym av 3 l. På insidan av den inre behållarens översta kant finns det en stark stödjande ring av lämpligt plastmaterial så att det finns 0,5 cm plats till utloppsvatten mellan den inre och den yttre behållaren.

De porösa krukorna kan ställas på botten av ett termostatstyrt vattenbad. Vid ett luftintag till botten av den inre behållaren placeras lämpliga luftningsrör.

Behållare (A) och (F) skall vara av glas eller lämpligt plastmaterial och minst kunna rymma 24 l. Pumpen (B) skall förse luftningstanken med ett konstant flöde av syntetiskt spillvatten. Varje passande system kan användas förutsatt att ett bestämt inflöde och en bestämd koncentration säkerställs.

Det krävs extra inre porösa krukor för att ersätta krukor som blivit igentäppta under användning. Igentäppta krukor läggs i en hypokloritlösning i 24 timmar och tvättas sedan av grundligt med ledningsvatten.

1.6.1.2. Filtrering

Membranfiltreringsapparatur och membranfilter med en porstorlek av 0,45 µm krävs. Membranfilter är lämpliga om det är garanterat att de varken frigör kol eller adsorberar ämnet i filtreringssteget.

1.6.1.3. Spillvatten

Antingen passande syntetiskt spillvatten eller spillvatten från hushåll kan användas.

Exempel på syntetiskt spillvatten:

Lös upp följande ämnen per liter vattenledningsvatten:

Pepton:	160 mg
Köttextrakt:	110 mg
Urea:	30 mg
NaCl:	7 mg
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg
K_2HPO_4:	28 mg

Spillvatten från hushåll:

Spillvatten från hushåll uppsamlas färskt varje dag från överflödet från primärsedimenteringstanken i en reningsanläggning.

1.6.1.4. Stamlösning av testämnet

En lösning av testämnet, t. ex. 1 %, skall förberedas för tillsättning till testenheten. Ämnets koncentration måste bestämmas, så att rätt mängd kan tillsättas spillvattnet eller direkt i enheten via en andra pump för att ge den testkoncentration som krävs.

1.6.1.5. Inokulat

Obs: Om spillvatten från hushåll används är det ingen idé att använda ett inokulat med låg bakteriekoncentration, men aktiverat slam kan användas.

Olika slags inokulat kan användas.

Här följer tre exempel på lämpliga inokulat:

a) Inokulat från ett sekundärt utflöde:

Inokulat erhålls från ett sekundärt utflöde av god kvalitet vid ett reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten från hushåll. Provet skall hållas under aeroba betingelser tills det skall användas. För att förbereda inokulatet filtreras provet genom ett grovt filter och de första 200 ml kasseras. Filtratet hålls under aeroba betingelser tills det skall användas. Inokulatet skall användas samma dag som provet tas. Minst 3 ml skall användas för inokulation.

b) Blandat inokulat

Inokulat från ett sekundärt utflöde:

Se beskrivningen ovan.

Inokulat från jord:

100 g trädgårdsjord (bördig, inte steril) uppslammas i 1 000 ml klorfritt dricksvatten (jordar med extremt hög halt av lera, sand eller humus är inte lämpliga). Efter omröring får utfällning av suspensionen ske i 30 minuter. Supernatanten filtreras genom ett grovt filterpapper och de första 200 ml kasseras. Filtratet syresätts omedelbart och syresättningen pågår tills filtratet skall användas. Inokulatet skall användas samma dag som provet tas.

Inokulat från ytvatten:

En ytterligare del av inokulat tas från ett mesosaprobt ytvatten. Provet filtreras genom ett grovt filtrerpapper och de första 200 ml kasseras. Filtratet hålls under aeroba betingelser tills det skall användas. Inokulatet skall användas samma dag som provet tas.

Lika volymer av de tre inokulatproven blandas väl och det slutliga inokulatet tas från denna blandning. Minst 3 ml skall användas till inokulering.

c) Inokulat av aktiverat slam:

En mängd (högst 3 l) aktiverat slam (med ett innehåll av suspenderade fasta beståndsdelar på upp till 2,5 g/l) som tagits från luftningstanken i ett reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten från hushåll kan användas som inokulat.

1.6.2. *Förfarande*

Testet testet utförs i rumstemperatur, som skall hållas konstant mellan 18 och 25 °C.

Om det är ändamålsenligt kan testet utföras vid en lägre temperatur (ned till 10 °C). Om testämnet bryts ned krävs det normalt inte någon ytterligare test. Om ämnet emellertid inte bryts ned kan testen göras om vid en konstant temperatur mellan 18–25 °C.

1.6.2.1. Inkörningsperiod: slambildning/stabilisering av enheterna

Slambildnings-/stabiliseringsperioden är den period under vilken de suspenderade fasta beståndsdelarna av det aktiverade slammet och enheternas prestationsförmåga blir stationär under de använda driftförhållandena.

Inkörningsperioden är den period som löper från den tidpunkt då testkoncentrationen tillsätts för första gången till den tidpunkt då dess avlägsnande har nått en nivå (relativt konstant värde). Denna period får högst vara sex veckor.

Utvärderingsperioden är en treveckorsperiod, tre veckor från den tidpunkt då testämnets avlägsnande når ett relativt konstant och vanligtvis högt värde. För ämnen som visar låg eller ingen nedbrytning under de första sex veckorna beräknas utvärderingsperioden för de följande tre veckorna.

Man börjar med att fylla den eller de enheter som är nödvändiga för ett test med inokulat blandat med influent.

Luftningen (och luftpumpen (E), om det rör sig om IECD Confirmatory test.-enheter) och doseringspumpen (B) sätts därefter igång.

Influens utan testämne skall passera genom luftningskärlet (C) med en hastighet av antingen 1 l i timmen eller 0,5 l i timmen. Detta ger en medelretentionstid på antingen tre eller sex timmar.

Luftningshastigheten skall regleras så att innehållet i kärlet (C) ständigt hålls suspenderat och halten löst syre är minst 2 mg/l.

Skumbildning måste förhindras på lämpligt sätt. Skumdämpande medel som hämmar det aktiva slammet får inte användas.

Slam som samlats kring toppen av luftningskärlet (C) (och för OECD confirmatory testenheters vidkommande i botten av sedimenteringskärlet (D) eller i rörsystemet) skall återföras till cirkulationen minst en gång om dagen genom avborstning eller på annat sätt.

Om slammet inte sedimenterar kan sedimenteringen förbättras genom tillsättning av en 5-procentig lösning av järnklorid, 2 ml i taget, så många gånger som behövs.

Utflöde samlas upp i kärlet (E) i 20–24 timmar och en provtagning görs efter grundlig blandning. Kärlet (E eller F) måste omedelbart regöras.

För att kunna överväga och kontrollera processens effektivitet mäter man minst två gånger i veckan det kemiska syrebehovet (COD) eller upplöst organiskt kol (DOC) både i filtratet av den ackumulerade utflödet och i det filtrerade inflödet (ett membran med en porstorlek av 0,45 µm används, varvid de första (ca) 20 ml av filtratet kasseras).

Reduceringen av COD eller DOC bör plana ut när nedbrytningen är ungefär densamma varje dag.

Halten torrämnen i det aktiva slammet i luftningskärlet bör fastställas i g/l två gånger i veckan. Man kan använda enheterna på två olika sätt: aningen bestäms det aktiverade slammets torrämneinnehåll två gånger i veckan och om halten är högre än 2,5 g/l skall överskottet av det aktiva slammet kasseras, eller avlägsnas daligen 500 ml blandad vätska från varje kärl så att slammet får en medeluppehållstid av sex dagar.

När de mätta och uppskattade parametrarna (processens effektivitet (med hänsyn till COD- eller DOC-avlägsnande), slamkoncentrationen, slamsedimenteringsegenskaper, utloppens oklarhet, osv.) för de två enheterna är tillräckligt stabil, kan testämnet tillsättas inloppet till den ena av enheterna (i enlighet med 1.6.2.2).

Det är också möjligt att tillsätta testämnet i början av slambildningsperioden (1.6.2.1) särskilt om slammet tillsätts som inokulat.

1.6.2.2. Testförfarande

Arbetsvillkoren är desamma som för inkörningsperioden, och det tillsätts så mycket stamlösning (ca 1 %) av testämnet till testenehtens inflöde att den önskade testämnekoncentrationen (ca 10–20 mg DOC/l eller 40 mg COD/l) i spillvattnet uppnås. Detta kan ske genom att stamlösningen blandas i spillvattnet dagligen eller med hjälp av ett särskilt pumpsystem. Denna koncentration kan uppnås gradvis. Om testämnet inte har någon toxisk verkan på det aktiverade slammet kan även högre koncentrationer testas.

Blindprovsenheten tillförs endast via inflödet utan tillförda ämnen. Lämpliga volymer av utflöden analyseras och filtreras genom membranfilter (0,45 µm) varvid de första (ca) 20 ml filtrat kasseras.

De filtrerade proven måste analyseras samma dag annars måste de förvaras med en passande metod, t. ex. genom tilsättning av 0,05 ml av en 1-procentig lösning av kvicksilverklorid (H_gCl_2) till varje 10 ml filtrat eller genom förvaring vid 2–4 °C i upp till 24 timmar, eller under -18 °C för längre perioder.

Inkörningsperioden, med tillsättning av testämne, bör inte vara längre än sex veckor, och bedömningsperioden bör inte vara kortare än tre veckor, dvs. omkring 14–20 bestämningar bör finnas tillgängliga för beräkning av slutresultatet.

Kopplingsmetoden:

Enheterna kopplas genom att byta 1,5 blandad vätska (inbegripet slam) mellan de två enheternas luftningskärl en gång om dagen. Om det är fråga om starkt absorberande testämnen tas endast 1,5 l överstående vätska från sedimenteringskärlen, som hälls i den andra enhetens aktivslamkärl.

1.6.2.3. Analys

Två slags analysmetoder kan användas för att följa ämnets beteende:

DOC och COD

Dubbla bestämningar av DOC-koncentrationer görs med kolanalysator och/eller COD-värden enligt hänvisningarna (2).

Specifik analys

Testämnekoncentrationerna bestäms genom en passande analysmetod. När det är möjligt skall specifik bestämning av det ämne som är absorberat på slammet genomföras.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

2.1. Kopplingsmetoden

När kopplingsmetoden används beräknas det dagliga avlägsnandet, DR, i enlighet med 1.2.1.

Detta dagligen beräknade värde för avlägsnadnet korrigeras genom DRc, för att ta hänsyn till den materialöverföring som orsakas av transinokulering. Dett sker genom utjämning (2) för en genomsnittlig retentionstid av tre timmar och efter utjämning (3) för en genomsnittligt retentionstid av sex timmar.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad (2)$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad (3)$$

Genomsnittet av DRc-värdena beräknas, samt standardavvikelsern erhålls efter utjämning (4).

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \quad (4)$$

där:

S_{DRc} = DRc-värdenas standardavvikelse.

$\overline{DRc}$ = Genomsnitt av DRc-värdena.

n = Antal bestämningar.

Outliers i DRc-värdena elimineras genom ett lämpligt statiskt förfarande, t. ex. Nalimov (hänvisning 6), på 95 % sannolikhetsnivå, och genomsnitt och standardavvikelse för DRc-data utan outliers beräknas igen.

Slutresultatet beräknas sedan med utjämning (5) som

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}} S_{DRc} \quad (5)$$

där:

$t_{n-1};\alpha$ = Tabellvärden av t för n värdepar av E och E_O och med en statistisk konfidens på P (P = 1 – α), där P sätts till 95 % (hänvisning 1).

Resultaten anges som genomsnittet med toleranser av 95 % sannolikhetsnivå, den motsvarande standardavvikelsen och antalet data i DRc-data utan ouliers samta antalet outliers, t. ex.:

DRc = 98,6 % ± 2,3 % DOC-avlägsnande.

s = 4,65 % DOC-avlägsnande.

n = 18.

x = Antal outliers.

2.2. Metod utan koppling

Enheternas prestationsförmåga kan kontrolleras på följande sätt:

$$\text{procent avlägsnande av COD eller DOC} = \frac{\text{COD eller DOC av spillvatten} - \text{COD eller DOC av utflöde}}{\text{COD eller DOC spillvatten}} \times 100$$

Det dagliga avlägsnandet kan avbildas grafiskt så att det framgår om det finns några tendenser till t. ex. acklimatisering.

2.2.1. *Tillämpning av COD/DOC-bestämningar*

Det dagliga procentuella avlägsnandet, % DR, beräknas enligt 1.2.1.

Genomsnittet av DR-värdena beräknas samt standardavvikelsen erhålls genom följande formel:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad (6)$$

där

S_{DR} = DR_i-värdenas standardavvikelse.

$\overline{DR}$ = Genomsnitt i DR_i-värdena

n = Antal bestämningar.

Outliers i DR-värdena elimineras genom ett lämpligt statiskt förfarande, t. ex. Nalimov (hänvisning 6), på 95 % sannolikhetsnivå, och genomsnitt och standardavvikelse för DRc-data utan outliers beräknas igen.

Slutresultatet beräknas sedan med utjämning (7) som

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}} S_{DR} \qquad (7)$$

där:

$t_{n-1};\alpha$ = Tabellvärden av t för n värdepar av E och E_0 och med en statistisk konfidens på P (P = 1 – α), där P sätts till 95 % (hänvisning 1).

Resultaten anges som genomsnittet med toleranser av 95 % sannolikhetsnivå, den motsvarande standardavvikelsen och antalet data i DR-data utan ouliers samt antalet outliers, t. ex.:

DR = (98,6 % ± 2,3 %) DOC-avlägsnande.

s = 4,65 % DOC-avlägsnande.

n = 18.

x = Antal outliers.

2.2.2. *Tillämpning av specifik analys*

Den procentdel testämne som elimineras från vattenfasen (R_W) beräknas enligt 1.2.2.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Det schema som återges i tillägg 3, som visar arbetsvillkoren för testet.

— Vald apparatur (OECD confirmatory test eller porous pot).

— Vald arbetsmetod. Kopplingsmetod eller ej.

— Typ av spillvatten: syntetiskt spillvatten eller spillvatten från hushåll. Om det rör sig om spillvatten från hushåll anges datum och plats för provtagning.

— Använt inokulat med angivelse om datum och plats för provtagning.

— Angivelse av analysmetoden, om specifika analyser gjorts, och en beskrivning av den.

— Avbildning av COD- eller DOC-avlägsnande mot tiden, inbegripet inkörnings- och bedömningsperioder.

— Analytisk återhämtning av testämnet som COD eller DOC i stamlösningen.

— Avbildning av det procentuella avlägsnandet av testämne från det vattniga fasen mot tiden (inkörningsperiod och värderingsperiod), om specifika analyser gjorts.

— Det genomsnittliga avlägsnandet av DOC, COD eller testämne samt standardavvikelse beräknat från resultaten från bedömningsperioden, dvs. när vid ett stabilt avlägsnande av testämne.

— Avbildning av aktivslamkoncentration mot tiden.

— Eventuella kommentarer om det aktiverade slammet (kasserat överstående slam, förekomst av klumbildningarn, $FeCl_3$, etc.).

— Testämnekoncentration som använts vid testet.

— Eventuella resultat av analyser av slammet.

— Alla upplysningar och testresultat i fråga om testämnet och eventuella referensämnen.

— Vetenskapliga motiveringar för eventuella ändringar av testförfarandet.

3.2. **Tolkning av resultat**

Om den procent testämne som avlägsnas från vattenfasen är låg kan detta bero på att testämnet hämmar mikroorganismerna. Detta kan även avslöjas genom lysis och förlust av slam, som ger grumlig överstående vätska, samt nedsatt effektivitet i fråga av avlägsnandet av COD (eller DOC).

Fysikalisk-kemisk adsorbtion kan dock i vissa fall spela en viss en roll. Skillnaden mellan biologisk verkan på molekylen och fysikalisk-kemisk adsorbtion kan avslöjas genom analys av slammet enligt passande desorption.

Det är nödvändigt att göra ytterligare tester om man skall kunna skilja på bionedbrytning (eller delvis bionedbrytning) och adsorption.

Detta kan göras på flera olika sätt, men det mest övertygande är att använda överstående vätska som inokulum i en bassettest (helst ett respirometriskt test).

Observation av en hög procentuell förlust av DOC (COD) orsakas av bionedbrytning, varvid det däremot vid låg förlust inte kan skiljas mellan bionedbrytning och eliminering. Som ett exempel kan nämnas att om ett oupplösligt ämne påvisar en hög adsorbtionskonstant av 98 %, och 10 % överstående slam kasseras dagligen, är en eliminering på upp till 40 % möjlig. Om det kasseras 30 % överstående slam kan eliminering på grund av adsorbtion på och förlust tillsammans med överstående slam komma upp till 65 % (hänvisning 4).

Vid användning av en specifik analysmetod måste man vara uppmärksam på förhållandet mellan ämnets struktur och den använda specifika analysmetoden. I detta fall kan det observerade fenomenet inte tolkas som en mineralisering av ämnet.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A,* rådets beslut C(81) 30 slutlig.

2. Bilaga V C.9 Nedbrytning – kemiskt syrebehov. Kommissionens direktiv 84/449/EEG, *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*, nr L 251 av den 19.9.1984.

3. Painter, H. A. och King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. Juni 1978, Water Research Center, UK.

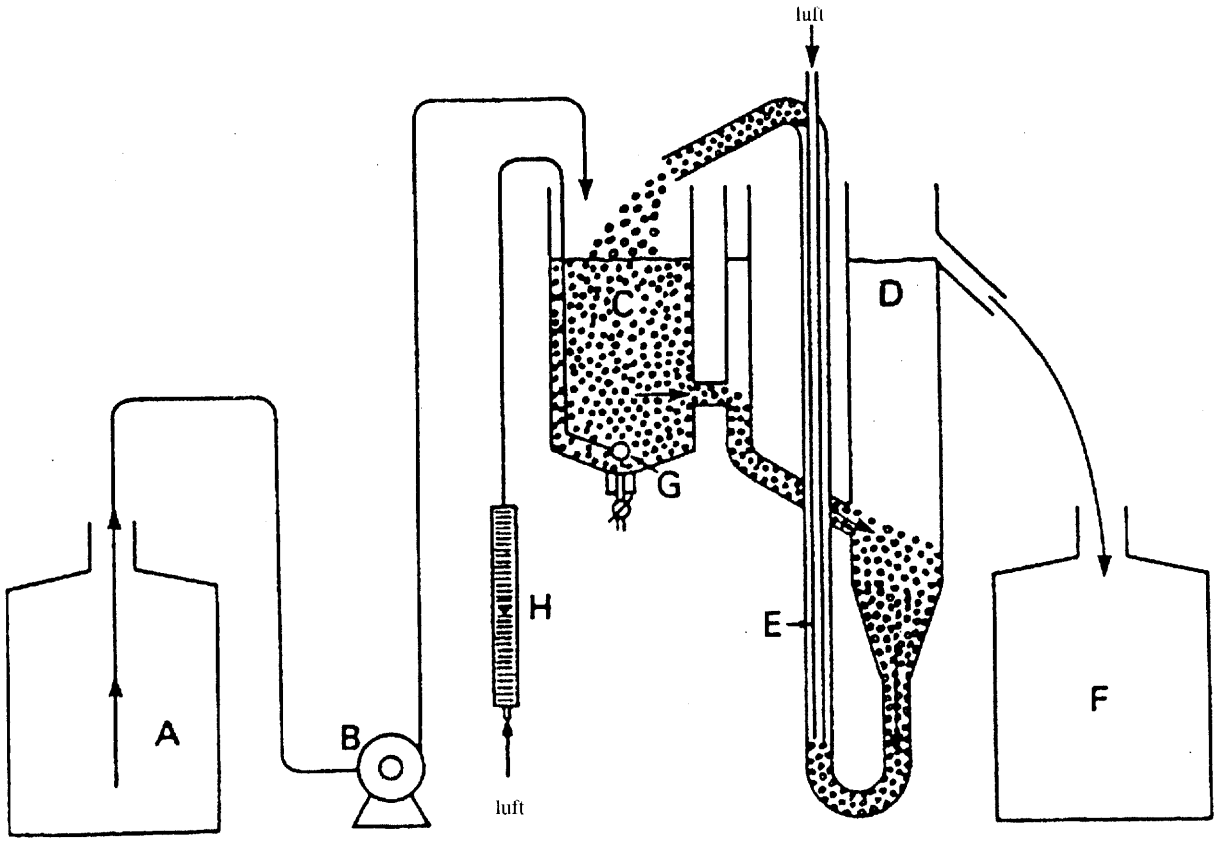
4. Wierich, P. och Gerike, P., "The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated Sludge plants" — *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, nr 2. juni 1981, s. 161–171.

5. Rådets direktiv 82/242/EEG och 82/243/EEG, *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*, nr L 109 av den 22.4.1982, om ändring av rådets direktiv 73/404/EEG och 73/405/EEG om bionedbrytbarhet för tvätt- och rengöringsmedel, *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*, nr L 347, 17.12.1973.

6. Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, inbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), s. 406–409.

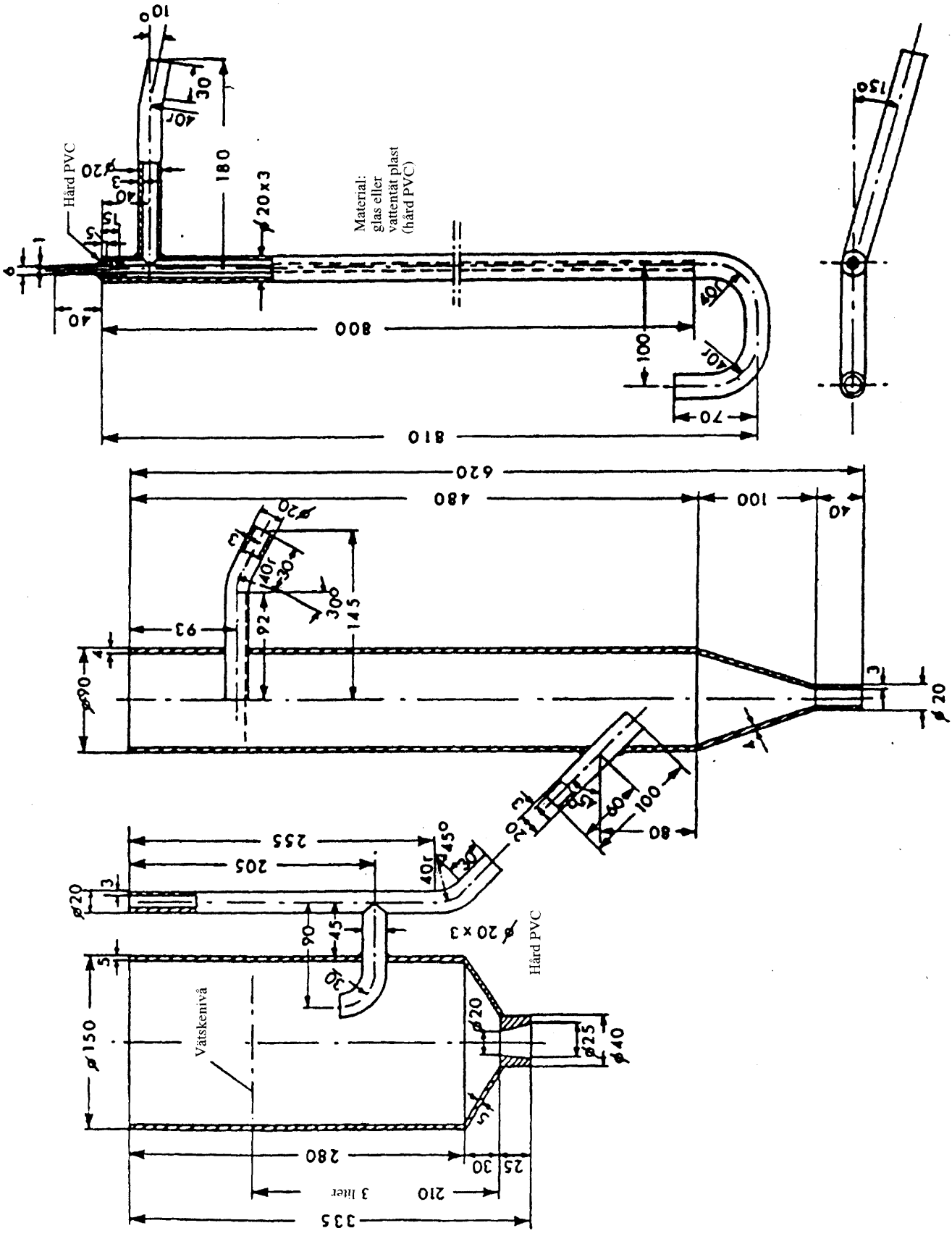
Tillägg 1

Figur 1



A = lagringskärl
B = doseringspump
C = luftningskärl
D = sedimenteringskärl
E = luftpump
F = kärl
G = luftningskub
H = flödesmätare (valfritt)

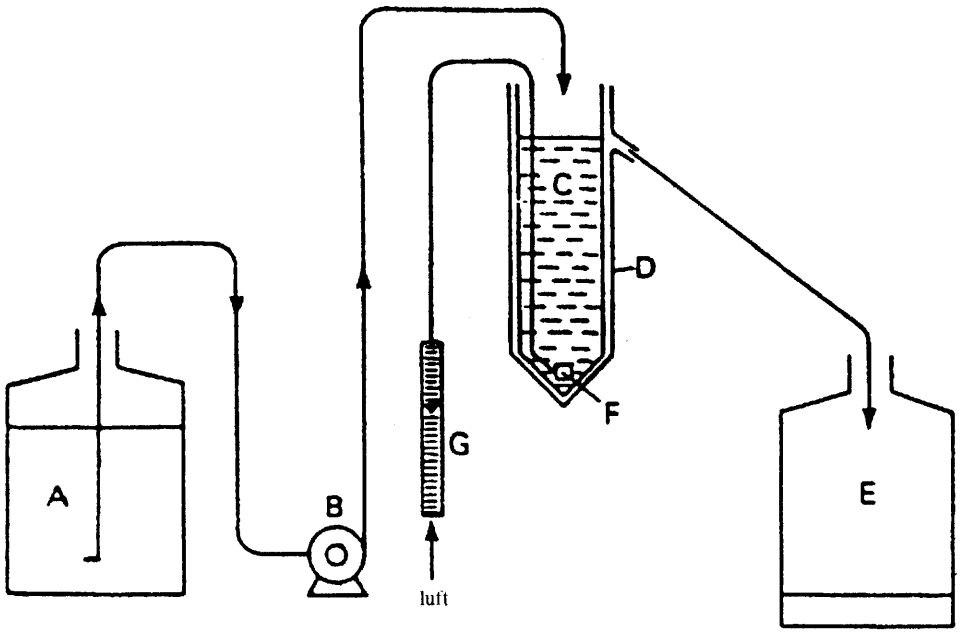
Figur 2


Hård PVC
Material:
glas eller
vattentät plast
(hård PVC)
Hård PVC
Vätskenivå
3 liter

Tillägg 2

Figur 1

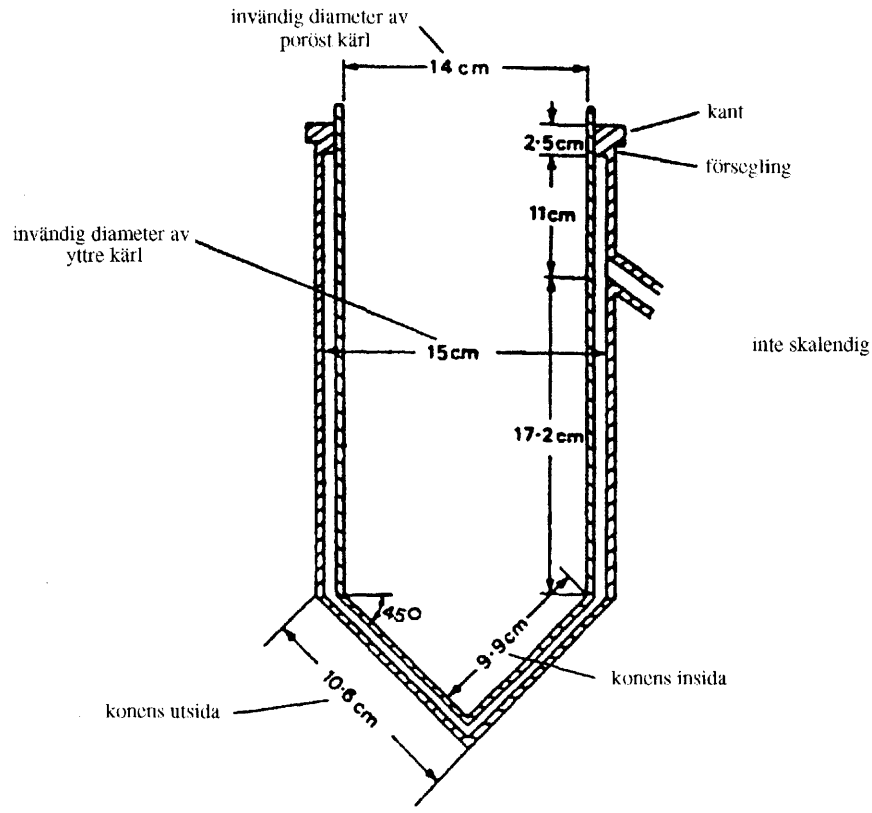
Utrustning för bestämning av bionedbrytbarhet



A = lagringskärl
B = doseringspump
C = luftningskärl
D = sedimenteringskärl
E = luftpump
F = kärl
G = luftningskub

Figur 2

3-liters poröst luftningskärl



Tillägg 3

Arbetsvillkor för simuleringstest för aktiverat slam

Sätt ett kryss för varje grupp

Apparatur
OECD Confirmatory ☐
Porous Pot ☐

Arbetsmetod
Enkel enhet ☐
Kopplade enheter ☐
Icke-kopplade enheter ☐

Transinokulering
Ingen ☐
Aktiverat slam ☐
Överstående vätska ☐

Medeluppehållstid
Tre timmar ☐
Sex timmar ☐

Basnäringsämne
Spillvatten från hushåll ☐
Syntetiskt spillvatten ☐

Inokulat
Sekundärt spillvatten ☐
Blandat inokulat ☐
Aktiverat slam ☐

Tillsättning av testämne
Initialt ☐
Gradvis ökning ☐
Efter slambildning ☐

Analys
Specifik ☐
COD ☐
DOC ☐

BIOLOGISK NEDBRYTBARHET

AKTIVERAT SLAM — RESPIRATIONSHÄMNINGSTEST

1. METOD

1.1. Inledning

Med denna metod bedöms ett testämnes verkan på mikroorganismer genom mätning av respirationshastigheten enligt bestämda villkor vid olika koncentrationer av testämnet.

Syftet med metoden är att ge en snabb screening-metod för identifiering av ämnen som kan påverka ett aerobt mikrobiellt reningsverk, och att indikera lämpliga icke-hämmande koncentrationer av testämnet som kan användas vid bionedbrytbarhetstest.

Ett förtest kan utföras före det slutliga testet. Detta test ger upplysningar om den koncentrationsintervall som skall användas vid huvudtestet.

I testet ingår två kontrolltester, en vid början och en i slutet av testserierna. Dessutom bör varje parti aktiverat slam också kontrolleras genom användning av en referensämne.

Metoden är enklast att använda för ämnen som på grund av sin oupplöslighet i vatten och ringa flyktighet sannolikt kommer att förbli i vatten.

För ämnen med begränsad löslighet i testämnet kan det visa sig omöjligt att bestämma EC_{50}.

Resultat som grundas på syreupptagning kan leda till felaktiga slutsatser om ämnet har en tendens att avkoppla oxidativ fosforylering.

Det är användbart att känna till följande när man utför testet:

— Vattenlöslighet,

— Ångtryck.

— Strukturformel.

— Testämnets renhet.

Rekommendation

Aktiverat slam som innehåller potentiellt patogena organismer bör hanteras med försiktighet.

1.2. Definitioner och enheter

Respirationshastigheten är syreförbrukningen hos mikroorganismer i aerobt spillvattenslam och uttrycks normalt i mg O_2 per mg slam per timme.

För att beräkna ett testämnes hämmande verkan i en bestämd koncentration uttrycks respirationshastigheten som en procentdel av genomsnittet av de två kontrollrespirationshastigheterna.

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \text{procentuellhämming}$$

där:

R_s = Syreförbrukning vid testade koncentrationer av testämnet.

RC_1 = Syreförbrukningen, kontroll 1.

RC_2 = Syreförbrukningen, kontroll 2.

I samband med denna metod är EC_{50} den koncentration av testämne där respirationen är 50 % av den som kontrolltestet visar under de förhållanden som beskrivs i denna metod.

1.3. **Referensämnen**

Det rekommenderas att använda 3,5-diklorfenol, som man vet hämmar respirationen, som referensämne och att testa det för EC_{50} för varje parti aktiverat slam för att kontrollera att slammets känslighet inte är onormal.

1.4. **Testmetodsprincip**

Respirationshastigheten i aktiverat slam tillfört en standardmängd syntetiskt spillvatten mäts efter en kontrolltid av 30 minuter och/eller tre timmar. Även respirationshastigheten i samma aktiverade slam vid olika koncentrationer av testämnet under i övrigt identiska förhållanden mäts. Testämnets hämmande verkan vid en bestämd koncentration uttrycks som en procentdel av medelrespirationshastigheten i två kontrolltester. Ett EC_{50}-värde beräknas ut i från bestämningar vid olika koncentrationer.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Testresultaten är giltiga om

— respirationshastigheten i de två kontrolltesterna ligger inom 15 % av varandra,

— EC_{50} (30 minuter och/eller tre timmar) för 3,5-diklorfenol ligger inom det accepterade området av 5–30 mg/l.

1.6. **Metodbeskrivning**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Lösningar av testämnet

Testämnekoncentrationerna nyframställs vid testets inledning genom användning av en stamlösning. En stamlösningskoncentration av 0,5 g/l är lämpligt om nedanstående förfarande används.

1.6.1.2. Lösningar av kontrollämnet

En lösning av 3,5-diklorfenollösning kan t. ex. framställas genom att lösa 0,5 g 3,5-diklorfenol i 10 ml 1 M NaOH vilket späds med destillerat vatten till ca 30 ml. Därefter tillsätts under omrörning 0,5 M H_2SO_4 upp till den punkt då utfällning börjar – det krävs ca 8 ml 0,5 M H_2SO_4 — och slutligen späds blandningen med destillerat vatten till 1 l. pH-värdet skall därefter vara omkring 7–8.

1.6.1.3. Syntetiskt spillvatten

Syntetiskt spillvatten framställs genom att följande ämnen löses upp per liter vatten:

— 16 g pepton,

— 11g köttextrakt,

— 3 g urea,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Not 1: Detta syntetiska spillvatten är 100 gånger så koncentrerat som det som beskrivs i OECD Technical Report "Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents" av den 11 juni 1976, med tillsättning av dikaliumvätefosfat.

Not 2: Om det framställda mediet inte används omedelbart skall det förvaras i mörker vid 0–4 °C, dock högst en vecka och under förhållanden som inte ger anledningen till ändring i sammansättningen. Mediet kan också steriliseras innan det förvaras, eller så kan man tillsätta pepton och köttextrakt strax innan testet utförs. Omedelbart före användningen blandar man noggrant och pH-värdet justeras.

1.6.2. *Apparatur*

Mätapparatur: Den exakta utformingen är inte avgörande. Det får dock inte finnas luftmellanrum mellan vätska och propp, och sonden skall sluta tätt till kolvens hals.

Normal laboratorieutrustning krävs, särskilt följande:

— Mätapparatur,

— Luftningsapparatur,

— pH-elektrod och pH-mätutrustning

— O_2-elektrod.

1.6.3 *Förberedelse av inokulat*

Som mikrobiellt inokulat till testet används aktiverat slam från ett reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten från hushåll.

I laboratoriet kan grövre partiklar om nödvändigt avlägsnas genom utfällning under en kort period, t. ex. 15 minuter, följt av dekantering av det översta laget med finare slampartiklar. Alternativt kan slammet användas efter några få sekunders blandning i en blandare.

Dessutom kan, om man misstänker närvaron av hämmande material, slammet tvättas med kranvatten eller en isotonisk lösning. Efter centrifugering dekanteras överstående lösning (detta förfarande upprepas tre gånger).

En mindre mängd slam vägs och torkas. Utifrån detta kan man beräkna den mängd vått slam som måste suspenderas i vatten för att erhålla ett aktivt slam med ett innehåll av fasta beståndsdelar suspenderad i en blandad vätska på 2–4 g/l. Detta motsvarar en koncentration av 0,8–1,6 g/l i testmediet om nedan beskriva förfarande följs.

Om slammet inte kan användas samma dag som det insamlas tillsätts 50 ml syntetiskt spillvatten till varje liter aktiverat slam som framställts enligt beskrivningen ovan. Slammet luftas därefter under natten vid 20 ± 2 °C. Därefter hålls det luftat tills det används nästa dag. Före användningen kontrolleras pH-värdet som vid behov justeras till pH 6–8. De fasta beståndsdelarna som är suspenderade i den blandade vätskan bestäms i enlighet med beskrivningen i föregående avsnitt.

Om man måste använda samma parti slam under de följande dagarna (högst fyra dagar) tillsätts ytterligare 50 ml syntetiskt spillvatten vid varje arbetsdags slut.

1.6.4. *Testförfarande*

Varaktighet/kontakttid:	30 minuter och/eller tre timmar under luftning
Vatten:	Dricksvatten (om nödvändigt befriat från klor)
Lufttillförsel:	Ren, oljefri luft. Luftgenomströmning 0,5–1,0 l/min
Mätapparatur:	Flatbottnad kolv som t,ex, en BOD-kolv (se figur 1)
Syremätning:	Syreelektrod med tillhörande skrivare
Näringslösning:	Syntetiskt spillvatten (se ovan)
Testämne:	Testlösningen framställs kort innan testets inledning
Referensämne:	T. ex. 3,5-diklorfenol (minst tre koncentrationer)
Kontrolltest:	Inokulerat prov utan testämne
Temperatur:	20 ± 2 °C

Nedan lämnas förslag till ett experimentförfarande som kan följas för både test- och referensämnet i tretimmars kontaktperioder.

Flera kärl används (t. ex. 1-liters glasbägare).

Minst fem koncentrationer med ett fast koncentrationsförhållande som helst inte överstiger 3,2 används.

Vid tidpunkten "0" späds 16 ml av det syntetiska spillvattnet med vatten till 300 ml. 200 ml av det mikrobiella inokulatet tillsätts och hela blandningen (500 ml) hälls i ett första kärl (första kontroll C_1).

Testkärlen skall genomluftas kontinuerligt för att säkerställa att det upplösta O_2 inte faller under 2,5 mg/l, och att O_2-koncentrationen är i storleksordningen 6,5 mg/l omedelbart innan mätningen av respirationshastigheten.

Vid tidpunkten "15 minuter" (15 minuter är ett godtyckligt men bekvämt intervall) utförs ovanstående förfarande, bortsett från att det tillsätts 100 ml testämnestamlösning till de 16 ml syntetiskt spillvatten, före det tillsätts vatten till 300 ml och mikrobiellt inokulat till totalt 500 ml. Denna blandning hälls sedan i en annan glasbägare och luftas enligt beskrivningen ovan. Detta förfarande repeteras med 15 minuters intervaller med olika mängder testämnestamlösning, så att man erhåller en rad kärl med olika koncentrationer av testämnet. Till slut framställs en andra kontroll (C_2).

Efter tre timmar registreras pH-värdet och efter en noggrann blandning hälls en del av innehållet i det första kärlet över i mätapparaten, och respirationshastigheten mäts under en period av upp till tio minuter.

Denna bestämning upprepas på innehållet i varje kärl vid 15-minutersintervaller, på ett sådant sätt att kontakttiden för varje behållare blir tre timmar.

Referensämnet testas med varje parti mikrobiellt inokulat på samma sätt.

Ett annat system (t. ex. mer än en syremätare) kan vara nödvändigt när man ska utföra mätningar efter 30 minuters kontakt.

Om det krävs mätning av den kemiska syreförbrukningen framställs ytterligare kärl som innehåller testämne, syntetiskt spillvatten och vatten, men inte aktiverat slam.

Syreförbrukningen mäts och registreras efter luftning i 30 minuter och/eller tre timmar (kontakttid).

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Respirationshastigheten beräknas utifrån skrivkurvan som O_2/l × h mellan ca 6,5 mg O_2/l och 2,5 mg O_2/l, eller under en tiominutersperiod, om respirationshastigheten är låg. Den del av respirationskurvan över vilken man mäter respirationshastigheten skall vara linjär.

Om respirationshastigheterna i de två kontrolltesterna inte ligger inom 15 % av varandra, eller om referensämnets EC_{50} (30 minuter och/eller tre timmar) inte ligger inom det accepterade området (5–30 mg/l för 3,5-diklorfenol), är testet ogiltigt och måste göras om.

Hämningsprocenten beräknas vid varje testkoncentration (se 1.2). Hämningsprocenten avtecknas mot koncentrationen på semilogaritmiskt papper (eller probit), och ett EC_{50}värde utläses.

95 %-konfidensgränserna för EC_{50}-värdena kan bestämmas genom standardförfaranden.

3. RAPPORTERING

3.1 Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Testämne: data för kemisk identifiering.

— Testsystem: källa, koncentration och eventuell förbehandling av det aktiverade slammet.

— Testbetingelser:

  — Reaktionsblandningens pH-värde före respirationsmätningen.

  — Testtemperatur.

  — Testets varaktighet.

  — Referensämne och dess uppmätta EC_{50}.

  — Eventuell abiotisk syreförbrukning.

— Resultat:

  — Alla uppmätta data.

  — Hämningskurva och metod för beräkning av EC_{50}.

  — EC_{50} och om möjligt 95 % konfidensgränser, EC_{20} och EC_{30}.

  — Alla observationer och eventuella avvikelser från denna testmetod, som kan ha inflytande på resultatet.

3.2. Tolkning av resultat

EC_{50}-värdet bör endast betraktas som vägledande för testämnets sannolika toxicitet för antingen behandling av spillvatten med aktiverat slam eller mikroorganismer i spillvatten, eftersom de komplexa växelverkningar som förekommer i miljön inte kan simuleras korrekt i ett laboratorietest. Dessutom kan testämnen som har en hämmande effekt på ammoniakoxidering även producera atypsika hämningskurvor. Sådana kurvor måste därför tolkas med försiktighet.

4. HÄNVISNINGAR

1. International Standard ISO 8192 – 1986.
2. Broecker, B. och Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, s. 165.
3. Brown, D., Hitz, H. R. och Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, s. 245.
4. ETAD (Ecological and Toxicological Association and Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, även beskriven av:
5. B. Robra, *Wasser/Abwasser* 117, 1976, s. 80.
6. W. Schaefer, *Textilveredlung* 6, 1977, s. 247.
7. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, rådets beslut C(81) 30 slutlig.

BIOLOGISK NEDBRYTBARHET

MODIFIERAT SCAS-TEST

1. METOD

1.1. Inledning

Syftet med denna metod är att bedöma den potentiella fullständiga bionedbrytbarheten av vattenlösliga, icke-flyktiga organiska ämnen när dessa utsätts för relativt höga koncentrationer av mikroorganismer under en längre perioder. Under denna period hålls mikroorganismerna vid liv genom daglig tillförsel av näring bestående av bottensatsen av spillvatten. (I samband med helgen kan spillvattnet förvaras vid 4 °C. Alternativt kan det syntetiska spillvattnet till OECD Confirmatory test användas.)

Fysikalisk-kemisk adsorbtion kan inträffa på de suspenderade fasta ämnena vilket man måste ta hänsyn till vid tolkningen av resultaten (se 3.2).

Till följd av den flytande fasens långa uppehållstid (36 timmar), och den med mellanrum tillförda näringen, simulerar testet inte de normala villkoren i en spillvattenanläggning. De resultat som uppnås med olika testämnen visar att denna metod har en hög bionedbrytningspotential.

De förhållanden som skapas i denna metod underlättar i hög grad val och/eller adaption av mikroorganismer som är i stånd till att bryta ned testämnet. (Detta förfarande kan dessutom användas för att framställa acklimatiserade inokulat för användning i andra test.)

I detta test bedöms testämnennas fullständiga bionedbrytbarhet genom mätning av koncentrationen av upplöst organiskt kol (DOC). Koncentrationen av DOC bör hellre bestämmas efter upprensning av den sura lösningen än som skillnaden mellan total C och oorganiskt C.

Vid samtidig användning av en specifik analysmetod kan testämnet primära nedbrytbarhet (nebrytning av en ursprunglig kemisk förbindelse) bedömas.

Denna metod kan endast användas på organiska testämnen som vid den i analysen använda koncentrationen

— är lösliga i vatten,

— har ett obetydligt ångtryck,

— inte hämmar bakterierna,

— inte absorberas väsentligt i testsystemet,

— inte förloras genom att testämnet skummar.

Testämnet innehåll av organiskt kol skall vara känt.

Upplysningar om de relativa mängder av testämnets huvudbeståndsdelar kan vara till hjälp vid tolkningen av de uppnådda resultaten, särskilt när resultaten är låga eller marginella.

Upplysningar om ämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara användbar vid tolkningen av låga resultat och vid valet av en lämplig testkoncentration.

1.2. Definitioner och enheter

C_T = Koncentration av organiskt kol i testämnet, i närvaro eller frånvaro av bottensats av spillvatten i början av luftningsperioden (mg/l).

C_t = Koncentrationen av upplöst organiskt kol i den överstående vätskan vid avslutningen av luftningsperioden (mg/l).

C_c = Koncentrationen av upplöst organiskt kol i kontrollens överstående vätska vid avslutning av luftningsperioden (mg/l).

Bionedbrytbarheten definieras i detta test som förlusten av organiskt kol. Bionedbrytningen kan uttryckas som:

1. Den procentuella förlusten av D_{da} av den mängd ämne som tillförs dagligen:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

där:

D_{da} = nedbrytning/daglig tillförsel.

2. Den procentuella förlusten av D_{ssd} av den mängd ämne som finns närvarande vid varje dags början:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\simeq \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

där:

D_{ssd} = nedbrytning/ämne vid dagens början.

Indexen i och (i + 1) hänvisar till testdagen.

Utjämning 2(a) rekommenderas om spillvattnets innehåll av upplöst organiskt kol varierar från dag till dag medan utjämning 2(b) kan användas när mängden av upplöst organiskt kol är förhållandevis konstant från dag till dag.

1.3. Referensämnen

I vissa fall kan referensämnen vara användbara vid undersökning av ett nytt ämne. Ett bestämt referensämne kan dock inte rekommenderas.

Upplysningar om flera olika ämnen som är utvärderade i ringtester tillhandahålls (se tillägg 1) först och främst för att testmoden av och till kan kalibreras, men också för att resultaten kan jämföras om en annan metod används.

1.4. Testmetodsprincip

Aktiverat slam från ett biologiskt reningsverk placeras i en semi-kontinuerlig slamenhet (SCAS = semi-continous activated sludge). Testämnet och bottensatsen av spillvatten från hushåll tillförs och blandningen luftas i 23 timmar. Luftningen stoppas sedan och slammet ges tid att sätta sig och överstående vätska kasseras.

I det slam som finns kvar i luftningskammaren blandas sedan en ytterligare passande mängd av testämnet, varefter cykeln upprepas.

Bionedbrytning konstateras genom bestämning av innehållet av upplöst organiskt kol i överstående vätska. Detta resultat jämförs med resultaten från analysen av vätskan från en kontrollenhet, som endast tillförts bottensats av spillvatten.

Om en specifik analysmetod används kan änderingar av koncentrationen av den ursprungliga ämnet till följd av bionedbrytning mätas (primär bionedbrytbarhet).

1.5. Kvalitetskriterier

Denna metods reproducerbarhet, grundad på förlust av upplöst organiskt kol, är ännu inte fastställd. (I fråga om primär bionedbrytning har mycket tillfredsställande data uppnåtts för lätt nedbrytliga ämnen.)

Metodens känslighet är avhängig i vilken utsträckning variabiliteten i blindproven och i mindre grad av den korrekthet med vilken innehållet av upplöst organiskt kol kan bestämmas, eller av vätskans innehåll av testämne vid inledningen av varje enskild cykel.

1.6. Metodbeskrivning

1.6.1. *Förberedelse*

Ett tillräckligt antal rena luftningsenheter, alternativt kan den ursprungliga 1,5 liters SCA-testenheten användas, och lufttillförselslangar (figur 1) för varje enskild testämne och till kontrollen sätts ihop. Den komprimerade luft som tillförs testenheterna rensas med ett vaddfilter och bör vara fri från organiskt kol och vara mättat med vatten för att minska ångförlust.

Ett prov av blandad vätska, innehållande 1–4 g suspenderat fast ämne/l, tas från en aktiverad slamanläggning. Cirka 150 ml av den blandade vätskan krävs för varje luftenhet.

Stamlösningar av testämnet framställs i destillerat vatten. Normalt krävs en koncentration av 400 mg organiskt kol per liter, vilket ger en koncentration av testämnet av 20 mg/l vid inledningen av varje luftningscykel, såvida inte bionedbrytning inträffar.

Högre koncentrationer kan användas om toxiciteten för mikroorganismer tillåter detta.

Slamlösningarnas innehåll av organiskt kol mäts.

1.6.2. *Testbetingelser*

Testet bör utföras vid 20–25 °C.

En hög koncentration av aeroba mikroorganismer (1–4 g suspenderad fast ämne per liter) används, och den effektiva uppehållstiden är 36 timmar. Det kolämneinnehållande materialet i det tillförda spillvattnet oxideras grundligt, normalt inom åtta timmar efter inledning av varje enskild luftningscykel. Därefter respirerar slammet endogent under resten av luftningsperioden, under vilken det enda tillgängliga substratet är testämnet, om inte också detta metaboliseras snabbt. Dessa förhållanden, kombinerade med daglig återinokulation av proven när spillvatten från hushåll används som medium, ger mycket goda förhållanden för såväl acklimatisering som en hög grad av bionedbrytning.

1.6.3. *Genomförande av testet*

Man framställer ett prov av blandad vätska från en laboratorieenhet som övervägande behandlar spillvatten från hushåll eller från en lämplig aktiverad slamanläggning, varvid proven förvaras under aeroba förhållanden tills de används i laboratoriet. Varje luftningsenhet samt kontrollenheten fylls på med 150 ml (om det ursprungliga SCAS-testet används multipliceras de angivna volymerna med 10) blandad vätska, och luftning inleds. Efter 23 timmar stoppas luftningen och slammet får sätta sig i 45 minuter. Hanen på varje kolv öppnas successivt och 100 ml överstående vätska uttas. Ett prov av bottensatsen av spillvatten från hushåll tas omedelbart före användning och 100 ml av detta tillsätts det resterande slammet i varje luftningsenhet. Luftningen inleds på nytt. På detta stadium tillsätts inget testämne. Enheterna tillsätts dagligen spillvatten från hushåll men endast upp till den tidpunkt utfällningen resulterar i en klar överstående vätska. Detta tar normalt upp till två veckor, varefter det upplösta organiska kolet i den överstående vätskan vid avslutningen av varje luftningscykel närmar sig ett konstant värde.

Vid avslutningen av denna tidsperiod blandas de olika bottensatserna av slamproverna och 50 ml av detta blandade slamprov tillsätts till varje enhet.

95 ml bottensats av spillvatten och 5 ml vatten tillsätts till kontrollenheterna, och 95 ml av bottensatsen av spillvattnet plus 5 ml av den ifrågavarande stamlösningen av testämnet (400 mg/l) till testenheterna. Luftningen påbörjas på nytt och fortsätter i 23 timmar. Slammet sätter sig i 45 minuter och överstående vätska avlägsnas och analyseras för upplöst organiskt kol.

Ovanstående påfyllnings- och avtappningsförfarande upprepas dagligen under hela testet.

Innan utfällning kan det vara nödvändigt att tvätta enheternas väggar för att förhindra ackumulering av fasta ämnen över vätskenivån. För att undvika korskontaminering används en separat skrapa eller borste för varje enskild enhet.

Idealt bör innehållet av upplöst organiskt kol i överstående vätskor bestämmas dagligen, även om mindre regellbundna analyser kan tillåtas. Före analysen filtreras vätskorna genom tvättade membranfilter med en porstorlek av 0,45 µm, eller så centrifugeras vätskorna. Membranfilter är lämpliga om det är fastställt att de varken avger kolämne eller adsorberar ämnet under filtrering. Provens temperatur får inte översiga 40 °C så länge det är i centrifugen.

Testens varaktighet är obestämd för ämnen som uppvisar obetydlig eller ingen bionedbrytning. Erfarenheten visar att detta bör vara minst tolv veckor, men inte längre än 26 veckor.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Värdena för innehållet av upplöst organiskt kol i de överstående vätskorna i kontrollenheten avbildas mot tiden i ett koordinatsystem.

Efterhand som bionedbrytning sker närmare sig nivån i testenheten nivån i kontrollenheten. När skillnaden mellan de två nivåerna är konstant vid tre på varandra följande mätningar genomförs ett tillräckligt stort antal ytterligare mätningar för en statistisk behandling av data, och den procentuella bionedbrytningen av testämnet beräknas (D_{da} eller D_{ssd}, se 1.2).

3. RAPPORTERING

3.1 Testrapport

Testrapporten skall om möjligt innehålla följande:

— Fullständiga uppgifter om slag av spillvatten, om vilken typ av enhet som har använts samt om försöksresultaten rörande testämnet, ett eventuellt referensämne, och blindproven.

— Temperatur.

— Kurva för förlusten av organiskt kol, med beskrivning av beräkningsmetoden (se 1.2).

— Datum och plats för provtagning av aktiverat slam och spillvatten, status angående adaption, koncentration, osv.

— Vetenskapliga motiveringar för eventuella ändringar av testförfarandet.

— Underskrift och datum

3.2. Tolkning av resultat

Eftersom det ämne som kan testas med denna metod inte kommer att vara lätt bionedbrytligt kommer förlusten av organiskt kol, som uteslutande beror på bionedbrytning, normalt att ske gradvis över dagar eller veckor, undantaget sådana fall där acklimatiseringen är plötslig, vilket framgår av en abrupt förslut efter några veckor.

Fysikalisk-kemisk adsorbtion kan emellertid i vissa fall spela en betydande roll. Detta är fallet när det vid inledningen inträder ett fullständigt eller ett delvist försvinnande av det tillsatta upplösta organiska kolet. Vad som därefter inträffar beror på olika faktorer, såsom adsorptionsgraden och koncentrationen av suspenderat fast ämne i det kasserade spillvattnet. Skillnaden mellan koncentrationen av upplöst organiskt kol i kontroll- och testenheternas överstående vätska ökar normalt gradvis från det först inträffade värdet, och denna skillnad förblir sedan vid det nya värdet under resten av testet, såvida inte acklimatisering sker.

När man skall skilja mellan bionedbrytning (eller delvis bionedbrytning) och adsorption krävs ytterligare analyser. Detta kan göras på flera sätt, men den mest pålitliga metoden är att använda överstående vätska, elelr slam, som inokulat i en basistest (helst ett respirometiskt test).

Testämnen som resulterar i ett omfattande, icke-adsorptivt försvinnande av upplöst organiskt kol bör i denna test betraktas som potentiellt bionedbrytbara. Delvist icke-adsorptivt försvinnande tyder på att ämnet i varje fall är bionedbrytbart till viss grad.

Obetydligt eller inget försvinnande av upplöst organiskt kol kan bero på testämnets hämning av mikroorganismer. Detta kan också avslöja lysis och förlust av slam vilket ger oklara överstående vätskor. Testet bör i sådana fall göras om med användning av en lägre koncentration av testämnet.

Användning av en specifik analysmetod eller C-14-markerat testämne kan ge större känslighet. Om ett C-14-testämne används kommer återhämtning av $^{14}CO_2$ att bekräfta att bionedbrytning inträffat.

Om det dessutom anges resultat för primär bionedbrytning bör det om möjligt ges en förklaring på den förändring av den kemiska strukturern som medför att det ursprungliga testämnet inte kan påvisas.

Valideringen av analysmetoden skall anges tillsammans med värdena för blindprovmediet.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, rådets beslut C(81) 30 slutlig.

Tillägg 1

SCAS-test: Exempel på resultat

Ämne	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Procent bionedbrytning D_{da}	Testets längd (dagar)
4-acetylaminobenzensulfonat	17,2	2,0	85,0	40
Tetrapropylenbenzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyklopentantetrakavoxylat	17,9	3,2	81,1	120

Tillägg 2

Exempel på apparatur

