Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet

►B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 440/2008

av den 30 maj 2008

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

(Text av betydelse för EES)

(EUT L 142, 31.5.2008, s. 1)

Ändrad genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
►M1	Kommissionens förordning (EG) nr 761/2009 av den 23 juli 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Kommissionens förordning (EU) nr 1152/2010 av den 8 december 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Kommissionens förordning (EU) nr 640/2012 av den 6 juli 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Kommissionens förordning (EU) nr 260/2014 av den 24 januari 2014	L 81	1	19.3.2014

▼B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 440/2008

av den 30 maj 2008

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

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG ([1]), särskilt artikel 13.3, och

av följande skäl:

(1) Enligt förordning (EG) nr 1907/2006 ska testmetoder antas på gemenskapsnivå för ämnestestsyften om sådana tester krävs för att generera information om ämnenas inneboende egenskaper.

(2) I bilaga V till 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 ([2]) fastställs metoder för ämnens och preparats (beredningars) fysikalisk-kemikaliska egenskaper, toxicitet och ekotoxicitet. Bilaga V till direktiv 67/548/EEG har upphävts genom direktiv 2006/121/EG, med verkan från och med den 1 juni 2008.

(3) De testmetoder som ingår i bilaga V till direktiv 67/548/EEG bör tas med i denna förordning.

(4) Denna förordning hindrar inte användning av andra testmetoder, förutsatt att användningen av dessa är i enlighet med artikel 13(3) i förordning (EG) nr 1907/2006.

([1]) EUT L 396, 30.12.2006, s. 1. Rättad i EUT L 136, 29.5.2007, s. 3.

([2]) EGT 196, 16.8.1967, s. 1. Direktivet senast ändrat genom Europaparlamentets och rådets direktiv 2006/121/EG (EUT L 396, 30.12.2006, s. 850. Rättat i EUT L 136, 29.5.2007, s. 281) – *uppdateras med lämpliga referenser så snart den 30:e anpassningen offentliggjorts.*

▼B

(5) Principerna för att ersätta, minska och förbättra användningen av djur i provningsförfaranden bör till fullo beaktas när testmetoder utarbetas, särskilt när lämpliga validerade metoder för att ersätta, minska eller förbättra djurförsök blir tillgängliga.

(6) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från den kommitté som inrättats genom artikel 133 i förordning (EG) nr 1907/2006.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

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

Artikel 2

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

Artikel 3

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

Artikel 4

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

Den ska tillämpas från och med den 1 juni 2008.

▼B

BILAGA

DEL A: METODER FÖR BESTÄMNING AV FYSIKALISK-KEMISKA EGENSKAPER

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

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

▼M4

A.23.	FÖRDELNINGSKOEFFICIENT (1-OKTANOL/VATTEN): METOD MED LÅNGSAM OMRÖRNING

▼B

A.1 SMÄLT-/FRYSPUNKT

1. METOD

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

1.1 INLEDNING

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

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

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

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

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

T: termodynamiska temperaturen Kelvin (K)

1.3 REFERENSÄMNEN

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

Vissa referensämnen anges i hänvisningarna (se hänvisning 4).

▼B

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

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

1.4.1 **Kapillärmetoder**

1.4.1.1 *Smältpunktsanordningar med vätskebad*

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

1.4.1.2 *Srnältpunktsanordningar med metallblock*

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

1.4.1.3 *Bestämmng med fotocell*

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

1.4.2 **Värmebord**

1.4.2.1 *Koflers värmebänk*

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

▼B

1.4.2.2 *Smältmikroskop*

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

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

1.4.2.3 *Meniskmetoden*

Denna metod används endast för polyamiden

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

1.4.3 **Metod för bestämning av fryspunkt**

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

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

1.4.4 **Termisk analys**

1.4.4.1 *Differentiell termisk analys (DTA)*

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

▼B

1.4.4.2 *Differentiell scanningkalorimetri (DSC)*

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

1.4.5 **Flytpunkt**

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

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

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

TABELL: METODERNAS LÄMPLIGHET

A. **Kapillärmetoder**

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

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

▼B

B. **Värmebord och frysmetoder**

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

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

C. **Termisk analys**

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

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

D. **Flytpunkt**

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

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

1.6 METODBESKRIVNING

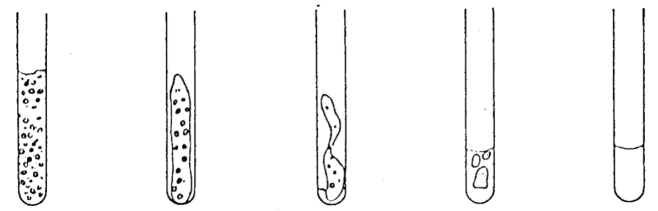
Tillvägagångssättet för nästan alla testmetoderna beskrivs i internationella och nationella standarder (se tillägg 1).

1.6.1 **Kapillärrörsmetoder**

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

▼B

Figur 1



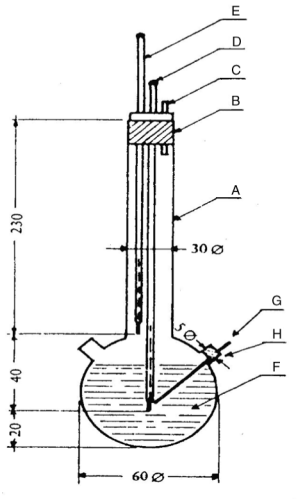
Steg A	(Begynnande smältning): Små droppar fördelar sig jämnt över kapillärrörets innervägg.
Steg B	Ett mellanrum uppstår mellan provet och innerväggen till följd av att provet krymper under smältningen.
Steg C	Det krympta provet börja sjunka mot botten och övergår i flytande form.
Steg D	En obruten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

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

1.6.1.1 *Smältpunktsanordningar med vätskebad*

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

Figur 2



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

▼B

Badvätska:

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

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

Termometer:

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

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

Förfarande:

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

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

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

Beräkning:

Smältpunkten beräknas enligt följande:

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

där:

T = korrigerad smältpunkt i K

T_D = temperaturavläsning av termometer D i K

T_E = temperaturavläsning av termometer E i K

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

1.6.1.2 *Smältpunktsanordning med metallblock*

Apparatur:

Denna består av

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

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

▼B

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

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

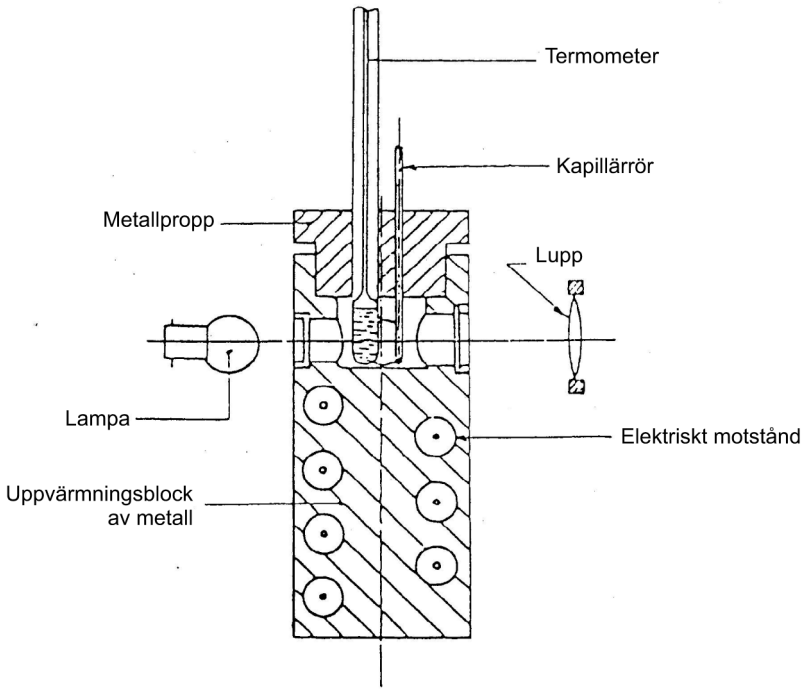
— fyra fönster av värmebeständigt glas på kammarens sidovägg, placerade diametralt och vinkelrätt mot varandra. Framför ett av dessa fönster finns en lupp monterad för iakttagelse av kapillärröret. De tre andra fönstren används för att belysa kammarens insida med hjälp av lampor,

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

Termometer:

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

Figur 3



1.6.1.3 *Bestämning med fotocell*

Apparatur och förfarande:

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

▼B

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

1.6.2 **Värmebord**

1.6.2.1 *Koflers värmebänk*

Se tillägg.

1.6.2.2 *Smältmikroskop*

Se tillägg.

1.6.2.3 *Meniskmetoden (polyamider)*

Se tillägg.

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

1.6.3 **Metoder för bestämning av fryspunkt**

Se tillägg.

1.6.4 **Termisk analys**

1.6.4.1 *Differentiell termisk analys*

Se tillägg.

1.6.4.2 *Differentiell scanningkalorimetri*

Se tillägg.

1.6.5 **Bestämning av flytpunkt**

Se tillägg.

2. **DATA**

I vissa fall är termometerkorrektion nödvändigt.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

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

— Den uppskattade noggrannheten.

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

▼B

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

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

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

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

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

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

▼B

Tillägg

Kompletterande tekniska upplysningar finns i följande standarder:

1. **Kapillärmetoder**

1.1 Smältpunktsanordningar med vätskebad

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

1.2 Smältpunktsanordningar med metallblock

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

2. **Värmebord**

2.1 Koflers värmebänk

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

2.2 Smältmikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3 Meniskmetoden (polyamider)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of ”melting point”

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Determination du ”point de fusion” Methode du ménisque

3. **Metoder för bestämning av fryspunkt**

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

4. **Termisk analys**

4.1 Differentiell termisk analys

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

▼B

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

4.2 Differentiell scanningkalorimetri

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

5. **Bestämning av flytpunkt**

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

▼B

A.2 **KOKPUNKT**

1. **METOD**

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

1.1. INLEDNING

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

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

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

Anmärkningar:

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

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

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

där:

p = ämnets ångtryck i pascal

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

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

T = termodynamisk temperatur i K

Kokpunkten anges i förhållande till det aktuella trycket under mätningen.

▼B

Omvandling

Tryck (enhet: kPa)

100 kPa = bar = 0,1 MPa

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

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

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

1 atm = standardatmosfär = 101 325 Pa

(enheten ”atm” är inte tillåten).

Temperatur (enhet: K)

$t = T - 273{,}15$

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

T: termodynamisk temperatur i kelvin (K)

1.3 REFERENSÄMNEN

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

I de metoder som anges i tillägget anges vissa referensämnen.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

1.4.1 **Bestämning med hjälp av ebulliometer**

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

1.4.2 **Dynamisk metod**

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

1.4.3 **Destillationsmetod för bestämning av kokpunkt**

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

▼B

1.4.4 **Siwoloboffs metod**

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

1.4.5 **Bestämning med fotocell**

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

1.4.6 **Differentiell termisk analys**

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

1.4.7 **Differentiell scanningkalorimetri**

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

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

Tabell 1

Jämförelse av metoderna

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

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

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

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

1.6.1 **Ebulliometer**

Se tillägg.

1.6.2 **Dynamisk metod**

Se testmetod A.4 för bestämning av ångtrycket.

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

1.6.3 **Destillationsförlopp (kokpunktsintervall)**

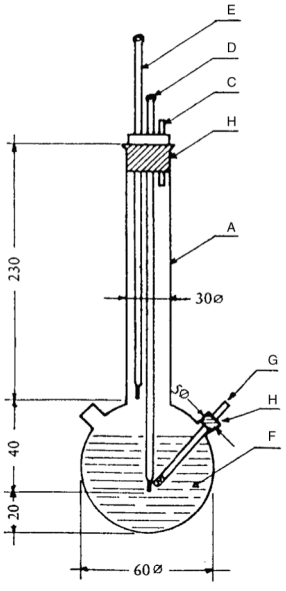
Se tillägg.

1.6.4 **Siwoloboffs metod**

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

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

Figur 1



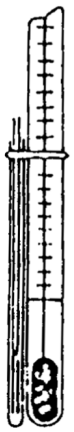
A: Mätkärl
B: Propp
C: Luftningshål
D: Termometer
E: Hjälptermometer
F: Badvätska
G: Provrör, högst 5 mm ytterdiameter, med ett ca 100 mm långt kapillärrör med en innerdiameter av ca 1 mm och en väggtjocklek av ca 0,2 - 0,3 mm.
H: Sidorör

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

▼B

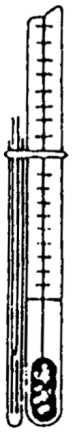
Figur 2

Siwoloboffs princip



Figur 3

Modifierad princip



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

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

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

1.6.5 **Bestämning med fotocell**

Provet uppvärms i ett kapillärrör i ett uppvärmt metallblock.

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

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

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

▼B

1.6.6 **Termisk analys**

1.6.6.1 *Differentiell termisk analys*

Se tillägg.

1.6.6.2 *Differentiell scanningkalorimetri*

Se tillägg.

2. **DATA**

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

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

där:

Δp = (101,325 – p) [observera förtecknet]

P = ptrycket mätt i kPa

f_T = kokpunktens ändring med trycket i K/kPa

T = uppmätt kokpunkt i K

T_n = kokpunkt korrigerad till normalt tryck i K

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

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

Tabell 2:

Temperaturkorrektionsfaktorer f_t

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

▼B

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

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

— Den uppskattade noggrannheten.

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

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

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

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

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

▼B

Tillägg

Kompletterande tekniska uppgifter finns, i följande standarder:

1. **Ebulliometer**

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

2. **Destillationsprocess (kokpunktsintervall)**

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

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

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

▼B

A.3 RELATIV DENSITET

1. METOD

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

1.1 INLEDNING

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

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

1.3 REFERENSÄMNEN (SE HÄNVISNING 1 OCH 3)

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

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Fyra metoder används.

1.4.1 **Flottörmetoder**

1.4.1.1 *Hydrometer (för vätskor)*

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

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

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

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

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

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

▼B

1.4.2 **Pyknometermetoder**

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

1.4.3 **Luftjämförelsepyknometer (för fasta ämnen)**

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

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

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

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

1.6 METODBESKRIVNING

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

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

2. **DATA**

Se standarder.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

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

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

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

▼B

Tabell

Metodernas lämplighet

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

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, rådets beslut K(81) 30 slutligt.
2. R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., kapitel IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, del 1.
3. IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, s. 508.
4. Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Fliüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, s. 427–430.
5. Leopold, H., Die digitale Messung von Flussigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, s. 297–302.
6. Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei fliüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, s. 717–726.
7. Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, s. 253–255.

▼B

Tillägg

Kompletterande tekniska uppgifter finns i följande standarder:

1. **Flottörmetoder**

1.1 Hydrometer

DIN 12790, ISO 3S7	Hydrometer, general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, admjustment and use; Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids Aerometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostatisk balans

För fasta ämnen

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

För vätskor

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3 Metod med nedsänkt kula

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

2. **Pyknometermetoder**

2.1 För vätskor

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

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (för alla typer av viskösa vätskor som inte har för högt ångtryck, särskilt även för färg, lacker och bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (för vätskor enligt DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (särskilt för etanol-vattenblandningar)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tubes (för väts-kor som inte är för tjockflytande)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pykonometric method

▼B

2.2	För fasta ämnen	
	ISO 1183	Metod B i Method for Determining the Density and Relative Density of Plastics excluding Cellular Plastics
	NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Luftjämförelsepyknometer**	
	N	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen: Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4 ÅNGTRYCK

1. METOD

Den här metoden motsvarar OECD TG 104 (2004).

1.1 INLEDNING

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

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

1 atmosfär = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

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

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

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

▼**M1**

Tabell 1

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

(1) Vid användning av en kapacitansmanometer.

1.3 TESTPRINCIP

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

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

där:

p = ångtrycket i pascal

ΔHv = ångbildningsvärmet i J mol^{-1}

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

T = temperaturen i K

▼**M1**

1.4 REFERENSSUBSTANSER

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

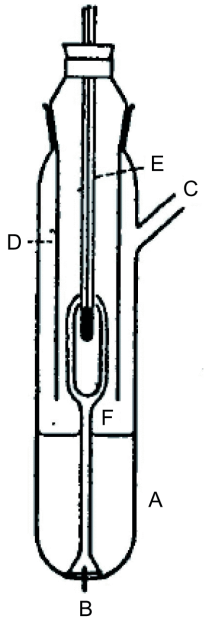
1.5 METODBESKRIVNING

1.5.1 **Dynamisk metod (Cottrells metod)**

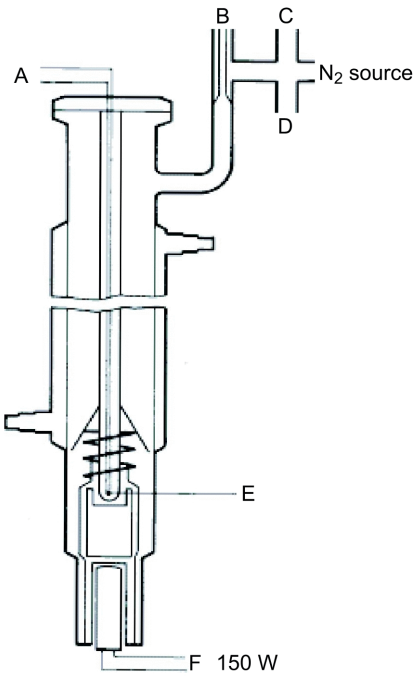
1.5.1.1 *Princip*

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

Figur 1



Figur 2



▼**M1**

Cottrellpump (4)

A: Termoelement

B: Vakuumbuffertvolym

C: Tryckmätare

D: Vakuum

E: Mätpunkt

F: Värmeelement (ca 150 W)

1.5.1.2 *Utrustning*

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

1.5.1.3 *Förfarande*

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

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

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

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

1.5.2 **Statisk metod**

1.5.2.1 *Princip*

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

▼**M1**

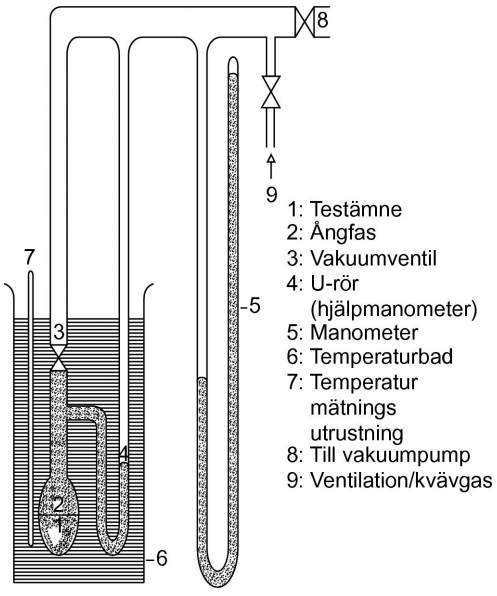
1.5.2.2 *Utrustning*

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

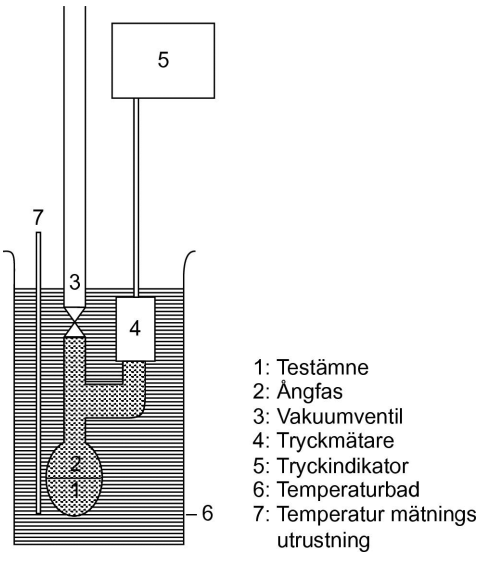
1.5.2.3 *Förfarande*

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

Figur 3 a



Figur 3 b



▼M1

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

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

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

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

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

1.5.3 **Isoteniskopisk metod**

1.5.3.1 *Princip*

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

1.5.3.2 *Utrustning*

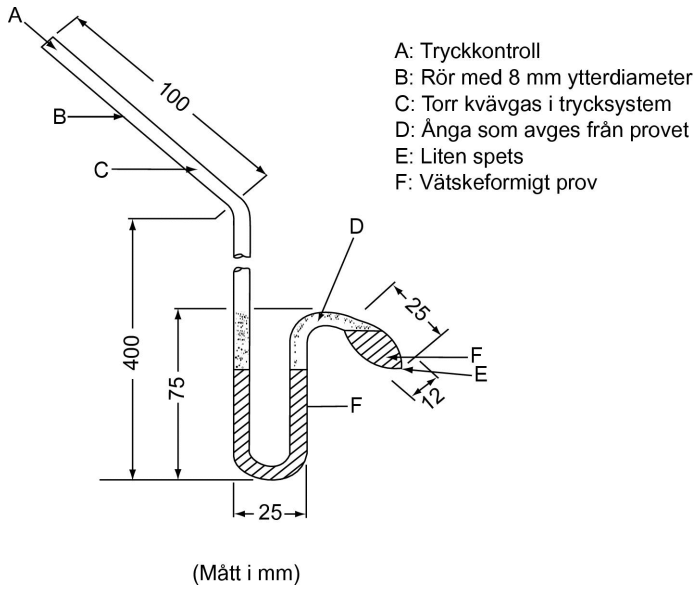
Ett exempel på mätutrustning visas i figur 4. En fullständig beskrivning återfinns i ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3 *Förfarande*

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

Figur 4



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

▼M1

1.5.4 **Effusionsmetod: ångtrycksjämvikt** (7)

1.5.4.1 *Princip*

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

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

där:

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

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

T = temperaturen (K)

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

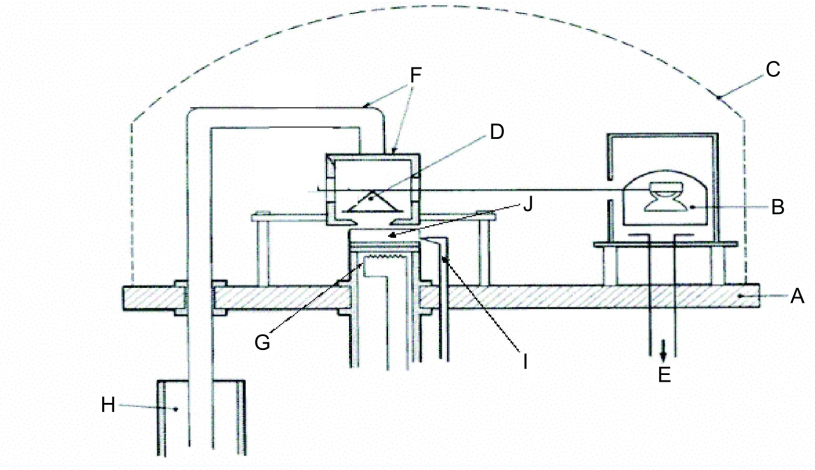
P = ångtrycket (Pa)

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

1.5.4.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för utrustningen illustreras i figur 5.

Figur 5



A: Bottenplatta

B: Vridspoleinstrument

C: Glaskupa

D: Våg med vågskål

E: Vakuummätare

F: Kyllåda och kylstav

G: Förångningsugn

H: Termos med flytande kväve

I: Mätning av provets temperatur

J: Testsubstans

▼M1

1.5.5 **Effusionsmetod: Knudsencell**

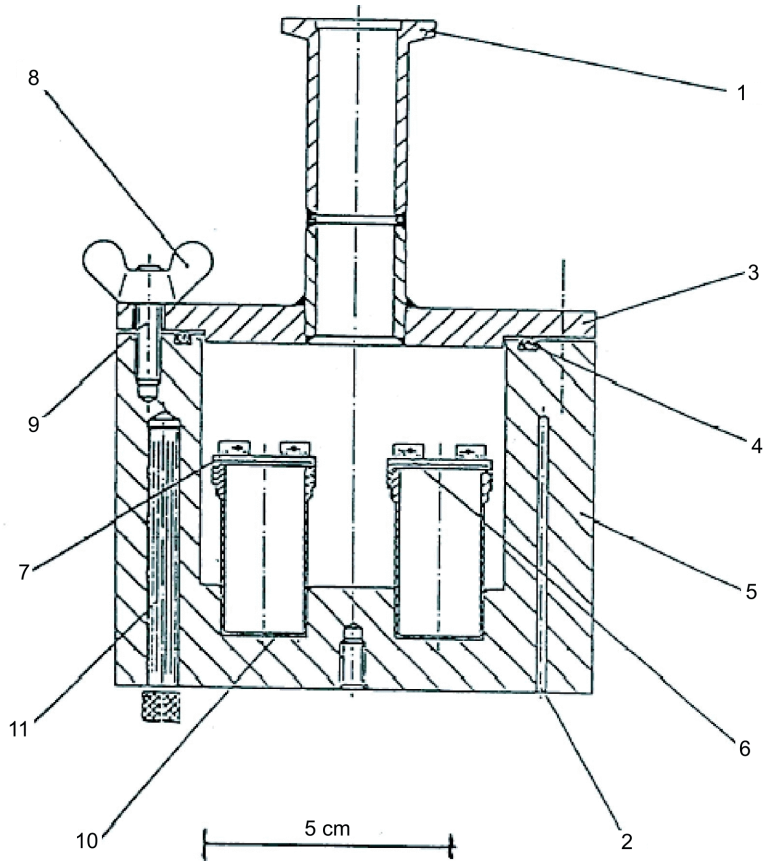
1.5.5.1 *Princip*

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

1.5.5.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för utrustningen illustreras i figur 6.

Figur 6



1: Anslutning till vakuum

2: Öppningar för resistanstermometer av platina eller för mätning och kontroll av temperatur

3: Lock till vakuumbehållare

4: O-ring

5: Vakuumbehållare av aluminium

6: Anordning för införande och borttagande av effusionsceller

7: Skruvlock

8: Vingmuttrar

9: Bultar

10: Effusionsceller av rostfritt stål

11: Värmepatron

▼M1

1.5.6 **Effusionsmetod: isoterm termogravimetri**

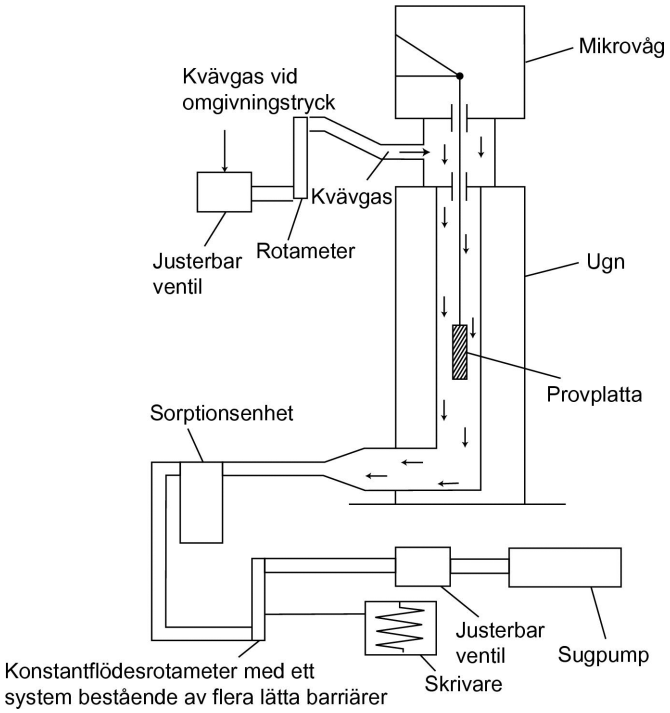
1.5.6.1 *Princip*

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

1.5.6.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för försöksuppställningen visas i figur 7.

Figur 7



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

1.5.6.3 *Förfarande*

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

▼M1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.7 **Gasmättnadsmetod** (23)

1.5.7.1 *Princip*

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

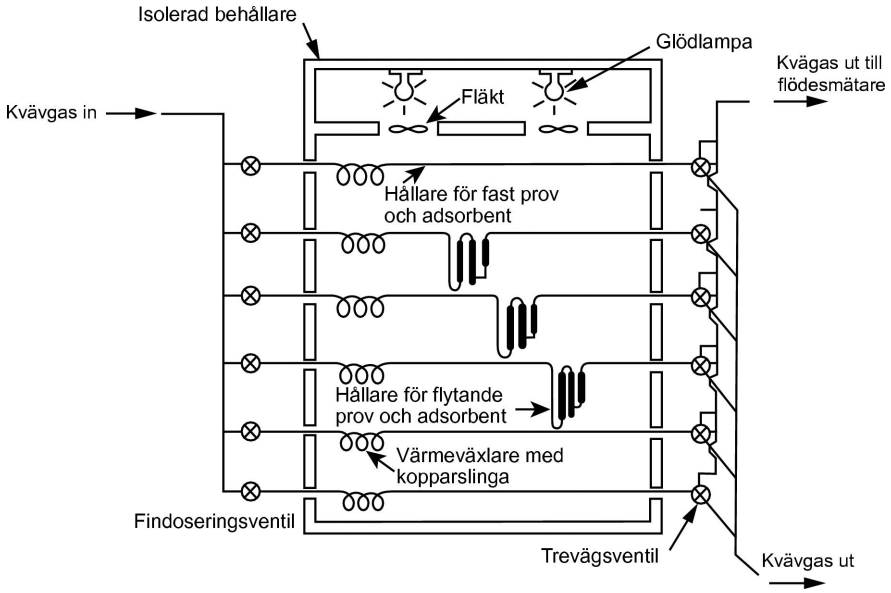
Gasmättnadsmetoden kan användas för både fasta och flytande ämnen. Den kan användas för ångtryck ned till 10^{-10} Pa (10)(11)(12)-(13)(14), men är mest tillförlitlig för ångtryck under 10^3 Pa. Vid högre tryck än 10^3 Pa överskattas vanligen ångtrycket, troligen beroende på aerosolbildning. Eftersom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

1.5.7.2 *Utrustning*

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

▼M1

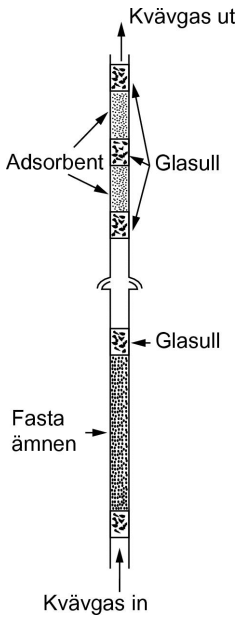
Figur 8



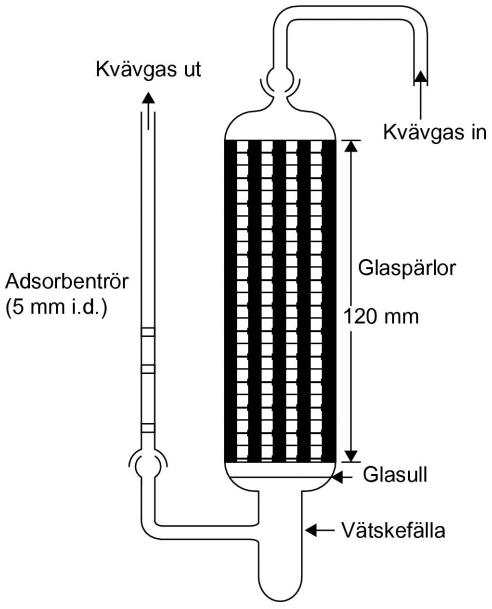
Vanligen används kväve som inert bärgas, men ibland kan det vara nödvändigt att använda en annan gas (24). Bärgasen måste vara torr. Gasströmmen delas upp i sex delströmmar med hjälp av nålventiler (med en öppning på ca 0,79 mm) och leds in i behållaren genom ett kopparrör med 3,8 mm innerdiameter. När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

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

Figur 9



Figur 10



▼**M1**

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

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

1.5.7.3 *Förfarande*

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

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

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

Ångtrycket beräknas enligt följande formel:

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

där:

p = ångtrycket (Pa)

W = den avdunstade testsubstansens massa (g)

V = den mättade gasens volym (m^3)

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

T = temperaturen (K)

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

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

▼M1

1.5.8 **Rotormetod**

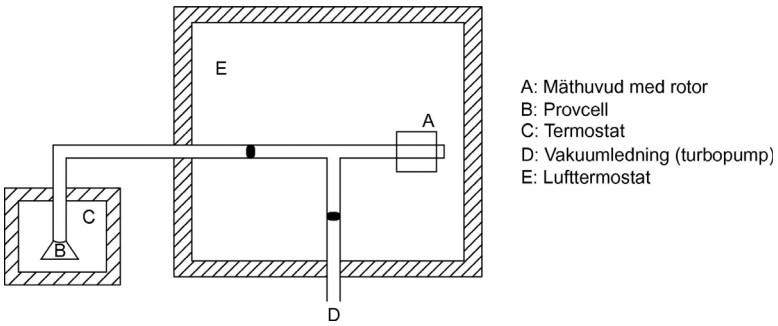
1.5.8.1 *Princip*

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

1.5.8.2 *Utrustning*

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

Figur 11



2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

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

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska omfatta följande information:

— Använd metod.

▼M1

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

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

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

— Alla rådata.

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

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

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

— Förändringens art.

— Temperatur vid vilken förändringen inträffar vid atmosfäriskt tryck.

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

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

3. **LITTERATUR**

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

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

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

4. Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2:a uppl., Van Nostrand Company, New York.

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

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

7. NF T 20–048 AFNOR (september 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼**M1**

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

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

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

11. Tomlin, C.D.S. (red.), The Pesticide Manual, 12:e uppl. (2000).

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

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

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

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

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

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

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

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

20. Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87-(12) (1998) s. 1512–1520.

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼**M1**

Tillägg

Uppskattningsmetod

INLEDNING

Uppskattade värden på ångtrycket kan användas för att

— bestämma vilken försöksmetod som är lämplig,

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

UPPSKATTNINGSMETOD

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

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

BERÄKNINGSFÖRFARANDE

Ångtrycket beräknas enligt följande formel:

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

där:

T = den aktuella temperaturen

T_b = den normala kokpunkten

P_{VP} = ångtrycket vid temperaturen T

ΔH_{Vb} = ångbildningsvärmet

ΔZ_b = kompressionsfaktor (uppskattad till 0,97)

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

Dessutom gäller att

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

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

▼**M1**

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

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

där T_1 är kokpunkten vid det lägre trycket P_1.

RAPPORT

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

LITTERATUR

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

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

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

▼B

A.5 YTSPÄNNING

1. METOD

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

1.1 INLEDNING

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

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Den fria entalpinytan per ytareaenhet betecknas som ytspänning.

Ytspänningen anges som:

N/m (SI-enhet) eller

mN/m (SI-underenhet).

1 N/m = 10^3 dyn/cm

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

1.3 REFERENSÄMNEN

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

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

1.4 TESTMETODSPRINCIPER

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

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

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

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

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

1.6.1 **Plattmetoden**

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

1.6.2 **Bygelmetoden**

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

1.6.3 **Ringmetoden**

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

1.6.4 **OECD-harmoniserad ringmetod**

1.6.4.1 *Apparatur*

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

— flyttbart provbord,

— kraftmätningssystem,

— mätkropp (ring),

— mätkärl.

1.6.4.1.1 Flyttbart provbord

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

1.6.4.1.2 Kraftmätnings system

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

▼B

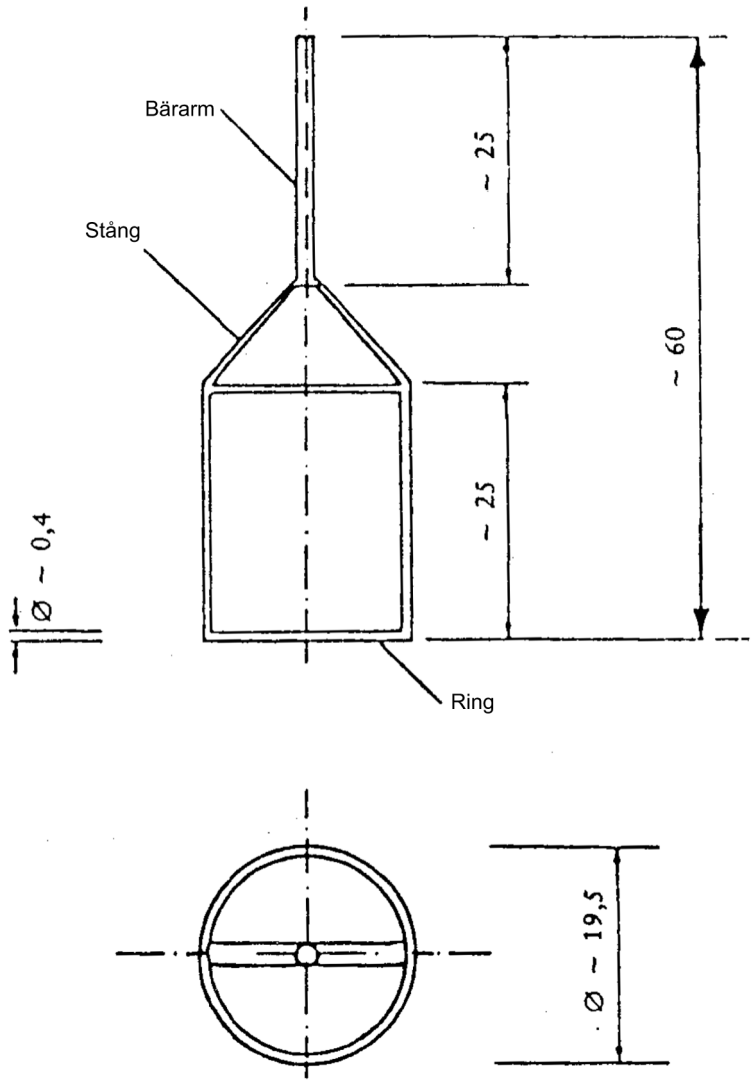
1.6.4.1.3 Mätkropp (ring)

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

Figur

Mätkropp

(Alla mått är angivna i mm)



1.6.4.1.4 Mätkärl

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

▼B

1.6.4.2 *Iordningställande av apparaturen*

1.6.4.2.1 Rengöring

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

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

Anmärkning:

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

1.6.4.2.2 Kalibrering av apparaten

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

Montering;

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

Nollpunktsjustering:

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

Kalibreringar:

Själva provkalibreringen kan utföras genom en av följande två metoder:

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

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

där:

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

m = ryttarens vikt (g)

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

b = ringens medelomkrets (cm)

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

▼B

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

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

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

där:

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

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

1.6.4.3 *Iordningställande av prov*

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

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

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

1.6.5 **Testbetingelser**

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

1.6.6 **Testförfarande**

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

▼B

2. **DATA**

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

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

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

Tabell

Korrektion av den mätta ytspänningen

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

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

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

▼B

Experimentellt värde (mN/m)	Korrigerat värde (mN/m)	
	Viktkalibrering (se 1.6.4.2.2 a)	Vattenkalibrering (se 1.6.4.2.2 b)
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

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

Alternativt kan ytspänningen utan föregående kalibrering beräknas enligt följande formel:

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

där:

F = kraften mätt på dynamometern när hinnan bryts

R = ringens radie

f = korrektionsfaktorn (se hänvisning 1)

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd metod.

— Använd typ av vatten eller lösning.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

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

▼B

— Lösningens koncentration.

— Testtemperaturen.

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

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

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

3.2 TOLKNING AV RESULTAT

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

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

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

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

▼M4

A.6 VATTENLÖSLIGHET

INLEDNING

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

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

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

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

DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

REFERENSKEMIKALIER

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

BESKRIVNING AV METODER

Testbetingelser

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

Inledande test

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

▼M4

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

Tabell 1

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

Kolonnelueringsmetoden

Principen

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

Utrustning

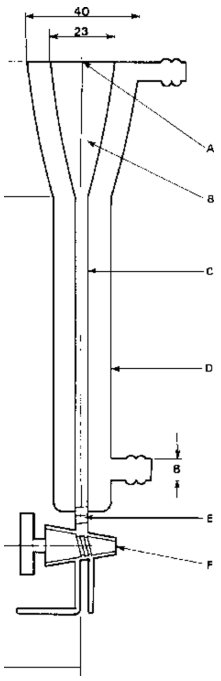
10. Utrustningen består av en mikrokolonn (figur 1), som hålls i konstant temperatur. Den är antingen ansluten till en cirkulationspump (figur 2) eller ett nivåkärl (figur 3). Mikrokolonnen innehåller en inert bärare som hålls på plats av en liten plugg av glasull som också används för att filtrera partiklar.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

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

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

▼**M4**

Figur 1



Dimensioner i mm

A. Anslutning för inslipad hals

B. Gasutrymme

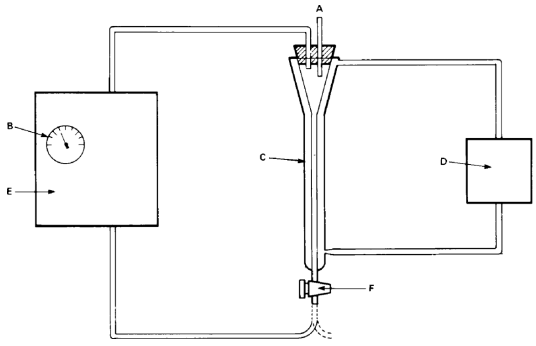
C. Inner 5

D. Ytter 19

E. Plugg av glasull

F. Envägsventil

Figur 2



A. Atmosfärisk jämvikt

B. Flödesmätare

C. Mikrokolonn

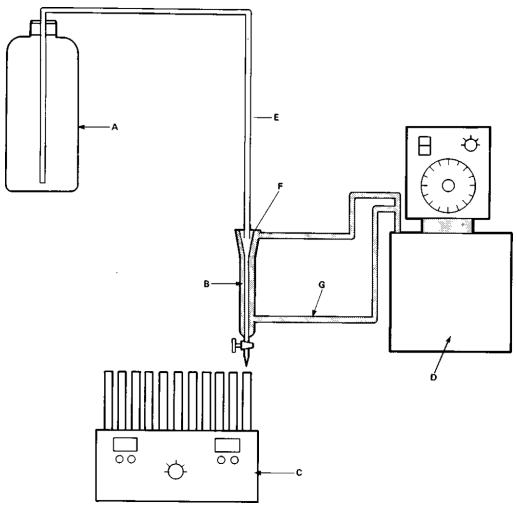
D. Termostatreglerad cirkulationspump

E. Cirkulationspump

F. Tvåvägsventil för provtagning

▼M4

Figur 3



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

B. Kolonn

C. Fraktionsackumulator

D. Termostat

E. Teflonrör

F. Inslipad hals

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

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

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

Procedur vid användning av en cirkulationspump

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

▼M4

Procedur vid användning av ett nivåkärl

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

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

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

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

20. Varje provs pH mäts med särskilda indikatorremsor.

Kolvmetoden

Principen

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

Utrustning

22. Följande material behövs:

— Vanliga laboratorieglas och instrument.

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

— En centrifug (företrädesvis termostatreglerad) om det behövs.

— Analysutrustning.

Procedur

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

▼M4

Testet är lyckat om den uppmätta koncentrationen i åtminstone två av de sista kärlen inte avviker med mer än 15 %. Om resultaten från kärl 1, 2 och 3 visar ökande värden, bör hela testet göras om med längre ekvilibreringstider.

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

25. Varje provs pH mäts med särskilda indikatorremsor.

Analytiska bestämningar

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

DATA OCH RAPPORTERING

Data

Kolonnelueringsmetoden

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

Kolvmetoden

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

Testrapport

Kolonnelueringsmetoden

29. Testrapporten måste innehålla följande information:

— Resultat från det inledande testet.

— Kemisk beteckning och orenheter (eventuellt inledande reningssteg).

— Koncentrationer, flödeshastigheter och pH för varje prov.

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

— Medelvärdet av minst två successiva omgångar.

— Temperaturen på vattnet under mättnadsförloppet.

— Analysmetod.

— Typ av bärämne.

— Laddning av bärämnet.

— Lösningsmedel som används.

— Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnet under testet.

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

▼**M4**

Kolvmetoden

30. Testrapporten måste innehålla följande information:

— Resultat från det inledande testet.

— Kemisk beteckning och orenheter (eventuellt inledande reningssteg).

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

— pH för varje prov.

— Medelvärdet för olika kolvar vilka var i överensstämmelse.

— Testtemperatur.

— Analysmetod.

— Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnet under testet.

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

LITTERATUR

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

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

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

▼B

A.8 FÖRDELNINGSKOEFFICIENT

1. METOD

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

1.1 INLEDNING

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

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

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

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

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

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

Skakkolvmetoden

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

HPLC-metoden

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

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

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

1.4 TESTMETODSPRINCIPER

1.4.1 **Skakkolvmetoden**

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

1.4.2 **HPLC-metoden**

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

▼B

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

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

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

1.5.1 **Repeterbarhet**

Skakkolvmetoden

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

HPCL-metoden

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

1.5.2 **Sensitivitet**

Skakkolvmetoden

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

HPLC-metoden

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

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

▼B

1.5.3 **Specificitet**

Skakkolvmetoden

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

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

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

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Preliminär uppskattning av fördelningskoefficienten.**

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

1.6.2 **Skakkolvmetoden**

1.6.2.1 *Förberedelser*

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

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

Anmärkning:

Vatten som hämtats direkt från en jonbytare får inte användas.

1.6.2.1.1 Förmättnad av lösningsmedlen

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

▼B

1.6.2.1.2 Testförberedelse

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

— Den preliminära uppskattningen av fördelningskoefficienten (se ovan).

— Den minsta mängden testämne som behövs för analysförfarandet.

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

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

1.6.2.1.3 Testämne

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

1.6.2.2 *Testbetingelser*

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

1.6.2.3 *Mätförfarande*

1.6.2.3.1 Uppnående a v fördelningsjämvikt

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

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

1.6.2.3.2 Fasseparation

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

▼B

1.6.2.4 *Analys*

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

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

— fotometriska metoder,

— gaskromatografi,

— högpresterande vätskekromatografi (HPLC).

1.6.3 **HPLC-metoden**

1.6.3.1 *Förberedelser*

Apparatur

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

Mobil fas

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

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

▼B

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

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

Lösningar

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

Försöksbetingelser

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

1.6.3.2 ***Mätningar***

Beräkning av dödtiden t_0

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

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

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

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

▼B

Kalibreringskurva

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

Bestämning av testämnets kapacitetsfaktor

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

2. **DATA**

Skakkolvmetoden

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

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

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

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

För skakkolvmetoden:

— Resultatet från en eventuell preliminär uppskattning.

— Temperatur vid bestämningen.

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

— Eventuell centrifugeringstid och -hastighet.

▼B

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

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

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

— De enskilda P-värdenas standardavvikelse från genomsnittet.

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

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

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

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

För HPLC-metoden:

— Resultatet av en eventuell preliminär uppskattning.

— Test- och referensämnen, och deras renhetsgrad.

— Temperaturområde vid bestämningen.

— Det pH-värde vid vilket bestämningarna gjorts.

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

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

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

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

— Beskrivning av utrustning och driftsbetingelser.

— Elueringsprofiler.

— Den mängd test- och referensämne som tillförts kolonnen.

— Dödtiden och hur den är uppmätt.

▼B

4. **HÄNVISNINGAR**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12. A. Leo, C. Hansch och D. Elkins, artition coefficients and their uses. Chem. Rev. 1971, vol. 71, s. 525.

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

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

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

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

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

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

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

20. J. K. Seydel och K. J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemiw, Weinheim, New York, 1979.

▼B

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

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

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

▼B

Tillägg 1

Metoder för beräkning/uppskattning

INLEDNING

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

Beräknade värden av P_{ow} kan användas

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

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

— som en intern laboratoriekontroll vid eventuella försöksfel,

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

UPPSKATTNINGSMETOD

Preliminär uppskattning av fördelningskoefficient.

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

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

BERÄKNINGSMETODER

Principen för beräkningsmetoderna

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

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

Kvalitetskriteria

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

▼B

Beräkningsmetoder

Hansch Π-metoden

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

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

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

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

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

Rekkers metod

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

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

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

Hansch-Leos metod

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

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

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

Kombinerad metod

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

Anmärkningar

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

▼B

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

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

iv) Revisioner av listor med fragmentkonstanter ska följas noggrant.

Rapportering

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

— Beskrivning av ämnet (blandning, orenheter etc).

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

— Beskrivning av beräkningsmetoden.

— Identifiering eller tillhandahållande av databas.

— Särskilda val av fragment.

— Fullständig dokumentation av beräkningen.

HÄNVISNINGAR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Tillägg 2

Rekommenderade referensämnen för HPLC-metoden

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

▼B

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

▼B

A.9 FLAMPUNKT

1. METOD

1.1 INLEDNING

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

Enheter: ^{o}C

$t = T - 273{,}15$

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

1.3 REFERENSÄMNEN

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

1.4 TESTMETODSPRINCIPER

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

1.5.1 **Repeterbarhet**

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

1.5.2 **Sensitivitet**

Sensitiviteten är beroende av använd testmetod.

1.5.3 **Specificitet**

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

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

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

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

1.6.2 **Testbetingelser**

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

1.6.3 **Testförfarande**

1.6.3.1 *Jämviktsmetoden*

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

1.6.3.2 *Icke-jämviktsmetoden*

Abel-apparat:

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

Abel-Pensky-apparat:

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

Tag-apparat:

Se ASTM D 56.

Pensky-Mårtens-apparat:

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

Anmärkningar:

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

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

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

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

▼B

2. **DATA**

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Den använda metoden ska anges liksom eventuella avvikelser.

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

4. **HÄNVISNINGAR**

Inga.

▼B

A.10 ANTÄNDLIGHET (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1 INLEDNING

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

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Förbränningstiden uttrycks i sekunder.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inte angivna.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Preliminärt screeningtest**

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

1.6.2 **Test för förbränningshastighet**

1.6.2.1 *Förberedelse*

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

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

1.6.2.2 *Testbetingelser*

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

1.6.2.3 *Testförfarande*

Anordna testhögen längs draget i ett dragskåp.

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

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

▼B

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

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

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

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

3.2 TOLKNING AV RESULTATEN

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

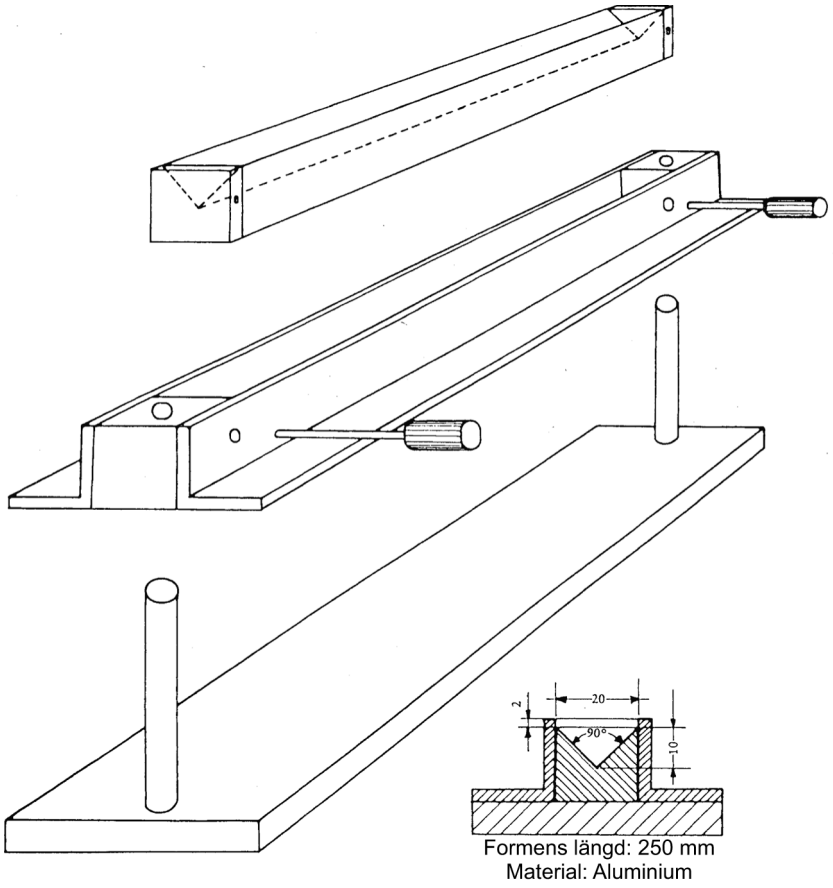
▼B

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för anordning av testhögen

(Alla mått i mm)



▼B

A.11 ANTÄNDLIGHET (GASER)

1. METOD

1.1 INLEDNING

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

1.3 REFERENSÄMNEN

Inte angivet.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

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

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

1.6.2 **Testbetingelser**

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

▼B

1.6.3 **Testförfarande**

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

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— En beskrivning av den använda apparaturen med måttangivelser.

— Temperaturen vid vilken testet gjordes.

— Undersökta koncentrationer och erhållna resultat.

— Testresultaten: inte antändlig gas eller lättantändlig gas.

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

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

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

▼B

A.12 **ANTÄNDLIGHET (KONTAKT MED VATTEN)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

1.3 TESTMETODSPRINCIP

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

1.3.1 **Steg 1**

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

1.3.2 **Steg 2**

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

1.3.3 **Steg 3**

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

1.3.4 **Steg 4**

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

▼B

1.4 REFERENSÄMNE

Inte angivet.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Steg 1**

1.6.1.1 *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur (ca 20 ºC).

1.6.1.2 *Testförfarande*

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

1.6.2 **Steg 2**

1.6.2.1 *Apparatur*

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

1.6.2.2 *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur (ca 20 ºC).

1.6.2.3 *Testförfarande*

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

1.6.3 **Steg 3**

1.6.3.1 *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur.

1.6.3.2 *Testförfarande*

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

▼B

1.6.4 **Steg 4**

1.6.4.1 *Apparatur*

Apparaturen monteras enligt figuren.

1.6.4.2 *Testbetingelser*

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

1.6.4.3 *Testförfarande*

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

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

2. **DATA**

Ämnet anses farligt om

— spontan antändning sker under testförfarandet,

eller

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

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Uppgifter om eventuell inledande behandling av testämnet.

▼B

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

— Den utvecklade gasens kemiska sammansättning.

— Gasens utvecklingshastighet och steg 4 (1.6.4) utfördes.

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

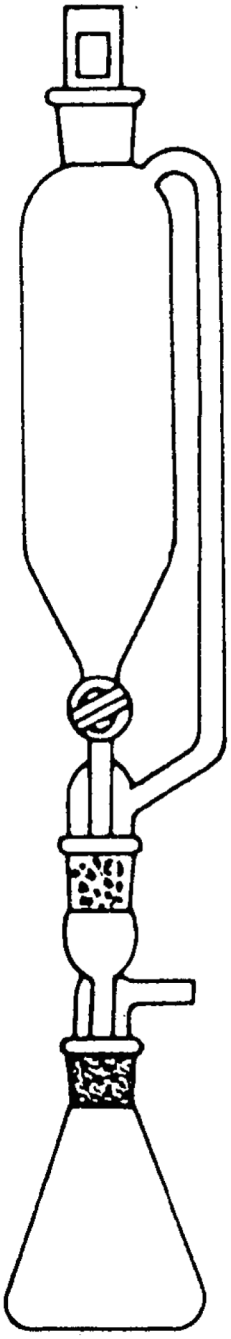
2. NF T 20-040 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Tillägg

Figur

Apparatur



▼B

A.13 **PYROFORISKA EGENSKAPER HOS FASTA OCH FLYTANDE ÄMNEN**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

1.3 REFERENSÄMNEN

Inte angivna.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

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

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

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

Anmärkning:

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

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

▼B

1.6.2 **Testförfarande**

a) *Pulverformiga fasta ämnen*

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

Testet utförs sex gånger såvida inte antändning sker.

b) *Vätskor*

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

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

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

2. **DATA**

2.1 TOLKNING AV RESULTAT

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

2.2 UTVÄRDERING

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

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Testresultaten.

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

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

▼B

A.14 EXPLOSIVA EGENSKAPER

1. METOD

1.1 INLEDNING

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

Metoden består av tre delar:

a) test av värmesensitiviteten (se hänvisning 1),

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

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

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Explosiva:

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

1.3 REFERENSÄMNE

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

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

▼B

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

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

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

1.4.2 **Värmekänslighet**

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

1.4.3 **Mekanisk känslighet (slagpåverkan)**

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

1.4.4 **Mekanisk känslighet (friktion)**

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6 METODBESKRIVNING

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

1.6.1.1 *Apparatur*

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

▼B

1.6.1.2 *Testbetingelser*

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

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

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

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

1.6.1.3 *Testförfarande*

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

▼B

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

1.6.1.4 *Utvärdering*

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

1.6.2 **Mekanisk sensitivitet (slagpåverkan)**

1.6.2.1 *Apparatur (figur 4)*

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

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

1.6.2.2 *Testbetingelser*

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

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

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

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

▼B

1.6.2.3 *Testförfarande*

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

1.6.2.4 *Utvärdering*

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

1.6.3 **Mekanisk sensitivitet (friktion)**

1.6.3.1 *Apparatur (figur 5)*

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

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

1.6.3.2 *Testbetingelser*

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

Fasta ämnen testas i torrt tillstånd och förbereds enligt följande:

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

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

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

▼B

1.6.3.3 *Testförfarande*

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

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

1.6.3.4 *Utvärdering*

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Testämnets beteckning, sammansättning, renhet, fukthalt osv.

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

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

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

— Resultat för varje test.

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

▼B

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

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

3.2 TOLKNING OCH UTVÄRDERING AV RESULTAT

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

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Test and criteria., 1990, Förenta nationerna, New York.

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

3. Koenen, H., Ide, K. och Swart, K. H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, s. 6–13 och 30–42.

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

▼B

Tillägg

Exempel på materialspecifikation för värmesensitivitetstestet (se DIN 1623)

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

Figur 1

Apparatur för värmesensitivitetstest

(Alla mått i mm)

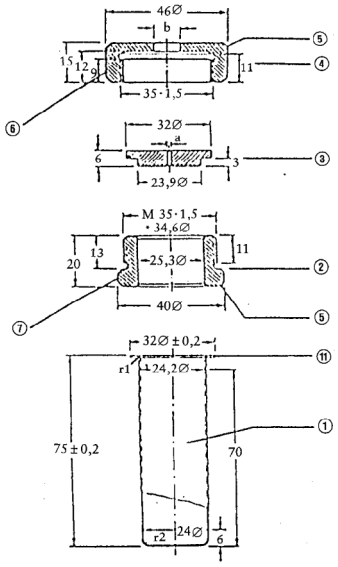


Fig. 1a Stålrör och tillbehör

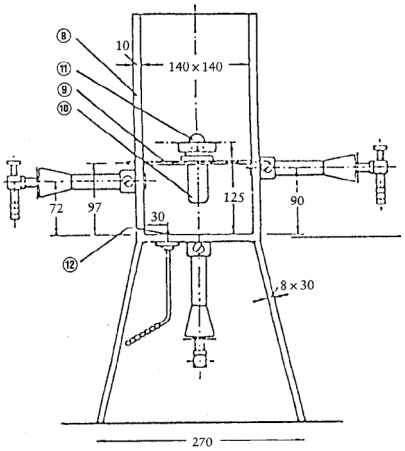


Fig. Ib Värme- och skyddsanordning

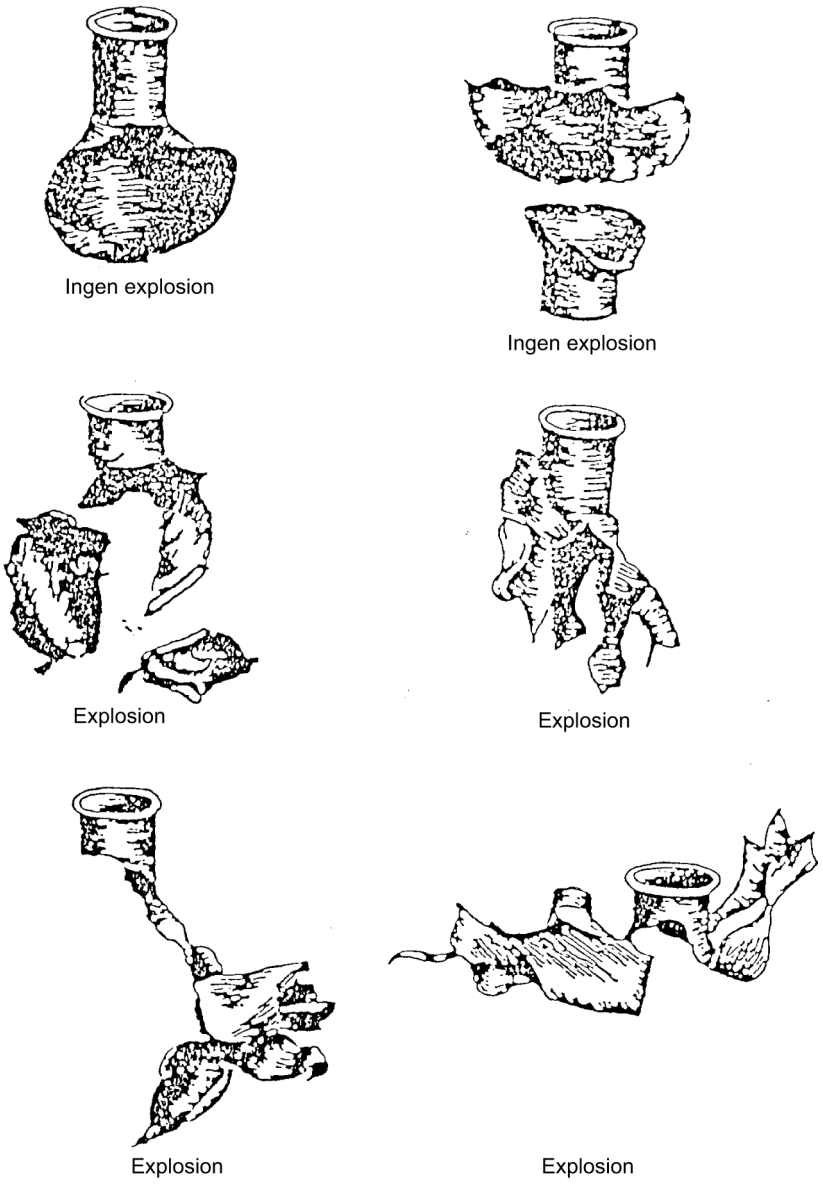
1. rör
1a. utvandig fläns
2. gängad krage, lågfriktionsgänga
3. strypfläns a = 2.0 eller 6.0 mm i diameter
4. mutter b = 10 mm i diameter
5. fasad yta
6. 2 tag för nyckelvidd 41
7. 2 tag för nyckelvidd 36
8. splitterfri låda
9. 2 stödpinnar för ror
10. provrör
11. position för bakre brännare, de andra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

▼B

Figur 2

Värmesensitivitetstest

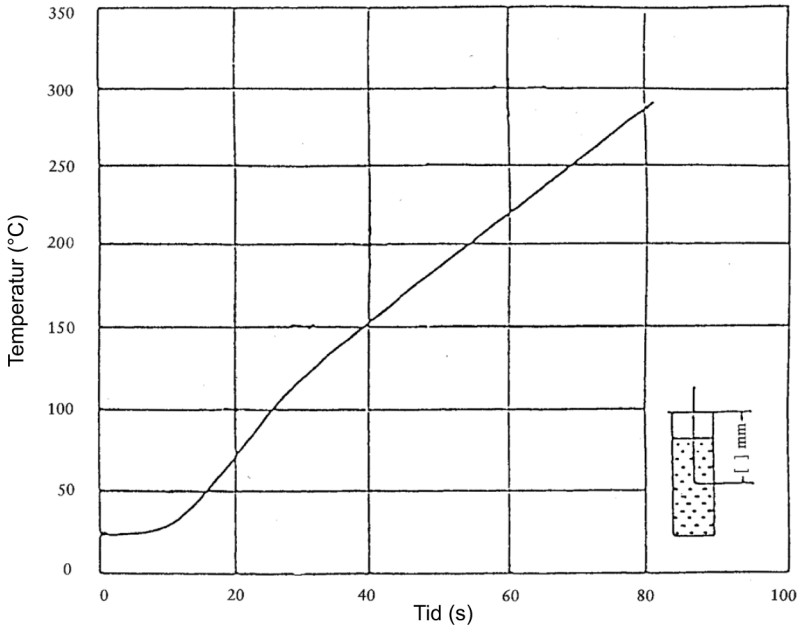
Exempel på fragmentering



▼B

Figur 3

Kalibrering av uppvärmningshastigheten vid test av värmesensitivitet



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

▼B

Figur 4

Slagpåverkanapparatur

(Alla mått i mm)

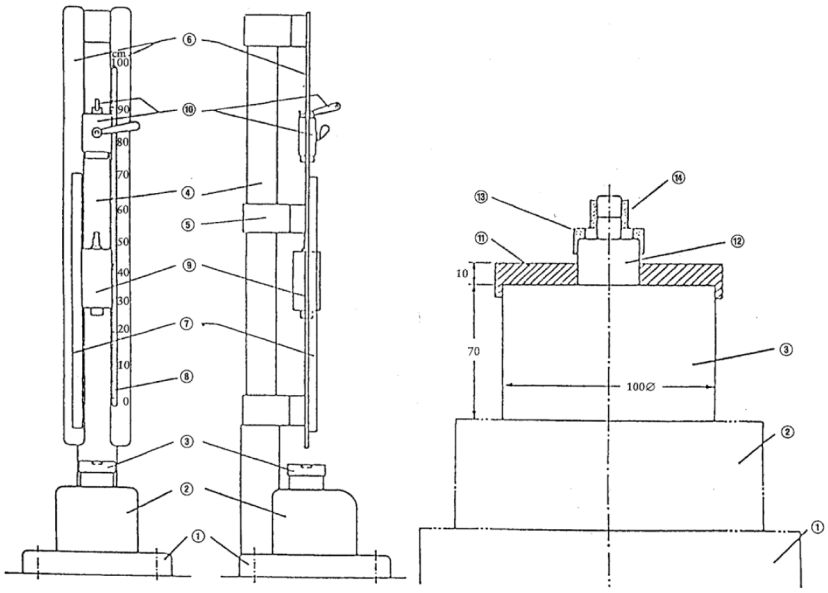


Fig. 4a Fallhammare, framifrån och från sidan, allmän överblick

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

Fig. 4b Fallhammare, lägre del

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

▼B

Figur 4

Fortsättning

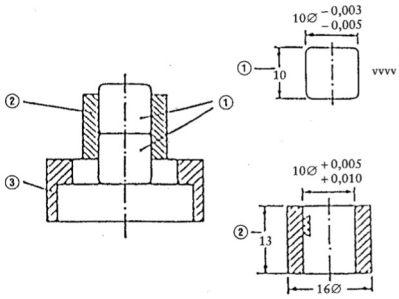


Fig. 4c Slagpåverkananordning för ämnen i pulver- eller pastaform

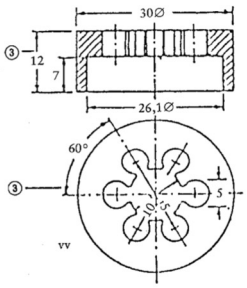
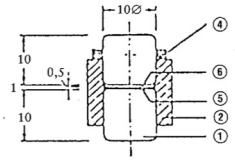


Fig. 4d Slaganordning för vätskor

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



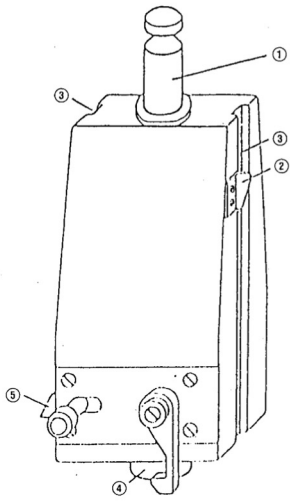


Fig. 4e Hammare (fallvikt 5 kg)

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

▼B

Figur 5

Apparatur för friktionssensitivitet

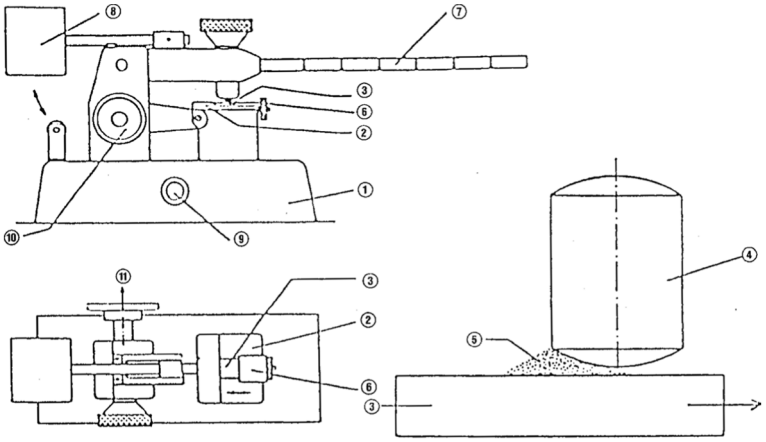


Fig. 5a Friktionsapparatur: vertikalprojektion och grundritning

Fig. 5b Startposition for pinne på prov

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

▼B

A.15 **SJÄLVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (VÄTSKOR OCH GASER)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

1.3 REFERENSÄMNEN

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

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheten varierar beroende på självantändlighetens temperaturområde och den använda testmetoden.

Sensitiviteten och specificiteten beror på den använda testmetoden.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

Apparaturen finns beskriven i den metod som avses i 1.6.3.

1.6.2 **Testbetingelser**

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

1.6.3 **Testförfarande**

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

▼B

2. **DATA**

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

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specifikation av ämnet (beteckning och orenheter).

— Mängden använt prov, atmosfäriskt tryck.

— Använd apparatur.

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

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

4. **HÄNVISNINGAR**

Inga.

▼B

A.16 **RELATIV SJÄLVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (FASTA ÄMNEN)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

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

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

1.6.1.1 *Ugn*

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

▼B

1.6.1.2 *Kub av ståltrådsnät*

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

1.6.1.3 *Termoelement*

Passande termoelement.

1.6.1.4 *Skrivare*

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

1.6.2 **Testbetingelser**

Ämnen testas i sin kommersiella form.

1.6.3 **Testförfarande**

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

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

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— En beskrivning av testämnet.

— Mätresultaten inklusive temperatur/tidskurvor.

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

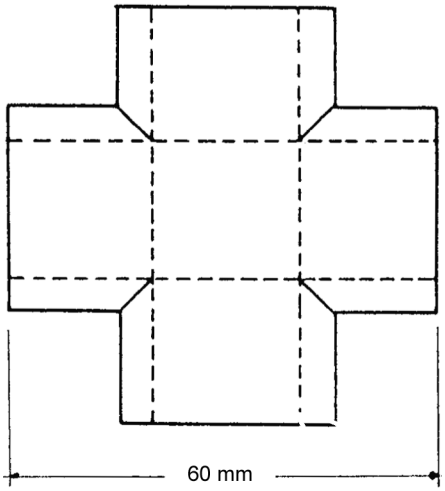
4. **HÄNVISNINGAR**

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

▼B

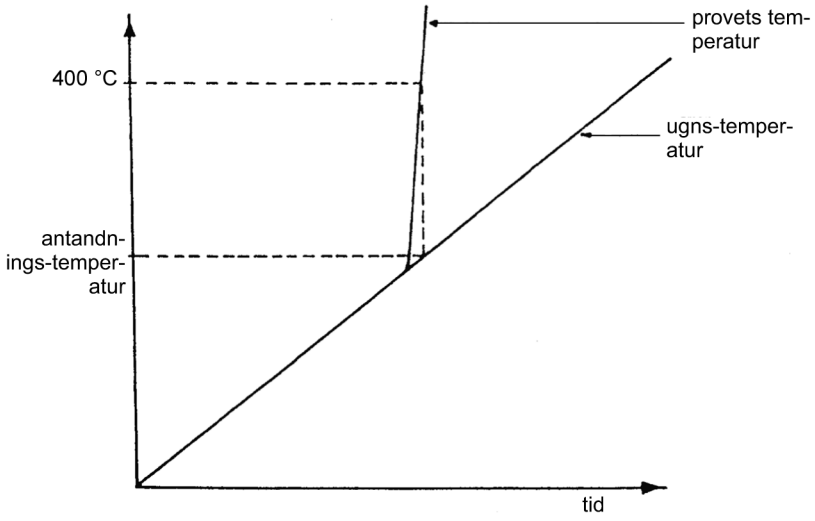
Figur 1

Mall till 20 mm testkub



Figur 2

Typisk temperatur/tidskurva



▼B

A.17 OXIDERANDE EGENSKAPER (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1 INLEDNING

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

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

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

Brännhastighet: Uttrycks i mm per sekund.

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

1.3 REFERENSÄMNE

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

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

1.4 TESTMETODSPRINCIP

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

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

1.5 KVALITETSKRITERIER

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

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

1.6.1.1 *Testämne*

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

Valfri malnings- och siktningsmetod som uppfyller kvalitetskriterierna får användas.

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

1.6.1.2 *Brännbart ämne*

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

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

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

1.6.1.3 *Antändningskälla*

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

1.6.2 **Testförfarande**

Anmärkning:

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

1.6.2.1 *Förberedande test*

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

▼B

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

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

Ämnet anses vara oxiderande om reaktionen är kraftfull.

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

1.6.2.2 *Fullständigt test*

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

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

Högen placeras i dragskåpet tvärs över luftdragets riktning.

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

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

Ena änden av högen tänds på genom beröring av lågan.

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

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

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

▼B

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

2. **DATA**

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

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

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

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

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

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

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Testämnets beteckning, sammansättning, renhet, fukthalt osv.

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

— Använd antändningskälla.

— Mätresultaten.

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

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

— Resultat av eventuella tester med ett inert ämne.

— Resultat av eventuella tester i inert atmosfär.

▼B

3.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Ett ämne ska anses vara ett oxiderande ämne om

a) en kraftig reaktion inträffar under det inledande screeningtestet

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

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

4. **HÄNVISNINGAR**

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

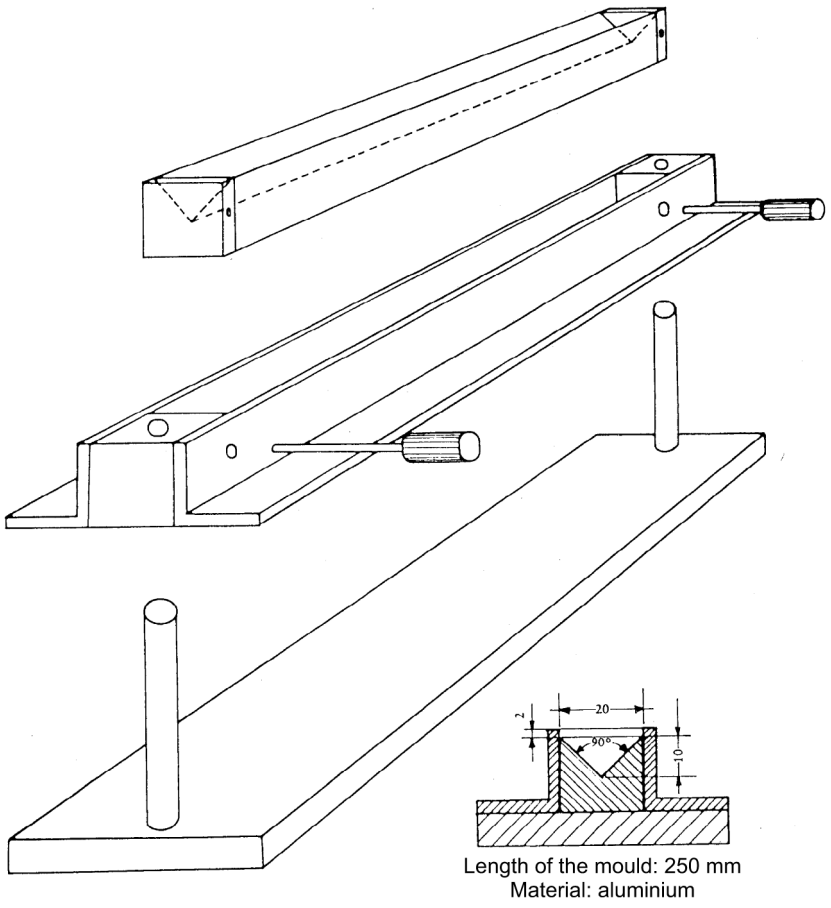
▼B

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för iordningställande av högen

(Alla mått i mm)



▼B

A.18 MOLEKYLÄR MEDEL VIKT OCH MOLEKYLÄR VIKTFÖRDELNING AV POLYMERER

1. METOD

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

1.1 INLEDNING

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

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

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

där:

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

M_i är polymerfraktionens molekylvikt vid den kvarhållna volymen V_i, och

n är antalet datapunkter.

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

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

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

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

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

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

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

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

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

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

▼B

1.5 KVALITETSKRITERIER

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

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

(M_p är standardämnets molekylvikt vid toppvärdet.)

1.6 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.6.1 **Beredning av lösningar med standardpolystyren**

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

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

1.6.2 **Beredning av provlösningen**

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

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

1.6.3 **Apparater**

— Lösningsbehållare.

— Avluftningsapparat (när så krävs).

— Pump.

▼B

— Pulsdämpare (när så krävs).

— Injektionssystem.

— Kromatografikolonner.

— Detektor.

— Flödesmätare (när så krävs).

— Apparat för registrering/bearbetning av data.

— Avfallskärl.

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

1.6.4 **Injektions- och lösningstillförselsystem**

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

1.6.5 **Kolonn**

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

1.6.6 **Teoretiska plattor**

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

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

där:

N = är antalet teoretiska nivåer,

V_e = är elutionsvolymen vid toppvärdet,

▼B

W = är toppvärdets baslinjebredd, och

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

1.6.7 **Separationseffektivitet**

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

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

där:

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

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

Systemets upplösning definieras normalt som:

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

där:

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

W_1 och W_2 = är baslinjebredden vid toppvärde och

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

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

1.6.8 **Lösningsmedel**

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

1.6.9 **Temperaturövervakning**

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

▼B

1.6.10 **Detektor**

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

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 DATA

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

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

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

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

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

2.2 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska innehålla följande information:

2.2.1 **Undersökt ämne**

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

▼B

— Beskrivning av hanteringen av provet, anmärkningar, problem.

2.2.2 **Instrument**

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

— Pump, pulsdämpare, injektionssystem.

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

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

— Information om topparnas symmetri.

— Kolonntemperatur, typ av temperaturövervakning.

— Detektor (mätprincip, typ, kuvettvolym).

— Flödesmätare om sådan används (tillverkare, mätprincip).

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

2.2.3 **Systemkalibrering**

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

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

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

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

  — Provets namn.

  — Provets tillverkare.

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

  — Insprutningsvolym och insprutningskoncentration.

▼B

— M_p-värde för kalibrering.

— Elueringsvolym eller korrigerad retentionstid mätt vid maximalt toppvärde.

— M_p beräknat vid maximalt toppvärde.

— Procentfel för beräknat M_p och kalibreringsvärde.

2.2.4 **Bedömning**

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

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

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

— Beskrivning av utjämningsmetoder, om sådana används.

— Beredning av och förbehandlingsprocedurer för provet.

— Närvaro av oupplösta partiklar, om sådana förekommit.

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

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

— Detaljerad beskrivning av alla ändringar i provningsförfarandet.

— Detaljerade uppgifter om felområden.

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

3. **HÄNVISNINGAR**

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

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

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

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

▼B

Bilaga

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

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

1. **Utnyttjande av kolligativa egenskaper**

1.1 Ebullioscopi/kryoscopi

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

Tillämpningsbarhet: $M_n < 20\,000$.

1.2 Sänkning av ångtryck

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

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

1.3 Membranosmometri

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

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

1.4 Ångfasosmometri

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

Tillämpningsbarhet: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Ändgruppanalys**

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

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

3. **Hänvisningar**

1. Billmeyer, F.W. Jr., (1984), Textbook of Polymer Science (ung. Textbok om polymerforskning), tredje utg., John Wiley, New York.
2. Glover, C.A., (1975), Absolute Colligative Property Methods (ung. Absoluta metoder för bestämning av kolligativa egenskaper), kapitel 4, In: Polymer Molecular Weights (ung. Polymerers molekylvikt), Part I P.E. Siade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
3. ASTM D 3750-79, (1979), Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry (ung. Standardmetod för bestämning av numerisk medelmolekylvikt med membranosmometri i polymerer). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. Coll, H. (1989), Membrane Osmometry (Membranosmometri). In: Determination of Molecular Weight (Bestämning av molekylvikt), A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, s. 25–52.
5. ASTM 3592-77, (1977), Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure (ung. Rekommenderad standardmetod för bestämning av molekylvikt med hjälp av ångtryck), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
6. Morris, C.E.M., (1989), Vapour Pressure osmometry (Ångtrycksosmometri). In: Determination of Molecular Weight (Bestämning av molekylvikt), A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
7. Schröder, E., Muller, G., och Arndt, K-F., (1989), Polymer Characterisation (Polymerkarakterisering), Carl Hanser Verlag, München.
8. Garmon, R.G., (1975), End-Group Determinations (ung. Bestämning av ändgrupper) kapitel 3 In: Polymer Molecular Weights (Polymerers molekylvikt), Del 1, P.E. Siade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
9. Amiya, S., et al. (1990), Pure and Applied Chemistry (ung. Ren och tillämpad kemi), 62, 2139–2146.

▼B

A.19 **INNEHÅLL AV LÅGMOLEKYLVIKTSPOLYMERER**

1. **METOD**

Denna kromatografiska metod (genomträngning i gelé) är en kopia på OECD TG 119 (1996). Grundläggande principer och annan teknisk information finns i hänvisningarna.

1.1 INLEDNING

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

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

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Låg molekylvikt definieras som en molekylvikt under 1 000 dalton.

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

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

där:

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

M_i = är polymerfraktionens molekylvikt vid den kvarhållna volymen V_i, och n är antalet datapunkter.

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

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

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

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

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

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

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

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

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

Detektionen utförs med t.ex. reflektionsindex eller UV-absorbtion och ger en enkel fördelningskurva. För att kunna tillskriva kurvan den faktiska molekylvikten måste kolonnen kalibreras genom att polymerer med känd molekylvikt och helst i stort sett liknande struktur, t.ex. olika standardpolysterener, tillåts passera genom kolonnen. Normalt fås en typisk Gaus-kurva, ibland utdragen i en mindre svans på sidan för den låga molekylvikten, om de vertikala axlarna anger mängden, i förhållande till vikten, för de olika molekylvikter som elueras, och den horisontella axeln står för den logaritmiska molekylvikten.

▼B

Innehållet med låg molekylvikt härleds från denna kurva. Beräkningen kan bara bli korrekt om innehållet av lågmolekylviktarter är jämnt fördelat i polymermassan.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheten (relativ standardavvikelse: RSD) för elutionsvolymen ska vara bättre än 0,3 %. Nödvändig repeterbarhet för analysen måste säkerställas genom korrigering enligt intern standard om ett kromatogram bedöms vara tidsberoende och inte omfattas av ovannämnda kriterier (1). Spridningen beror på standardämnets molekylvikt. Följande värden är typiska för standardpolystyren:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p är standardämnets molekylvikt vid toppvärdet.)

1.6 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.6.1 **Beredning av lösningar med standardpolystyren**

Standardpolystyrenen löses noggrant genom blandning i vald eluent. Hänsyn måste tas till tillverkarens rekommendationer vid beredning av lösningarna.

Koncentrationen av de standardämnen som väljs beror på olika faktorer, t.ex. injektionsvolym, lösningsviskositet och den analytiska detektorns känslighet. Maximal injektionsvolym måste anpassas till kolonnens längd för undvikande av överbelastning. Typiska injektionsvolymer for analytiska separationer med GPC och en kolonn på 30 cm × 7,8 mm ligger mellan 40 och 100 µl. Större volymer kan användas men bör inte överstiga 250 µl. Det optimala förhållandet mellan injektionsvolvm och koncentration måste fastställas innan kolonnen kalibreras.

1.6.2 **Beredning av provlösningen**

I princip gäller samma krav för beredning av provlösning. Provet löses upp i lämpligt lösningsmedel, t.ex. tetrahydrofuran (THF), genom omsorgsfull skakning. Det får under inga omständigheter lösas upp i ultraljudsbad. Vid behov kan provlösningen renas genom ett membranfilter, med en finhet på mellan 0,2 och 2 µm.

Förekomst av oupplösta partiklar måste registreras i slutrapporten, eftersom dessa kan bero på högviktsmolekyler. Lämplig metod ska användas för fastställande av viktandelen oupplösta partiklar. Lösningen bör användas inom 24 timmar.

▼B

1.6.3 **Korrigering för innehåll av föroreningar och tillsatser**

Korrigering av artinnehållet av M < 1 000 för bidraget från närvarande icke-po! ymera specifika komponenter (t.ex. föroreningar och/eller tillsatser) krävs normalt, med mindre det uppmätta innehållet redan är mindre än 1 %. Detta fås genom direkt analys av polymerlösningen eller GPC-eluaten.

När eluaten efter passage genom kolonnen ska spädas för ytterligare analys, ska den vara koncentrerad. Det kan vara nödvändigt att evaporera eluaten till torrhet och lösa upp den igen. Eluatkoncentrationen ska göras under förhållanden som garanterar att inga förändringar uppstår i eluaten. Hanteringen av eluaten efter GPC-steget är beroende av den analysmetod som används för mängdbestämningen.

1.6.4 **Apparater**

GPC-apparater består av följande komponenter:

— Lösningsbehållare.

— Avluftningsapparat (när så krävs).

— Pump.

— Pulsdämpare (när så krävs).

— Injektionssystem.

— Kromatografikolonner.

— Detektor.

— Flödesmätare (när så krävs).

— Apparat för registrering/bearbetning av data.

— Avfallskärl.

Det måste säkerställas att GPC-systemet är inert avseende använda lösningsmedel, t.ex. genom användning av stålkapilär för THF-lösningen.

1.6.5 **Injektions- och lösningstillförselsystem**

En definierad volym av lösningsprovet fylls i kolonnen, antingen automatiskt eller manuellt, i en tydligt definierad zon. Alltför snabb utdragning eller intryckning av kolven i sprutan, om fyllningen sköts manuellt, kan förorsaka förändringar i den observerade molekylviktfördelningen. Systemet för tillförsel av lösning ska så långt möjligt vara pulsfritt, helst med inbyggd pulsdämpning. Flödeshastigheten ska vara ca 1 ml/min.

1.6.6 **Kolonn**

Polymeren kännetecknas, beroende på provet, antingen genom användning av enkel kolonn eller flera kolonner kopplade i serie. Ett antal porösa kolonnmaterial med definierade egenskaper, t.ex. porstorlek, exklutionsgränser osv. finns kommersiellt tillgängliga. Val av separationsgelé och kolonnlängd beror både på provets egenskaper (hydrodynamisk volym, molekylviktfördelning) och specifika förhållandena för separationen, som t.ex. lösning, temperatur och flödeshastighet (1) (2) (3).

▼B

1.6.7 **Teoretiska nivåer**

Den kolonn eller kolonnkombination som används för separationen måste karakteriseras av antalet teoretiska nivåer. Detta inkluderar, när THF används som elutionslösning, fyllning av en lösning av etylbensen eller annan lämplig icke-polär lösning i en kolonn med känd längd. Antalet teoretiska nivåer fås med följande ekvation:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{där:} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

eller,

N = är antalet teoretiska nivåer,

V_e = är elutionsvolymen vid toppvärdet,

W = är toppvärdets baslinjebredd, och

$W_{1/2}$ = är toppbredden vid halva höjden.

1.6.8 **Separationseffektivitet**

Förutom antalet teoretiska nivåer, som styr bandbredden, spelar också separationseffektiviteten, som bestäms av lutningen på kalibreringskurvan, en viss roll. Separationseffektiviteten för en kolonn fås med följande förhållande:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonelés tvärsnittarea}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

där:

Ve, M_x = är elutionsvolymen för polystyren med molekylvikten M_x, och

$V_{e,(10Mx)}$ = är elutionsvolymen för polystyren med en tio gånger större molekylvikt.

Systemets upplösning definieras normalt som:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

där:

Ve1 och V_{e2} = är elutionsvolymerna för de två standardpolystyrenerna vid maximalt toppvärde,

W_1 och W_2 = är baslinjebredden vid toppvärde, och

M_1 och M_2 = är molekylvikten vid maximalt toppvärde (bör skilja sig åt med en faktor på 10).

R-värdet för kolonnsystemet bör vara större än 1,7 (4)

▼B

1.6.9 **Lösningsmedel**

Samtliga lösningsmedel måste ha hög renhet (för THF används en renhet på 99,5 %). Lösningsmedelsbehållaren, om nödvändigt i en inert gasatmosfär ska vara tillräckligt stor för kalibrering av kolonnen och flera provanalyser. Lösningsmedlet ska avgasas innan det via pumpen transporteras till kolonnen.

1.6.10 **Temperaturövervakning**

Temperaturen i de kritiska, interna komponenterna (injektionsslinga, kolonn, detektor och rörsystem) ska vara jämn och anpassad till valt lösningsmedel.

1.6.11 **Detektor**

Syftet med detektorn är att kvantitativt registrera koncentrationen i det prov som elueras från kolonnnen. För att undvika onödig breddning av toppvärden ska detektorcellens kuvettvolym hållas sä liten som möjligt. Den bör inte vara större än 10 µl, utom for lattffyktiga och tunna detektorer. Differentialrefraktometri används vanligtvis för detektion. Om provets eller elutionslösningens särskilda egenskaper så kräver kan emellertid andra detektortyper användas, t.ex. UV/VIS, IR- eller viskositetsdetektorer osv.

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Detaljerade utvärderingskriterier och krav avseende insamling och bearbetning av data ska uppfylla kraven i DIN-standarden (1).

Två sinsemellan oberoende experiment ska utföras för varje prov. Experimenten ska analyseras individuellt. Det är alltid viktigt att också ta fram data från blankprover, behandlade på samma sätt som det verkliga provet.

Det är nödvändigt att uttryckligen ange att uppmätta värden är relativa värden, ekvivalenta mot molekylvikten för det standardämne som använts.

Efter fastställande av retentionsvolymerna eller retentionstiderna (eventuellt korrigerade med en intern standard), plottas log M_p-värdena (M_p är maximalt toppvärde för kalibreringsämnet) mot en av nämnda mängder. Minst två kalibreringspunkter krävs per tiotal molekylvikter och minst fem mätpunkter för den totala kurvan, som ska täcka provets uppskattade molekylvikt. Kalibreringskurvans ändpunkt för den låga molekylvikten definieras av n-hexylbenzen eller annan lämplig icke-polär lösning. Den del av kurvan som svarar mot molekylvikter under 1 000 bestäms och korrigeras för föroreningar och tillsatser efter behov. Elutionskurvorna bedöms i allmänhet med hjälp av elektronisk databehandling. Om manuell digitalisering används kan råd hämtas från ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Om någon olöslig polymer blir kvar i kolonnen är dess molekylvikt troligen högre än den upplösta fraktionen och om hänsyn inte tas därtill kommer den; att ge en för hög bedömning av innehållet lågmolekylvikter. Riktlinjer för korrigering av innehållet av lågmolekylvikten för olöslig polymer ges i bilagan.

Fördelningskurvan ska presenteras i tabellform eller som ett diagram (differentialfrekvens eller summa procentandel mot log M). I den grafiska presentationen ska varje tiotal molekylvikter normalt ha en bredd på 4 cm, och maximalt toppvärde ska ligga på ungefär 8 cm höjd. Vid intregralfördelningskurvor ska skillnaderna mellan 0 och 100 % vara ungefär 10 cm.

2.2 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska innehålla följande information.

2.2.1 **Undersökt ämne**

— Tillgänglig information om det undersökta ämnet (identitet, tillsatser, föroreningar).

— Beskrivning av hanteringen av provet, anmärkningar, problem.

2.2.2 **Instrument**

— Eluentbehållare, inertgas, avgasning av eluenten, eluentens sammansättning, föroreningar.

— Pump, pulsdämpare, injektionssystem.

— Separationskolonner (tillverkare, all information om kolonnernas karakteristika, som porstorlek, typ av separationsmaterial osv., antal, längd och inbördes ordning på använda kolonner).

— Antal teoretiska nivåer i kolonnen eller kolonnkombinationen, separationseffektivitet (systemupplösning).

— Information om topparnas symmetri.

— Kolonntemperatur, typ av temperaturövervakning.

— Detektor (mätprincip, typ, kuvettvolym).

— —Flödesmätare om sådan används (tillverkare, mätprincip).

— System för registrering och bearbetning av data (hårdvara och mjukvara).

2.2.3 **Systemkalibrering**

— Detaljerad beskrivning av den metod som används för konstruktion av kalibreringskurvan.

▼B

— Information om kvalitetskriterier för den aktuella metoden (t.ex. koordinationskoefficient, kvadraternas summeringsfel osv.).

— Information om all extrapolering, alla antaganden och approximeringar gjorda under experimentproceduren samt om bedömning och bearbetning av data.

— Alla mätningar som gjorts för konstruktion av kalibrenngskurvan ska dokumenteras i en tabell som inkluderar följande information för varje kalibreringspunkt:

  — Provets namn.

  — Provets tillverkare.

  — Karakteristikvärden för standardämnena M_p, M_n, M_w och M_w/M_n, enligt tillverkaren eller från efterföljande mätningar, tillsammans med detaljerade uppgifter om fastställandemetoden.

  — Injektionsvolym och insprutningskoncentration.

  — M_p värde för kalibrering.

  — Elueringsvolym eller korrigerad retentionstid mätt vid maximalt toppvärde.

  — M_p beräknat vid maximalt toppvärde.

  — Procentfel för beräknat M_p och kalibreringsvärde.

2.2.4 **Information om innehåll av lågmolekylvikt i polymer**

— Beskrivning av de metoder som används för analys och hur experimentet utfördes.

— Information om andelen innehåll lågmolekylviktarter (w/w) för hela provet.

— Information om föroreningar, tillsatser och andra icke-polymera arter, som viktandel i förhållande till hela provet.

2.2.5 **Bedömning**

— Bedömning på tidsbasis: metoder som används för att säkerställa önskad reproducerbarhet (korrek tionsmetod, intern standard osv.).

— Information om huruvida bedömningen gjorts på basis av elutionsvolymen eller retentionstiden.

— Information om gränserna för bedömningen, om ett toppvärde inte analyserats fullständigt.

— Beskrivning av utjämningsmetoder, om sådana används.

— Beredning av och förbehandlingsprocedurer för provet.

— Närvaro av oupplösta partiklar, om sådana förekommit.

▼B

— Injektionsvolym (μ1) och injektionskoncentration (mg/ml).

— Anmärkningar om effekter som lett till avvikelser från den ideala GPC-profilen.

— Detaljerad beskrivning av alla ändringar i provningsförfarandet.

— Detaljerade uppgifter om felområden.

— All övrig information och anmärkningar relevanta för tolkningen av resultatet.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. DIN 55672 (1995), Gelégenomträngningskromatografi (GPC) med tetrahydrofuran (THF) som elutionsmedel, del 1.

2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., och Bly, D.D. eds. (1979), Modern Size Exclusion Liquid Chromato- graphy, J. Wiley och Sons. (ung. Modern vätskeuteslutningskromatografi för uteslutning).

3. ASTM D 3536-91, (1991), Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning med vätskeuteslutningskromatografi (gelégenomträngningskromatografi – GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992), Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning i polystyren med storleksseparationskromatografi. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Bilaga

Riktlinjer för korrigering av lågmolekylärt innehåll beroende på närvaro av olöslig polymer

När olösliga polymerer förekommer i ett prov, leder detta till massaförlust under GPC-analysen. Den olösliga polymeren kvarhålls definitivt i kolonnen eller provfiltret, medan den lösbara delen av provet passerar genom kolonnen. När polymerens refraktiva indexökning (dn/dc) kan uppskattas eller mätas, kan provets massaförlust i kolonnen uppskattas. I detta fall görs en korrigering med hjälp av en extern kalibrering med standardmaterial med känd koncentration och dn/dc för kalibrering av refraktometerns reaktion. I nedanstående exempel används en standardpolymer (merylmetakrylat) (pMMA).

Vid den externa kalibreringen för analys av akrylpolymerer analyseras en standard-pMMA med känd koncentration i terahydrofuran med GPC, och resulterande data används för att få fram refraktometerkonstanten med följande ekvation:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

där:

K = står för refraktometerkonstanten i μvs/ml,

R = för reaktionen på standard-pMMA i μvs,

C = för koncentrationen av standard-pMMA i mg/ml,

V = för insprutningsvolymen i ml, och

dn/dc = är ökningen av refrakdonsindexet för pMMA i tetrahydrofuran (i ml/mg).

Följande data är normala för en standard-pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Resulterande K-värde, $3{,}05 \times 10^{11}$, används därefter för att beräkna den teoretiska detektorreaktionen, om 100 % av den insprutade polymeren hade eluerat genom detektorn.

▼B

A.20 POLYMERERS BETEENDE I VATTEN VID LÖSNING/EXTRAKTION

1. METOD

Den beskrivna metoden är en kopia av en reviderad version av OECD TG 120 (1997). Ytterligare teknisk information finns i hänvisning 1.

1.1 INLEDNING

För vissa polymerer, som t.ex. emultionspolymerer, kan visst inledande förberedande arbete krävas innan nedanstående metod kan användas. Metoden är inte tillämplig på flytande polymerer och på polymerer som under provningsförhållandena reagerar med vatten.

När metoden inte är praktisk eller möjlig kan beteendet vid lösning/extraktion undersökas med andra metoder. I så fall ska fullständiga detaljer och motivering för den använda metoden anges.

1.2. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.3. UNDERSÖKNINGSMETODENS PRINCIP

Polymerernas beteende vid lösning/extraktion i vatten fastställs med flaskmetoden (se A.6 lösnings-barhet i vatten, flaskmetod) med nedan beskrivna ändringar.

1.4. KVALITETSKRITERIER

Inga,

1.5. BESKRIVNING AV UNDERSÖKNINGSMETODEN

1.5.1 Utrustning

Följande utrustning krävs för denna metod:

— Krossanordning, t.ex. kvarn för produktion av partiklar med känd storlek.

— Apparater för skakning med möjlighet till temperaturövervakning.

— Membranfiltersystem.

— Lämplig analysutrustning.

— Standardsil.

1.5.2 Beredning av prover

Ett representativt prov ska först reduceras till en partikelstorlek på mellan 0,125 och 0,25 mm med lämplig sil. Kylning kan krävas för provets stabilitet eller för malningsprocessen. Material med gummiliknande natur kan krossas vid temperaturen på flytande kvävgas (1).

Om den önskade partikelstorleksfraktionen inte kan skapas ska åtgärd vidtas för att i största utsträckning minska partikelstorleken och resultatet därav registreras. Det ska i rapporten anges på vilket sätt det krossade provet förvarats fram till undersökningen.

▼B

1.5.3 **Förfarande**

Tre prover på 10 g av det undersökta ämnet ska vägas i vart och ett av tre kärl försedda med glaspropp, och därefter ska 1 000 ml vatten tillsättas till varje kärl. Om hantering av 10 g polymer visar sig vara opraktiskt, ska den närmast högre mängd som kan hanteras användas och vattenvolymen justeras i enlighet därmed.

Kärlen ska tillslutas noggrant och därefter upphettas till 20 °C. En skak- eller omrörningsanordning som kan arbeta vid konstant temperatur ska användas. Efter en period på 24 timmar ska innehållet i varje kärl centrifugeras eller filtreras och polymerkoncentrationen i den klara vätskefasen fastställas med lämplig analysmetod. Om ingen lämplig analysmetod för vätskefasen finns kan den totala lösbarheten/extraktionsbarheten uppskattas utifrån filterrestens eller centrifugrestens torra vikt.

Det är vanligtvis nödvändigt att kvantitativt differentiera å ena sidan föroreningarna och tillsatserna och å andra sidan de med låg molekylvikt. Det är också viktigt att vid gravimetriskt fastställande göra ett blankprov utan undersökt ämne, för att kunna ta hänsyn till resterna från experimentet.

Polymerernas beteende vid lösning/extraktion i vatten vid 37 °C och pH 2 samt pH 9 kan fastställas på samma sätt såsom beskrivet för utförandet av experimentet vid 20 °C. pH-värdena kan erhållas genom tillsats av antingen lämplig buffert eller syra eller bas, som t.ex. saltsyra, ättiksyra, analytiskt natrium eller kaliumhydroxid eller NH_3.

En eller två undersökningar ska göras, beroende på vilken analysmetod som används. När tillräckligt specifika metoder finns för direktanalys av vätskefasen avseende polymerkomponenten, är det tillräckligt med en sådan undersökning som beskrivits här ovan. När sådana metoder inte finns tillgängliga och fastställande av polymerens beteende vid lösning/extraktion begränsas till indirekt analys, genom fastställande enbart genom det totala innehållet organiskt kol (TOC) i vätskeextraktet, ska ytterligare en undersökning göras. Denna kompletterande undersökning ska också göras på tre prover, med tio gånger mindre polymer och samma mängd vatten som använts vid den första undersökningen.

1.5.4 **Analys**

1.5.4.1 *Undersökningar utförda med en provstorlek*

Det kan finnas metoder tillgängliga för direktanalys av polymerkomponenter i vätskefasen.

Alternativt kan eventuellt också indirekt analys av upplösta/extraherade polymerkomponenter, genom fastställande av det totala innehållet upplösningsbara delar och korrigering för ej polymerspecifika komponenter, göras.

Analys av vätskefasen avseende totala polymeriska arter är möjlig antingen genom tillräckligt känslig metod, t.ex.:

— TOC med hjälp av persulfat- eller dikromatupplösning för att producera CO_2, följt av uppskattning med IR-analys eller kemisk analys,

▼B

— Atomabsorbtionsspektrometri (AAS) eller dess induktivt kopplade plasmautsläpp (ICP) motsvarande den för kisel- eller metallinnehållande polymerer,

— UV-absorbtion eller spektrofluorimetri för akrylpolymerer,

— LC-MS för lågmolekylviktsprover,

eller genom vakuumevaporation till torrhet av vätskeextraktet och spektroskopisk analys IR, UV, osv.) eller AAS/ICP-analys av resten.

Om analys av vätskefasen som sådan inte är praktiskt genomförbar, ska vätskeextraktet extraheras med ett vattenoupplösligt organiskt lösningsmedel, t.ex. klorerat kolväte. Lösningsmedlet evaporeras därefter och resten analyseras enligt ovan avseende angivet polymerinnehåll. Komponenter i denna rest som identifieras som föroreningar eller tillsatser ska subtraheras för bestämning av polymerens egen upplösning/extraktion.

När förhållandevis stora mängder sådant material finns närvarande, kan det vara nödvändigt att analysera resterna, t.ex. HPLC- eller GC-analys för att differentiera föroreningarna från monomera och monomerderiverade ämnen, så att det faktiska innehållet av det senare kan fastställas.

I vissa fall kan vanlig evaporation av det organiska lösningsmedlet till torrhet och vägning av den torra resten vara tillräckligt.

1.5.4.2 *Provning med två olika provstorlekar*

Alla vätskeextrakt analyseras avseende total mängd organiskt kol.

Gravimetrisk bestämning ska göras på den oupplösta/ej extraherade delen av provet. Om polymer-resten, efter centrifugering eller filtrering av innehållet i varje kärl, sitter kvar på kärlväggen, ska kärlet sköljas med filtratet tills kärlet är rent från alla synliga rester. Därefter ska filtratet återigen centrifugeras eller filtreras. Kvarvarande rester på filtret eller i centrifugröret torkas vid 40 °C under vakuum och vägs. Torkningen ska fortsätta tills konstant vikt nås.

2. **DATA**

2.1 PROVNING MED EN ENDA PROVSTORLEK

De enskilda resultaten för var och en av de tre flaskorna samt medelvärdena ska anges och uttryckas i enheter för massa/volym lösning (normalt mg/l) eller massa/massa av polymerprovet (normalt mg/g). Dessutom ska provets viktförlust anges, beräknad som lösningens vikt dividerad med det ursprungliga provets vikt. Den relativa standardavvikelsen ska beräknas. Enskilda värden ska ges för hela ämnet (polymer plus väsentliga tillsatser osv.) och för polymeren ensam (dvs. efter subtraktion av bidraget från sådana tillsatser).

▼B

2.2 PROVNING MED TVÅ OLIKA PROVSTORLEKAR

De enskilda värdena för total mängd organiskt kol i vätskeextrakten för de två trippelexperimenten och medelvärdet för varje experiment ska anges, uttryckt som massa per volym lösning (normalt mg C/l), samt som massa per vikt för det ursprungliga provet (normalt mg C/g).

Om ingen skillnad föreligger mellan resultaten för stort respektive litet förhållande mellan prov och vatten, kan detta innebära att alla extraherbara komponenter faktiskt extraherats. I sådana fall krävs normalt ingen direkt analys.

Resternas individuella vikter ska anges och uttryckas i procent av provernas initialvikt. Medelvärden ska beräknas för varje experiment. Skillnaderna mellan 100 och funnen procentandel representerar andelen lösningsbart och extraherbart material i ursprungsprovet.

3. RAPPORT

3.1 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska innehålla följande information:

3.1.1 **Undersökt ämne**

— Tillgänglig information om ämnet, identitet, tillsatser, föroreningar, innehåll av varianter med låg molekylvikt.

3.1.2 **Experimentella förhållanden**

— Beskrivning av tillämpat förfarande och experimentella förhållanden.

— Beskrivning av analys- och detektionsmetoder.

3.1.3 **Resultat**

— Resultatet avseende lösningsbarhet/extraktionsbarhet i mg/l, individuella värden och medelvärden för extraktionsprovet för de olika lösningarna, uppdelat i polymerinnehåll och föroreningar, tillsatser osv.

— Resultatet av upplösningen/extraktionen av polymeren i mg/g.

— Värden för det totala innehållet organiskt kol i vätskeextrakten, lösningens vikt och beräknade andel, om denna mäts.

— pH-värde för varje prov.

— Information om blankvärden.

— Vid behov hänvisningar till det undersökta ämnets kemiska instabilitet, både under provnings- och analysprocessen.

— All information som är viktig för tolkningen av resultaten.

4. HÄNVISNINGAR

1. DIN 53733 (1976), Provtagning från plastprodukter för provningsändamål.

▼B

A.21 **OXIDERANDE EGENSKAPER (VÄTSKOR)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Denna provningsmetod är utformad för att mäta ett flytande ämnes potential att öka förbränningshastigheten eller förbränningsintensiteten hos ett brännbart ämne, eller att bilda en blandning med ett brännbart ämne som självantänds när de två blandas noggrant. Metoden är baserad på FN:s provningsmetod Provning för oxiderande vätskor (1) och är likvärdig med den. Då denna metod A.21 emellertid i första hand är utformad för att uppfylla kraven i förordning (EG) nr 1907/2006, krävs endast jämförelse med ett referensämne. Provning och jämförelse med ytterligare referensämnen kan bli nödvändiga om provningsresultaten förväntas användas för andra syften ([1]).

Denna provning behöver inte utföras när en undersökning av strukturformeln kan fastställa att ämnet utan rimligt tvivel är oförmöget att reagera exotermiskt med ett brännbart material.

Det är värdefullt att ha förhandsinformation om ämnets alla möjliga explosiva egenskaper innan denna provning utförs.

Denna provning är inte tillämplig på fasta ämnen, gaser, explosiva eller mycket brandfarliga ämnen, eller peroxider.

Denna provning behöver eventuellt inte utföras, om resultat för provsubstansen ifråga från provning enligt FN:s Provning för oxiderande vätskor (1) redan finns tillgängliga.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Med ”medeltid för tryckstegring” avses medelvärdet av de uppmätta tiderna för att en blandning vid provning ska åstadkomma en tryckökning från 690 kPa till 2 070 kPa över det atmosfäriska trycket.

1.3 REFERENSÄMNE

65 % (viktprocent) salpetersyra (analysgrad) ska användas som referensämne. ([2])

([1]) Såsom, till exempel, inom ramen för FN:s transportföreskrifter.
([2]) Såsom, till exempel, inom ramen för FN:s transportföreskrifter.

▼B

Om den som utför försöken förutser att resultaten från denna provning eventuellt kommer att användas för andra syften ([1]), kan även provning med ytterligare referensämnen vara lämpligt ([2]).

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

Vätskan som ska provas blandas med fibercellulosa, i ett viktförhållande 1 till 1, och införs i ett tryckkärl. Om vid blandning eller fyllning självantändning inträffar krävs ingen ytterligare provning.

Om självantändning inte inträffar ska hela provningen utföras. Blandningen upphettas i ett tryckkärl och medelvärdet fastställs för den tid det tar för trycket att stiga från 690 kPa till 2 070 kPa över det atmosfäriska trycket. Denna medeltid jämförs med medeltiden för trycket att stiga för en 1:1-blandning av referensämnet (-ämnena) och cellulosa.

1.5 KVALITETSKRITERIER

I en serie om fem försök med ett och samma ämne ska inget resultat avvika med mer än 30 % från det aritmetiska medelvärdet. Resultat som avviker med mer än 30 % från medelvärdet ska förkastas, tillvägagångssättet för blandning och fyllning förbättras och provningen upprepas.

1.6 BESKRIVNING AV METODEN

1.6.1 **Preparering**

1.6.1.1 *Brännbart ämne*

Torkad fibercellulosa med en fiberlängd mellan 50 och 250 μm och en medeldiameter av 25 μm ([3]), används som brännbart material. Den torkas tills vikten inte ändras, i ett lager som är högst 25 mm tjockt vid 105 °C under fyra timmar, och förvaras i en exikator med torkmedel tills den svalnat och ska användas. Vattenhalten i den torkade cellulosan ska vara mindre än 0,5 % av torrsubstansen ([4]). Om det behövs ska torktiden förlängas för att uppnå detta ([5]). Samma parti cellulosa ska användas under hela provningen.

([1]) Såsom, till exempel, inom ramen för FN:s transportföreskrifter.
([2]) I hänvisning 1 används t.ex. 50 % (viktprocent) perklorsyra och 40 % (viktprocent) natriumklorat.
([3]) T.ex. Whatmans kolonn kromatografiska cellulosapulver CF 11, katalognummer 4021 050.
([4]) Bekräftad genom (t.ex.) Karl-Fisher titrering.
([5]) Denna vattenhalt kan alternativt åstadkommas genom (t.ex.) uppvärmning vid 105 °C i vakuum under 24 timmar.

▼B

1.6.1.2 *Apparat*

1.6.1.2.1 Tryckkärl

Ett tryckkärl krävs. Kärlet består av ett cylindriskt tryckkärl som är 89 mm långt med en ytterdiameter av 60 mm (se figur 1). Två plana ytor bearbetas fram på motstående sidor (minskar kärlets tvärsnitt till 50 mm) för att underlätta fasthållning när tändstift och urluftningsplugg monteras. Kärlet som har en urborrning med en diameter av 20 mm har falsats på insidan i båda ändar till ett djup av 19 mm och gängats till 1”British Standard Pipe (BSP) eller metrisk motsvarighet. En tryckavlastare, i form av ett sidostycke, är inskruvad i den rundade delen av tryckkärlet 35 mm från ena änden och vinkelrätt mot de plana ytorna. Uttaget för detta borras till ett djup av 12 mm och gängas till 1/2” BSB (eller metrisk motsvarighet) för att passa till gängan på sidostyckets ände. Om så behövs kan en inert tätning anbringas för att se till att anslutningen blir gastät. Sidostycket sticker ut 55 mm från tryckkärlets huvuddel och har ett hål med en diameter av 6 mm. Sidostyckets ände är falsad och gängad för att passa en tryckgivare av membrantyp. Alla tryckmätningsanordningar kan användas under förutsättning att de inte påverkas av de heta gaserna eller upplösningsprodukterna och klarar att svara på tryckhöjningshastigheter motsvarande 690–2 070 kPa på mindre än 5 ms.

Tryckkärlets ände som är längst från sidostycket är förseglad med ett tändstift som är utrustat med två elektroder, den ena isolerad från och den andra ansluten till tändstiftets huvuddel. Den andra änden av tryckkärlet är förseglad med ett sprängbleck (sprängtryck cirka 2 200 kPa) som hålls på plats av en fästplugg med ett hål med en diameter av 20 mm. Om så behövs kan en inert tätning användas tillsammans med tändstiftet för att garantera en gastät anslutning. En stödställning (figur 2) håller enheten i rätt läge vid användning. Denna omfattar vanligen en gjutstålsplatta med måtten 235 mm × 184 mm × 6 mm och ett 185 mm långt fyrkantsrör 70 mm × 70 mm × 4 mm.

En sektion är bortskuren från motstående sidor i ena änden av fyrkantsrörets längd så att en struktur med två plansidiga ben som sticker ut från ett 86 mm långt helt fyrkantrör återstår. Ändarna på dessa plana sidor kapas av med en vinkel av 60º mot horisontalplanet och svetsas fast på bottenplattan. Ett urtag som är 22 mm brett och 46 mm djupt bearbetas fram på den ena sidan av den övre änden av fyrkantsröret, på så sätt att sidostycket passar in i urtaget när tryckkärlsenheten – med tändstiftsänden först – sänks ned i stödställningen. En stålbit som är 30 mm bred och 6 mm tjock svetsas fast på den undre inre sidan av fyrkantsröret för att fungera som en distans. Två 7 mm tumskruvar, gängade i motsatta sidor, håller tryckkärlet stadigt på plats. Två 12 mm breda band av 6 mm tjockt stål, svetsade på de sidobitar som sitter på fyrkantsrörets undre del, stödjer tryckkärlet från undersidan.

▼B

1.6.1.2.2 Tändsystem

Tändsystemet består av en 25 cm lång Ni/Cr-tråd med en diameter av 0,6 mm och ett motstånd av 3,85 ohm/m. Tråden är lindad, med hjälp av en 5 mm tjock stång, till formen av en spiral och är fastsatt vid tändstiftets elektroder. Spiralen ska ha ett av de utseenden som visas i figur 3. Avståndet mellan tryckkärlets undersida och undersidan av tändspiralen ska vara 20 mm. Om elektroderna inte går att justera ska tändtrådens ändar mellan spiralen och kärlets undersida isoleras med ett keramiskt överdrag. Tråden värms upp av en kraftkälla med konstant spänning som kan ge minst 10 A.

1.6.2 **Provningens utförande** ([1])

Apparaten, helt monterad med tryckgivare och uppvärmningssystem men utan sprängblecket på plats, stöds med tändstiftsänden nedåt. 2,5 g av den vätska som ska provas blandas med 2,5 g torkad cellulosa i dekanteringsglas med hjälp av en omrörningsstav av glas ([2]). För säkerhets skull ska blandningen utföras med en skyddsskärm mellan operatören och blandningen. Om vid blandning eller fyllning självantändning uppstår krävs ingen ytterligare provning. Blandningen tillsätts tryckkärlet i små portioner under knackning, så att blandningen säkert packas runt tändspiralen och är i god kontakt med den. Det är viktigt att spiralen inte förvrids under packningsprocessen då detta kan leda till oriktiga resultat ([3]). Sprängblecket sätts på plats och fästpluggen skruvas åt ordentligt. Det fyllda kärlet placeras, med sprängblecket överst, i stödställningen vilken ska stå i ett lämpligt, förstärkt dragskåp eller eldningsutrymme. Kraftförsörjningen ansluts till tändstiftets yttre anslutningar och 10 A läggs på. Tiden mellan det att blandningen påbörjas och inkopplingen av strömmen får inte överstiga 10 minuter.

Signalen som avges av tryckgivaren registreras med ett lämpligt system som möjliggör både utvärdering och alstring av en permanent dokumentering av den tidtrycksprofil som erhålls (t.ex. en transientregistrerare kopplad till en skrivare). Blandningen upphettas tills sprängblecket går sönder eller tills minst 60 s har gått. Om sprängblecket inte går sönder, ska man låta blandningen svalna innan man försiktigt demonterar apparaten, med vidtagande av försiktighetsåtgärder för att hantera eventuellt övertryck. Fem försök utförs med provämnet och referensämnet (-ämnena). Den tid det tar för trycket att stiga från 690 kPa till 2 070 kPa över det atmosfäriska trycket noteras. Medelvärdet för tryckstegringstiden beräknas.

I vissa fall kan ämnen alstra en tryckstegring (alltför snabb eller alltför långsam) som orsakas av kemiska reaktioner och som inte är relaterad till ämnets oxiderande egenskaper. I dessa fall kan det vara nödvändigt att upprepa provningen med ett inert ämne, t.ex. diatomit (kiselgur), i stället för cellulosa för att klargöra reaktionens natur.

([1]) Blandningar av oxidationsmedel och cellulosa ska behandlas som potentiellt explosiva och hanteras med försiktighet.

([2]) I praktiken kan detta åstadkommas genom att göra i ordning en 1:1-blandning av vätskan, som ska provas, och cellulosa i en större mängd än vad som behövs för försöket och överföra 5 ± 0,1 g till tryckkärlet. Blandningen måste vara nygjord för varje försök.

([3]) Framför allt måste kontakt mellan spiralens på varandra följande varv undvikas.

▼B

2. **DATA**

Tryckstegringstiderna både för provämnet och referensämnet (-ämnena). Tryckstegringstiderna för provningarna med ett inert ämne, om sådana utförts.

2.1 BEHANDLING AV RESULTAT

Tryckstegringstiderna både för provämnet och referensämnet (-ämnena) beräknas.

Medelvärdet för tryckstegringstiderna för provningarna med ett inert ämne (om sådana utförts) beräknas.

I tabell 1 visas några exempel på resultat.

Tabell 1

Exempel på resultat [a]

Ämne [b]	Medeltryckstegringstid för en 1:1-blandning med cellulosa (ms)
Ammoniumdikromat, mättad vattenlösning	20 800
Kalciumnitrat, mättad vattenlösning	6 700
Järn(III)nitrat, mättad vattenlösning	4 133
Litiumperklorat, mättad vattenlösning	1 686
Magnesiumperklorat, mättad vattenlösning	777
Nickelnitrat, mättad vattenlösning	6 250
Salpetersyra, 65 %	4 767 [c]
Perklorsyra, 55 %	121 [c]
Perchloric acid, 55 %	59
Kaliumnitrat, 30 % vattenlösning	26 690
Silvernitrat, mättad vattenlösning	[d]
Natriumklorat, 40 % vattenlösning	2 555 [c]
Natriumnitrat, 45 % vattenlösning	4 133
Inert ämne	
Vatten: cellulosa	[d]

[a] Se hänvisning (1) för klassificering enligt FN:s transportsystem
[b] Mättade lösningar ska iordningställas vid 20 °C.
[c] Medelvärde från jämförande försök från flera laboratorier
[d] Det maximala trycket 2 070 kPa uppnåddes ej.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska omfatta följande information:

— Identiteten, sammansättningen, renheten, etc. för det ämne som provas.

— Provämnets koncentration.

— Torkprocessen för använd cellulosa.

— Vattenhalten för använd cellulosa.

— Resultatet av mätningarna.

— Resultatet från provningar med ett inert ämne, om sådana utförts.

— Det beräknade medelvärdet för tryckstegringstiden.

— Alla avvikelser från denna metod och orsaken till dem.

— All ytterligare information eller kommentarer som har betydelse för resultatets tolkning.

3.2 TOLKNING AV RESULTATET ([1])

Provningsresultaten har bedömts på grundval av

a) huruvida blandningen av provämne och cellulosa självantänder, och jämförelse av medelvärdet för den tid det tar för trycket att stiga från 690 kPa till 2 070 kPa

b) med respektive referensämne (-ämnen).

Ett flytande ämne anses vara ett oxidationsmedel om

a) en 1:1-blandning, i viktdelar, av ämnet och cellulosa självantänder, eller

b) en 1:1-blandning, i viktdelar, av ämnet och cellulosa uppvisar ett medelvärde för tryckstegringstiden som är mindre än eller lika med medelvärdet för tryckstegringstiden för en 1:1-blandning, i viktdelar, av 65 % (viktprocent) salpetersyra och cellulosa.

För att undvika falska positiva resultat ska, om så behövs, även de resultat som erhålls vid provning av ämnet med ett inert material beaktas då resultaten tolkas.

([1]) Se referens 1 för tolkning av resultaten enligt FN:s transportföreskrifter med användning av flera referensämnen.

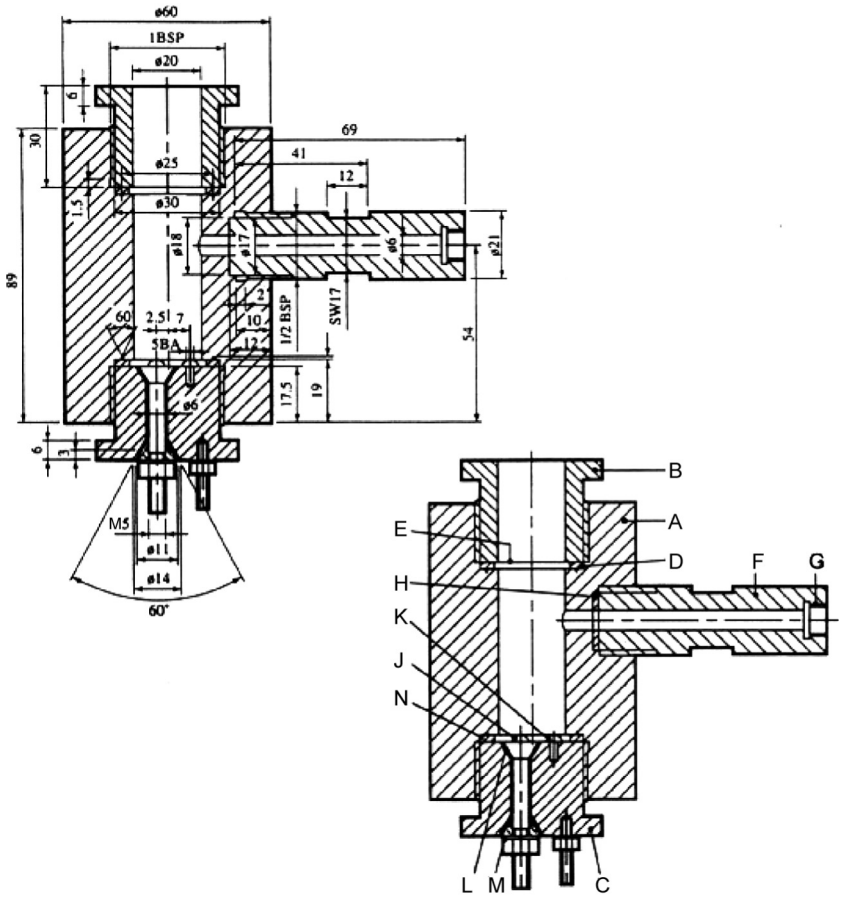
▼B

4. **HÄNVISNINGAR**

1. FN:s rekommendationer om transport av farligt gods, manual för provningar och kriterier. 3:e reviderade utgåvan. FN:s publikation nr: ST/SG/AC.10/1 l/rev. 3, 1999, sid. 342. Provning O.2: Provning för oxiderande vätskor.

Figur 1

Tryckkärl

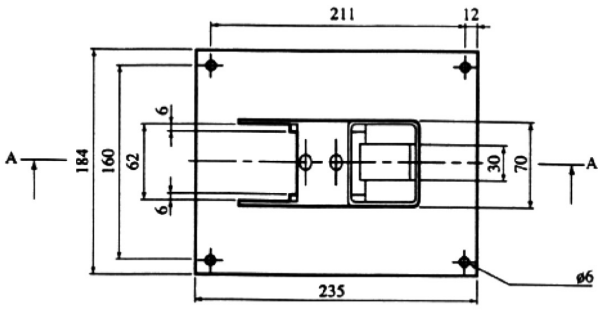


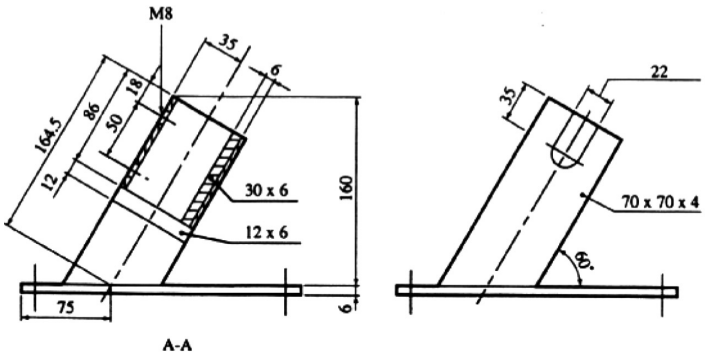
A. Tryckkärl, huvuddel	B. Fästplugg för sprängbleck	C. Tändstift
D. Mjuk blybricka	E. Sprängbleck	F. Sidostycke
G. Fäste för tryckgivare	H. Bricka	J. Isolerad elektrod
K. Jordad elektrod	L. Isolering	M. Stålkon
N. Tätningsspår för bricka		

▼B

Figur 2

Stödställning

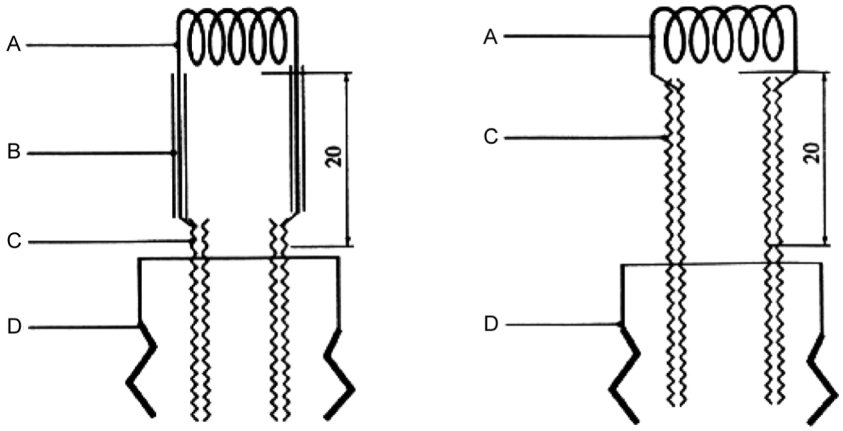




Figur 3

Tändsystem

(A) Tändspiral (B) Isolering (C) Elektroder (D) Tändstift



Anm.: Endera av de här systemen kan användas.

▼M1

A.22. BESTÄMNING AV FIBRERS LÄNGDVIKTADE GEOMETRISKA MEDELDIAMETER

1. METOD

1.1 INLEDNING

I det här dokumentet beskrivs en metod för bestämning av den längdviktade geometriska medeldiametern (nedan ”medeldiametern”) hos syntetiska oorganiska fibrer som bulkmaterial. Eftersom medeldiametern i populationen med 95 procents sannolikhet ligger mellan konfidensgränserna i ett 95-procentigt konfidensintervall (medeldiametern ± 2 medelfel) i stickprovet, kommer det rapporterade värdet (testvärdet) att bli den undre gränsen i konfidensintervallet (dvs. medeldiametern minus 2 medelfel). Metoden grundas på en uppdatering (från juni 1994) av ett metodförslag (HSE industry procedure) som antogs vid ett möte mellan ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association) och den brittiska arbetsmiljömyndigheten HSE (Health and Safety Executive) i Chester den 26 september 1993. Den har utvecklats för och utifrån en andra provningsjämförelse mellan laboratorier (1) (2). Mätmetoden kan användas för att bestämma fiberdiametern hos ämnen eller produkter i bulk som innehåller syntetiska oorganiska fibrer, t.ex. eldfasta keramiska fibrer, syntetiska glasartade fibrer eller kristallina och polykristallina fibrer.

Längdviktning är ett sätt att kompensera för den effekt på diameterfördelningen som uppkommer genom att långa fibrer bryts vid provtagning eller hantering av materialet. Det geometriska medelvärdet används för att beskriva diameterfördelningen för syntetiska oorganiska fibrer, eftersom dessa diametrar vanligen kan approximeras med en log-normalfördelning.

Att mäta såväl längden som diametern är både omständligt och tidskrävande, men om man endast mäter de fibrer som korsas eller tangeras av en oändligt tunn linje i ett SEM-synfält är sannolikheten för att man väljer en viss fiber proportionell mot dess längd. Eftersom längden i längdviktade beräkningar kan hanteras på detta sätt är det endast diametern som behöver mätas. Medeldiametern minus 2 medelfel kan sedan beräknas enligt nedan.

1.2 DEFINITIONER

Partikel: Ett föremål med ett längdbreddförhållande som är mindre än 3:1.

Fiber: Ett föremål med ett längdbreddförhållande på minst 3:1.

1.3 TILLÄMPNINGSOMRÅDE OCH BEGRÄNSNINGAR

Metoden är utformad för bestämning av diameterfördelningar med mediandiametrar från 0,5 till 6 μm. Vid mätning av större diametrar kan man använda mindre SEM-förstoringar, men metoden blir alltmer begränsad när man bestämmer storleksfördelningen hos finare fibrer. Om mediandiametern är mindre än 0,5 μm rekommenderas därför att ett transmissionselektronmikroskop (TEM) används.

▼M1

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Ett antal representativa kärnprov tas från fiberduken eller det löst bundna fibermaterialet. Fibrernas längd minskas genom krossning och ett representativt delprov dispergeras i vatten. Alikvoter extraheras och filtreras genom ett polykarbonatfilter med en porstorlek på 0,2 μm och bereds för undersökning med svepelektronmikroskop (SEM). Fibrernas diametrar mäts vid minst 10 000 gångers skärmförstoring ([1]) med hjälp av en ”linjeskärningsmetod”, vilket ger en objektiv uppskattning av mediandiametern. Den undre gränsen i ett 95-procentigt konfidensintervall (baserat på ett ensidigt test) beräknas för att få en uppfattning om det lägsta värdet på fibermaterialets geometriska medeldiameter.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Säkerhetsåtgärder**

För att begränsa exponeringen för luftburna fibrer till ett minimum bör torra fibrer hanteras i ett dragskåp eller en handskbox. Periodisk kontroll av exponeringen bör göras för att säkerställa att säkerhetsåtgärderna är effektiva. Vid hantering av syntetiska oorganiska fibrer bör engångshandskar användas för att minska hudirritationen och förhindra kontaminering.

1.5.2 **Apparatur och utrustning**

— Press (med en kapacitet på 10 MPa).

— Polykarbonatfilter med en porstorlek på 0,2 μm (25 mm diameter).

— Membranfilter av cellulosaester med en porstorlek på 5 μm som används som stödfilter.

— Filtreringsutrustning av glas (eller filtreringssystem för engångsbruk) för 25 mm filter (t.ex. Millipores glasutrustning för mikroanalys, artikelnr XX10 025 00).

— Nydestillerat vatten som filtrerats genom ett filter med en porstorlek på 0,2 μm för att avlägsna mikroorganismer.

— Sputter som belägger provet med en tunn film av guld eller guld/palladium.

— Svepelektronmikroskop med en upplösning på 10 nm som används vid 10 000 gångers förstoring.

— Spatlar, skalpellblad (nr 24), pincett, SEM-rör, kollim eller koltejp och silverlim.

— Ultraljudsstav eller ultraljudsbad.

— Kärnprovtagare eller korkborr för att ta prover tvärsigenom duken av syntetiska oorganiska fibrer.

([1]) Denna förstoring används för 3 μm fibrer. För 6 μm fibrer är det lämpligare att använda 5 000 gångers förstoring.

▼M1

1.5.3 **Testförfarande**

1.5.3.1 *Provtagning*

För duk, filt och matta används en 25 mm kärnprovtagare eller korkborr för att ta tvärsnittsprover (rätt genom materialet). Om endast en liten längd av duken är tillgänglig ska proverna vara jämnt fördelade längs dukens kortsida. Om större längder är tillgängliga ska proverna tas från slumpmässigt valda ställen. Samma utrustning kan användas för att ta stickprover från lösa fibrer. Om möjligt ska sex prover tas för att spegla variationen i bulkmaterialet.

De sex kärnproverna krossas vid 10 MPa i en press med 50 mm diameter. Materialet blandas därefter med en spatel och pressas igen vid 10 MPa. Materialet avlägsnas sedan från pressen och lagras i förslutna glasflaskor.

1.5.3.2 *Provberedning*

Om nödvändigt kan fiberproverna placeras i ugn vid 450 °C i en timme för att avlägsna organiskt bindemedel.

Dela upp provet i fyra lika stora delar med ”cone and quarter”-metoden (detta bör göras i ett dragskåp eller liknande).

Tillsätt med hjälp av en spatel en liten mängd (< 0,5 g) av provet till 100 ml nydestillerat vatten som har filtrerats genom ett 0,2 μm membranfilter (ultrarent vatten kan även framställas på annat sätt om det kan styrkas att det håller tillfredsställande kvalitet). Blanda om ordentligt med hjälp av en ultraljudsstav som körs vid 100 W och som ställts in så att en virvel uppkommer. (Gör på följande sätt om en ultraljudsstav inte finns att tillgå: skaka och vänd provbehållaren upprepade gånger i 30 sekunder, placera den därefter i ett ultraljudsbad i 5 minuter och skada och vänd sedan provbehållaren i ytterligare 30 sekunder.)

Ta omedelbart efter det att fibermaterialet dispergerats ett antal alikvoter av provet (t.ex. tre alikvoter på 3, 6 respektive 10 ml) med hjälp av en pipett med stor mynning (2–5 ml volym).

Vakuumfiltrera fibrerna från varje alikvot genom ett 0,2 μm polykarbonatfilter med ett 5 μm cellulosaesterfilter som stödfilter med hjälp av en filtrertratt av glas med cylindrisk behållare. Ca 5 ml filtrerat destillerat vatten tillsätts i tratten och alikvoten pipetteras långsamt ned i vattnet med pipettspetsen under vätskeytan. Pipett och behållare måste sköljas noga efter pipetteringen, eftersom fina fibrer har en tendens att ansamlas på ytan.

Avlägsna filtret försiktigt, skilj det från stödfiltret och lägg det i en behållare för att torka.

▼M1

Använd ett skalpellblad (nr 24) för att skära ut en fjärdedel eller hälften av filterkakan med en ”sågande rörelse”. Fäst försiktigt det utskurna partiet på svepelektronmikroskopets provhållare (stubbe) med hjälp av koltejp eller kollim. Stryk på silverlim på åtminstone tre ställen för att förbättra den elektriska kontakten vid filtrets och provhållarens kanter. Låt limmet torka. Sputtra därefter ca 50 nm guld eller guld/palladium på filterkakans yta.

1.5.3.3 *Kalibrering och användning av svepelektronmikroskopet*

1.5.3.3.1 Kalibrering

Svepelektronmikroskopets kalibrering måste kontrolleras minst en gång i veckan (helst varje dag) med hjälp av ett certifierat kalibreringsgrid. Kalibreringen ska kontrolleras med hjälp av en certifierad standard. Om det uppmätta värdet inte ligger inom ± 2 % av det certifierade värdet måste svepelektronmikroskopets kalibrering justeras och kontrolleras igen.

Svepelektronmikroskopets ska ha en sådan upplösning att en diameter på 0,2 μm kan urskiljas vid en förstoring på 2 000 gånger i en matris av reella prov.

1.5.3.3.2 Användning

Svepelektronmikroskopet ska användas vid 10 000 gångers förstoring ([1]) och vid betingelser som ger goda resultat och en godtagbar bild vid låga svephastigheter, t.ex. 5 sekunder per bild. Även om inställningarna kan variera mellan olika svepelektronmikroskop bör man för att erhålla bästa skärpa och upplösning vid undersökning av material med låg atomvikt i allmänhet använda accelerationsspänningar på 5–10 keV, ett lågt värde på ”spot size” och ett kort arbetsavstånd. Vid användning av den linjära traversmetoden ska lutningen vara 0 grader för att minimera behovet av omfokusering. Om svepelektronmikroskopet har ett eucentriskt läge ska arbetsavståndet för detta användas. En lägre förstoring kan användas om materialet inte innehåller några små fibrer, dvs. om fiberdiametrarna är större än 5 μm.

1.5.3.4 *Storleksbestämning*

1.5.3.4.1 Undersökning av provet vid låg förstoring

Provet bör först undersökas vid låg förstoring för att se om det finns några tecken på att stora fibrer klumpat ihop sig och för att bestämma fibrernas täthet. Vid omfattande ihopklumpning rekommenderas att ett nytt prov bereds.

För att uppnå god statistisk noggrannhet är det nödvändigt att mäta ett visst minsta antal fibrer. Hög fibertäthet kan vara önskvärt, eftersom det är tidskrävande att undersöka tomma synfält och detta inte bidrar till analysen. Om filtrets fibertäthet är för hög blir det emellertid svårt att mäta alla mätbara fibrer och det finns risk för att man missar små fibrer, eftersom de kan döljas av större fibrer.

([1]) För 3 μm fibrer, se föregående fotnot.

▼**M1**

Om fibertätheten överstiger 150 fibrer per millimeter linjär travers kan det finnas risk för att medeldiametern överskattas. En låg fiberkoncentration ökar å andra sidan analystiden och det är därför ofta kostnadseffektivt att bereda ett prov vars fibertäthet ligger närmare den optimala tätheten än att fortsätta räkningen på filter med låg fiberkoncentration. Den optimala fibertätheten bör ge ett genomsnitt på en eller två räkningsbara fibrer per synfält vid 5 000 gångers förstoring. Den optimala tätheten beror emellertid på fibrernas storlek (diameter), så den som utför testet måste använda sin omdömesförmåga för att avgöra om fibertätheten ligger nära den optimala eller inte.

1.5.3.4.2 Längdviktning av fiberdiametrarna

Endast de fibrer som tangerar (eller korsar) en (oändligt) fin linje som dras på svepelektronmikroskopets skärm ska räknas. Av denna anledning dras en horisontell (eller vertikal) linje över skärmens mitt.

Alternativt kan en punkt placeras mitt på skärmen, varefter man inleder en kontinuerlig svepning i en riktning över filtret. Diametern mäts på alla fibrer med ett längdbreddförhållande som är större än 3:1 och som tangerar eller korsar denna punkt.

1.5.3.4.3 Storleksbestämning av fibrerna

Det rekommenderas att minst 300 fibrer mäts. Varje fiber ska endast mätas en gång, i den punkt där den skär den linje eller punkt som placerats på skärmen (eller nära skärningspunkten om fiberkanterna inte syns). För eventuella fibrer som inte har enhetliga tvärsnitt används en mätning motsvarande fiberns genomsnittliga diameter. Det är viktigt att noga bestämma var kanten befinner sig och mäta det kortaste avståndet mellan fiberkanterna. Storleksbestämningen kan göras antingen direkt eller på lagrade bilder eller foton. Användning av halvautomatiska mätsystem som laddar ned data direkt till ett kalkylprogram rekommenderas, eftersom man därigenom sparar tid och eliminerar risken för felskrivningar. Dessutom sker beräkningarna automatiskt.

Ändarna på långa fibrer bör undersökas vid låg förstoring för att kontrollera att de endast mäts en gång och inte kröker sig och kommer tillbaka in i synfältet.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Fibrers diametrar är vanligen inte normalfördelade. Genom en logaritmisk transformation är det emellertid möjligt att erhålla en fördelning som närmar sig normalfördelningen.

Beräkna det aritmetiska medelvärdet (mean lnD) och standardavvikelsen (SD_{lnD}) för den naturliga logaritmen (lnD) av n fiberdiametrar (D).

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \quad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Medelfelet (SE_{lnD}) beräknas genom att standardavvikelsen divideras med kvadratroten ur antalet mätningar (n).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Beräkna det geometriska medelvärdet minus två geometriska medelfel (LWGMD – 2SE) genom att subtrahera två medelfel från medelvärdet och upphöja e till detta värde (medelvärdet minus två medelfel).

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

— Värdet på den längdviktade geometriska medeldiametern minus två medelfel.

— Eventuella avvikelser från metoden (särskilt sådana som kan påverka resultatens precision eller noggrannhet) samt skälen för dessa.

4. **LITTERATUR**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Februari 1999.

2. G. Burdett och G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 FÖRDELNINGSKOEFFICIENT (1-OKTANOL/VATTEN): METOD MED LÅNGSAM OMRÖRNING

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 123 (2006). Fördelningskoefficient 1-oktanol/vatten (P_{OW}) med log P_{OW}-värden upp till 8,2 har noggrant bestämts genom metoden med långsam omrörning (1). Den lämpar sig därför för direkt bestämning av P_{OW} för mycket hydrofoba ämnen.

2. Andra metoder för bestämning av fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten (P_{OW}) är ”skakkolvmetoden” (2), där P_{OW} bestäms utifrån retentionstiden vid HPLC-analys med omvänd fas (3). Skakkolvmetoden ger ofta upphov till artefakter beroende på att mikroskopiska droppar av oktanol övergår i vattenfasen. Med ökande värden på P_{OW} leder närvaron av dessa droppar i allt högre grad till att testämnets koncentration i vattnet överskattas. Metoden kan därför bara användas för ämnen med log $P_{OW} < 4$. Den andra metoden bygger på en tillförlitlig uppsättning direktbestämda P_{OW}-värden som används för att kalibrera förhållandet mellan retentionstiden med HPLC och de uppmätta P_{OW}-värdena. Det har funnits ett utkast till OECD-riktlinjer tillgängligt för bestämning av fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten för joniserbara ämnen (4), men detta ska inte längre användas.

3. Den här testmetoden har utvecklats i Nederländerna. Precisionen för de förfaranden som beskrivs här har validerats och optimerats genom interkalibrering med 15 deltagande laboratorier (5).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Betydelse och användning

4. För inerta organiska ämnen har man funnit att det finns ett mycket tydligt samband mellan deras fördelningskoefficient 1-oktanol/vatten (P_{OW}) och deras bioackumulering i fisk. Det har dessutom konstaterats att det finns ett samband mellan kemikaliers P_{OW} och deras toxicitet för fisk samt mellan deras P_{OW} och förmåga att bindas till fasta material som jord och sediment. För en utförlig översikt över dessa samband, se hänvisning (6).

5. Det har fastställts en rad samband mellan fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten och andra ämnesegenskaper som är av betydelse inom miljötoxikologi och miljökemi. Fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten har därför kommit att bli en mycket viktig parameter vid bedömning av miljörisker med kemikalier och för att förutsäga hur de kommer att uppföra sig i miljön.

Tillämpningsområde

6. Metoden med långsam omrörning är tänkt att minska bildningen av mikrodroppar av 1-oktanol i vattenfasen. Detta torde minska risken för att koncentrationen i vattnet överskattas på grund av att molekyler av testämnet binds till sådana droppar. Metoden lämpar sig därför särskilt väl för bestämning av P_{OW} för ämnen som antas ha log P_{OW}-värden på 5 och högre, för vilka skakkolvmetoden (2) lätt kan ge felaktiga resultat.

▼M4

DEFINITIONER OCH ENHETER

7. Ett ämnes fördelningskoefficient mellan vatten och ett lipofilt lösningsmedel (1-oktanol) beskriver dess jämviktsfördelning mellan de båda faserna. Fördelningskoefficienten 1-oktanol (P_{OW}) definieras som förhållandet mellan testämnets jämviktskoncentrationer i 1-oktanol mättad med vatten (C_O) och i vatten mättat med 1-oktanol (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Fördelningskoefficienten är en dimensionslös storhet eftersom den beskriver förhållandet mellan två koncentrationer. Den uttrycks vanligen som tiologaritmen (log P_{OW}). P_{OW} är temperaturberoende, och rapporterade data måste därför omfatta en angivelse av temperaturen vid mätningen.

PRINCIP FÖR METODEN

8. Vid bestämning av fördelningskoefficienten bringas vatten, 1-oktanol och testämnet i jämvikt med varandra vid konstant temperatur. Därefter bestäms testämnets koncentration i de båda faserna.

9. Man kan minska problemet med bildning av mikroskopiska droppar under skakkolvförsöket genom att använda metoden med långsam omrörning som beskrivs här. Metoden går ut på att vatten, 1-oktanol och testämnet bringas i jämvikt i ett termostatreglerat reaktionskärl under omrörning. Utbytet mellan faserna påskyndas genom omrörning. Omrörningen gör också att det uppkommer viss turbulens som ökar utbytet mellan 1-oktanol och vatten utan att mikroskopiska droppar bildas (1).

TILLÄMPBARHET FÖR TESTMETODEN

10. Eftersom förekomsten av andra ämnen än testämnet kan påverka testämnets aktivitetskoefficient, bör testämnet testas som ett rent ämne. Den högsta renhet som är kommersiellt tillgänglig ska användas för fördelningsförsöket med 1-oktanol/vatten.

11. Den aktuella metoden gäller rena ämnen som inte upplöses eller förenas, och som inte visar någon signifikant gränsskiktsaktivitet. Den kan tillämpas för att bestämma fördelningsförhållandet för 1-oktanol/vatten för sådana ämnen och blandningar. När metoden används för blandningar, är fördelningsförhållandena som fastställs för 1-oktanol/vatten villkorade och beroende av den testade blandningens kemiska sammansättning och på elektrolytens sammansättning som används som vattenfas. Vidtas ytterligare åtgärder är metoden också tillämplig för dissocierings- eller associeringsföreningar (punkt 12).

12. På grund av att multipel jämvikt i vatten och 1-oktanol inblandad i fördelningen 1-oktanol/vatten av dissocierade ämnen såsom organiska syror och fenoler, organiska baser och metallorganiska ämnen, är fördelningsförhållandet 1-oktanol/vatten en villkorad konstant starkt beroende av elektrolytsammansättning (7) (8). Bestämningen av fördelningsförhållandet för 1-oktanol/vatten kräver därför att pH och elektrolytsammansättning kontrolleras i försöket och rapporteras. En sakkunnig bedömning måste användas vid utvärderingen av dessa fördelningsförhållanden. När värdet för dissociationskonstant(er) används måste lämpliga pH-värden väljas så att ett fördelningsförhållande fastställs för varje joniseringstillstånd. Icke-komplexbildande buffertar måste användas vid testning av metallorganiska föreningar (8). Med beaktande av befintlig kunskap om vattenkemi (komplexbildningskonstanter, dissociationskonstanter) bör testbetingelserna väljas på ett sådant sätt att specificeringen av testämnet i vattenfasen kan beräknas. Jonstyrkan bör vara identisk i alla försök genom användning av en bakgrundselektrolyt.

▼M4

13. Under testet kan svårigheter uppstå för ämnen med låg vattenlöslighet eller högt $P_{OW,}$ på grund av att halterna i vattnet blir så låga att det blir svårt att göra en noggrann bestämning. Den här testmetoden ger vägledning i hur man hanterar detta problem.

INFORMATION OM TESTÄMNET

14. Kemiska reagenser bör vara av analytisk renhetsgrad eller renare. För detta test rekommenderas omärkta testämnen med känd kemisk sammansättning och en renhet som helst uppgår till minst 99 %, eller radioaktivt märkta ämnen med känd kemisk sammansättning och radiokemisk renhet. När ämnen med kort halveringstid används för märkningen är det nödvändigt att korrigera för sönderfallet. För radioaktivt märkta testämnen bör man använda en analysmetod som är specifik för kemikalien i fråga, så att man kan vara säker på att den uppmätta radioaktiviteten härrör direkt från testämnet.

15. Värdet på log P_{OW} kan uppskattas med hjälp av kommersiellt tillgänglig programvara eller genom att man jämför testämnets löslighet i de båda lösningsmedlen.

16. Innan P_{OW} bestäms med den här metoden bör man ha tillgång till följande information om testämnet:

a) Strukturformel.

b) Analysmetoder som lämpar sig för att bestämma ämnets koncentration i vatten och 1-oktanol.

c) Dissociationskonstant(er) för joniserbara ämnen (OECD:s riktlinje 112 (9)).

d) Vattenlöslighet (10).

e) Abiotisk hydrolys) (11).

f) Biologisk nedbrytbarhet (12).

g) Ångtryck (13).

METODBESKRIVNING

Utrustning

17. Vanlig laboratorieutrustning behövs, i synnerhet följande:

— Magnetomrörare och teflonbelagda magnetstavar används för omrörning i vattenfasen.

— Analysinstrument som lämpar sig för att bestämma testämnets koncentration i det förväntade koncentrationsintervallet.

— Omrörningskärl med en kran i botten. Beroende på testämnets uppskattade log P_{OW}-värde och den använda analysmetodens detektionsgräns (LOD) kan det vara nödvändigt att använda ett kärl med samma geometri som är större än en liter, så att vattenvolymen är tillräckligt stor för att möjliggöra kemisk extraktion och analys. På så sätt erhålls högre koncentrationer i vattenextraktet och därmed en mer tillförlitlig analytisk bestämning. I tillägg 1 finns en tabell med uppskattade minsta volymer, detektionsgränsen för testämnet, dess uppskattade log P_{OW} och dess vattenlöslighet. Tabellen baseras på förhållandet mellan log P_{OW} och kvoten mellan ämnets löslighet i oktanol och vatten, såsom beskrivits av Pinsuwan m.fl. (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

där

$SR = S_{okt}/S_w$ (i molaritet)

samt på det förhållande för att uppskatta vattenlöslighet som beskrivits av Lyman (15). Vattenlösligheten enligt den formel som anges i tillägg 1 ska ses som en första uppskattning. Observera att det står användaren fritt att uppskatta vattenlösligheten genom samband som bättre anses representera förhållandet mellan hydrofobicitet och löslighet. För fasta föreningar rekommenderas exempelvis att man vid uppskattning av lösligheten tar hänsyn till smältpunkten. När en modifierad ekvation används bör man förvissa sig om att ekvationen för beräkning av lösligheten i oktanol fortfarande är giltig. En schematisk ritning av ett glasmantlat omrörningskärl med en volym på ca en liter finns i tillägg 2. Proportionerna på kärlet som visas i tillägg 2 har visat sig vara gynnsamma och bör bibehållas när utrustning av annan storlek används.

— Under försöket med långsam omrörning är det nödvändigt att hålla temperaturen konstant.

18. Kärlet bör vara tillverkat av ett inert material så att adsorptionen på kärlets väggar och botten är försumbar.

Beredning av testlösningar

19. Bestämningen av P_{OW} bör göras med den renaste 1-oktanol som finns i handeln (minst + 99 %). Det rekommenderas att 1-oktanol renas genom extraktion med syra, bas och vatten samt efterföljande torkning. 1-oktanol kan också renas genom destillation. Renad 1-oktanol används för att bereda standardlösningar av testämnena. Det vatten som används för bestämningen av P_{OW} ska vara destillerat i utrustning av glas eller kvarts, eller ska komma från ett reningssystem. Vatten av HPLC-kvalitet kan också användas. Destillerat vatten måste filtreras genom ett 0,22 μm filter, och för att kontrollera att de koncentrerade extrakten inte innehåller några föroreningar som kan reagera med testämnet måste blankprover ingå. Om ett glasfiberfilter används ska det rengöras genom upphettning vid 400 °C i minst tre timmar.

20. Innan försöket inleds mättas de båda lösningsmedlen med varandra genom att bringas i jämvikt i ett tillräckligt stort kärl. Detta åstadkoms genom långsam omrörning av tvåfassystemet i två dagar.

21. En lämplig koncentration av testämnet väljs och löses i 1-oktanol (mättad med vatten). Fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten ska bestämmas i utspädda lösningar i 1-oktanol och vatten. Testämnets koncentration bör därför inte överstiga 70 % av dess löslighet med en högsta koncentration på 0,1 M i endera fasen (1). De lösningar i 1-oktanol som används för försöket får inte innehålla något uppslammat testämne i fast form.

22. En lämplig mängd av testämnet löses i 1-oktanol (mättad med vatten). Om den uppskattade log P_{OW} är större än fem måste man se till att de lösningar i 1-oktanol som används för försöket inte innehåller något uppslammat testämne i fast form. För att undvika detta ska följande metod användas för kemikalier vars uppskattade log P_{OW}-värde är > 5:

— Lös testämnet i 1-oktanol (mättad med vatten).

▼M4

— Vänta tills det uppslammade fasta ämnet har sjunkit till botten. Kontrollera testämnets koncentration under väntetiden.

— Vänta tills testämnets koncentration i 1-oktanol har stabiliserats och späd därefter stamlösningen med en lämplig volym 1-oktanol.

— Mät den utspädda stamlösningens koncentration. Om den uppmätta koncentrationen stämmer med utspädningen kan stamlösningen användas för försöket.

Extraktion och analys av prover

23. En validerad analysmetod ska användas för bestämning av testämnet. De som utför försöket måste kunna styrka att koncentrationerna både i den vattenmättade 1-oktanolen och i den 1-oktanol-mättade vattenfasen ligger över den använda analysmetodens kvantifieringsgräns. Om det är nödvändigt att extrahera testämnet från vattenfasen och 1-oktanolfasen måste utbytet vid extraktion från respektive fas fastställas innan försöket inleds. Signalen måste korrigeras för blankvärden och det är viktigt att se till att ingen analyt överförs från ett prov till ett annat.

24. För hydrofoba testämnen som har relativt låga koncentrationer i vattenfasen är det troligen nödvändigt att extrahera vattenfasen med ett organiskt lösningsmedel och att koncentrera extraktet före analys. Av samma anledning är det också nödvändigt att blankproverna har en mycket låg koncentration. Därför måste mycket rena lösningsmedel användas, helst lösningsmedel för spårämnesanalys. Risken för att föroreningar överförs mellan proverna kan också minskas genom att man använder noggrant rengjord glasutrustning (den kan t.ex. sköljas i lösningsmedel eller upphettas vid hög temperatur).

25. Värdet på log P_{OW} kan uppskattas med hjälp av ett uppskattningsprogram eller genom sakkunnig bedömning. Om det är högre än 6 är det viktigt att korrigera för blankvärdena och kontrollera att det inte sker någon överföring av analyt mellan proverna. Om det uppskattade log P_{OW}-värdet överskrider 6 måste man använda en surrogatstandard för att korrigera för utbytet så att provet kan koncentras så mycket som möjligt före analys. Ett antal program för uppskattningen av log P_{OW} finns kommersiellt tillgängliga ([1]), t.ex. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) och ACD log P (19). I hänvisningarna (20–22) beskrivs olika metoder för att uppskatta log P_{OW}.

26. Kvantifieringsgränserna för bestämning av testämnet i 1-oktanol och vatten ska fastställas med vedertagna metoder. Som en tumregel kan kvantifieringsgränsen anses vara den koncentration i vatten eller 1-oktanol som ger ett signal-brusförhållande på tio. En lämplig extraktions- och förkoncentrationsmetod ska väljas, och utbytet vid analysen ska också anges. En lämplig grad av förkoncentrering väljs så att en signal av erforderlig storlek erhålls vid den analytiska bestämningen.

([1]) Denna information ges endast som information till användarna. Andra motsvarande datorprogram kan användas om man kan visa att de ger samma resultat.

▼M4

27. På grundval av analysmetodens parametrar och de förväntade koncentrationerna bestäms den ungefärliga provstorlek som krävs för en korrekt bestämning av ämnets koncentration. Man bör undvika att använda vattenprover som är så små att man inte erhåller en tillräcklig signal. Man bör likaså undvika alltför stora vattenprover, eftersom det annars kan hända att det inte finns tillräckligt mycket vatten kvar för att göra det erforderliga antalet analyser (n = 5). I tillägg 1 anges den minsta provvolymen som en funktion av kärlets volym, testämnets detektionsgräns och dess löslighet.

28. Testämnena kvantifieras genom jämförelser av kalibreringskurvorna för respektive ämne. De analyserade provernas koncentrationer måste ligga i samma intervall som standardlösningarnas koncentrationer.

29. För testämnen vars uppskattade log P_{OW} är högre än 6 måste vattenprovet spikas med en surrogatstandard före extraktionen, så att förlusterna vid extraktion och förkoncentrering av vattenproverna kan bedömas. För att utbytet ska kunna korrigeras så exakt som möjligt måste surrogatstandardens egenskaper vara mycket lika eller identiska med testämnets egenskaper. Helst ska (stabila) isotopmärkta analoger av testämnet (t.ex. deuterium- eller ^{13}C-märkta) användas. Om det inte är möjligt att använda stabila isotopmärkta analoger såsom ^{13}C eller ^{2}H ska det genom tillförlitliga litteraturuppgifter visas att surrogatstandardens fysikalisk-kemiska egenskaper ligger mycket nära testämnets. Vid vätske-vätskeextraktionen av vattenfasen kan emulsioner bildas. Detta problem kan minskas genom tillsats av salt och genom att man låter emulsionen klarna över natten. I rapporten ska det anges vilka metoder som används för extraktion och förkoncentrering av proverna.

30. Prover som tas från 1-oktanolfasen kan vid behov spädas med ett lämpligt lösningsmedel före analys. Dessutom rekommenderas att utbytet korrigeras genom användning av surrogatstandarder om det vid försök visat sig att utbytet varierar mycket (relativ standardavvikelse > 10 %).

31. Rapporten ska omfatta detaljerade uppgifter om den använda analysmetoden. Hit hör extraktions- och förkoncentrationsmetoder, utspädningsfaktorer, instrumentparametrar, kalibreringsrutin, kalibreringsområde, analytisk utbyte av testämnet från vatten, tillsats av surrogatstandarder för korrigering av utbytet, blankvärden, detektionsgränser och kvantifieringsgränser.

Testförfarande

Optimala volymförhållanden för 1-oktanol och vatten

32. När man väljer volymerna av 1-oktanol och vatten bör man beakta kvantifieringsgränserna i 1-oktanol och vatten, graden av förkoncentration av vattenproverna, provtagningsvolymerna i 1-oktanol och vatten och de förväntade koncentrationerna. Av experimentella skäl bör volymen av 1-oktanol väljas så att skiktet av 1-oktanol blir så tjockt (> 0,5 cm) att det är möjligt att ta prover från 1-oktanolfasen utan att den störs.

33. Vid bestämning av fördelningskoefficienten för ämnen med log P_{OW} på 4,5 och högre används typiskt 20 till 50 ml 1-oktanol och 950 till 980 ml vatten i ett enliterskärl.

▼M4

Testbetingelser

34. Reaktionskärlet ska vara termostatreglerat så att temperaturvariationen under försöket är mindre än 1 °C. Försöket ska utföras vid 25 °C.

35. Försökssystemet måste skyddas från dagsljus, antingen genom att försöket utförs i ett mörkt rum eller genom att reaktionskärlet täcks med aluminiumfolie.

36. Försöket ska utföras i en så dammfri miljö som möjligt.

37. Blandningen av 1-oktanol och vatten rörs om tills jämvikt inställer sig. Hur lång tid det tar att uppnå jämvikt bestäms i ett pilotförsök där prover på vatten och 1-oktanol tas med jämna mellanrum. Det ska gå minst fem timmar mellan provtagningstillfällena.

38. Varje bestämning av P_{OW} ska bygga på minst tre oberoende omrörningsförsök.

Bestämning av jämviktstiden

39. Jämvikt antas ha inställt sig när man vid regression av koncentrationsförhållandet mellan 1-oktanol och vatten som en funktion av tiden, över en tidsrymd som omfattar fyra punkter, får en lutning som inte avviker nämnvärt från 0 vid en p-nivå på 0,05. Systemet måste bringas i jämvikt under minst en dag innan provtagningen inleds. Som en tumregel kan provtagning av ämnen med ett uppskattat log P_{OW} mindre än 5 göras under dag två och tre. För mer hydrofoba ämnen kan det ta längre tid att uppnå jämvikt. För ett ämne med ett log P_{OW} på 8,23 (dekaklorbifenyl) krävdes 144 timmar för att nå jämvikt. För att avgöra om jämvikt inställt sig tas upprepade prover från ett och samma kärl.

Försökets inledning

40. Försöket inleds genom att reaktionskärlet fylls med vatten mättat med 1-oktanol. Kärlet får sedan stå tills den temperatur som termostaten är inställd på nås.

41. Därefter tillsätts försiktigt önskad mängd av testämnet (löst i erforderlig volym 1-oktanol mättad med vatten) till reaktionskärlet. Detta är ett kritiskt steg i försöket, eftersom man måste undvika turbulent blandning av de båda faserna. 1-oktanolfasen kan därför långsamt pipetteras mot reaktionskärlets vägg, nära vattenfasen. Den kommer att rinna längs glasväggen och bilda en film ovanpå vattenfasen. 1-oktanol får aldrig hällas direkt i reaktionskärlet och det är viktigt att se till att droppar av 1-oktanol inte faller direkt i vattnet.

42. Omröraren startas och omrörningshastigheten ökas långsamt. Om omrörarmotorn inte kan justeras ordentligt bör man överväga att använda en transformator. Omrörningshastigheten justeras så att strömvirveln i kontaktytan mellan vattnet och 1-oktanolen är 0,5 till högst 2,5 cm djup. Om strömvirveln är djupare än 2,5 cm ska omrörningshastigheten minskas. I annat fall kan det bildas mikrodroppar av 1-oktanol i vattenfasen, som leder till att testämnets koncentration i vattenfasen överskattas. Rekommendationen att omrörningshastigheten ska ge en virvel på högst 2,5 cm grundas på resultaten av den utförda interkalibreringen (5). Det är en kompromiss mellan önskan att snabbt uppnå jämvikt och att begränsa bildningen av mikroskopiska droppar av 1-oktanol.

▼M4

Provtagning och provberedning

43. Omröraren stängs av före provtagningen och man väntar sedan tills vätskorna slutat röra sig. När provtagningen är avslutad startas omröraren igen, först långsamt och sedan gradvis snabbare såsom beskrivs ovan.

44. Prover på vattenfasen tas från en kran i botten av reaktionskärlet. Släng alltid bort den dödvolym vatten som finns i kranen (ca 5 ml i det kärl som visas i tillägg 2). Vattnet i kranen är inte omrört och är därför inte i jämvikt med resten av vätskan i kärlet. Anteckna vattenprovernas volym och se till att testämnet som finns i det slängda vattnet beaktas när massbalansen upprättas. Avdunstningsförlusterna minimeras genom att vattnet sakta får rinna in i separertratten, utan att vatten- och 1-oktanolfaserna störs.

45. Prover av 1-oktanol tas genom att små alikvoter (ca 100 µl) avlägsnas från 1-oktanolfasen med en 100 mikrolitersspruta helt av glas och metall. Det är viktigt att de båda vätskorna inte blandas i kontaktytan. Den provtagna vätskans volym antecknas. Det räcker med små alikvoter eftersom 1-oktanol-provet späds ut.

46. Onödiga provöverföringssteg bör undvikas. Provvolymen bör därför bestämmas gravimetriskt. För vattenprover kan detta åstadkommas genom att man samlar upp vattenprovet i en separertratt som redan innehåller den erforderliga mängden lösningsmedel.

DATA OCH RAPPORTERING

47. Enligt den här metoden bestäms P_{OW} genom att man utför tre omrörningsförsök med det ämne som ska undersökas under identiska betingelser. Den regressionsanalys som används för visa att jämvikt uppnåtts ska grundas på resultaten av minst fyra på varandra bestämningar av C_O/C_W vid olika tidpunkter. På så sätt kan man beräkna variansen som ett mått på osäkerheten för det medelvärde som erhålls från varje försöksenhet.

48. P_{OW} kan beskrivas genom den varians i data som erhålls i varje försöksenhet. Denna information används för att beräkna P_{OW} som det vägda medelvärdet för resultaten i de enskilda försöksenheterna. Det inverterade värdet på variansen hos resultaten från försöksenheterna används som vikt. Detta leder till att data som uppvisar en stor variation (uttryckt som varians) och som därför är mindre tillförlitliga inte påverkar resultaten lika mycket som data med liten varians.

49. Den vägda standardavvikelsen beräknas på samma sätt. Den beskriver P_{OW}-mätningens repeterbarhet. Ett lågt värde på den vägda standardavvikelsen visar att bestämningen av P_{OW} har en mycket god repeterbarhet inom ett och samma laboratorium. Den formella statistiska behandlingen av erhållna data beskrivs nedan.

▼M4

Behandling av resultaten

Demonstration av att jämvikt uppnåtts

50. Logaritmen för förhållandet mellan testämnets koncentrationer i 1-oktanol och vatten (log (C_O/C_w)) beräknas för varje provtagningstidpunkt. För att visa att jämvikt uppnåtts plottas detta förhållande som en funktion av tiden. En platå i kurvan, som ska omfatta minst fyra på varandra följande mätpunkter, tyder på att jämvikt har uppnåtts och att ämnet verkligen är löst i 1-oktanol. Om så inte är fallet måste försöket fortgå tills fyra på varandra följande mätpunkter ger en lutning som inte avviker nämnvärt från 0 vid en p-nivå på 0,05, vilket anger att log C_o/C_w är oberoende av tid.

Beräkning av log P_{OW}

51. Värdet på log P_{OW} i försöksenheten beräknas som det vägda medelvärdet för log C_o/C_w för den del av kurvan (log C_o/C_w som en funktion av tiden) där det har visats att jämvikt uppnåtts. Det vägda medelvärdet beräknas genom att data vägs med det inverterade värdet på variansen så att deras påverkan på slutresultatet är omvänt proportionell mot deras osäkerhet.

Genomsnittligt log P_{OW}

52. Medelvärdet av log P_{OW} för olika försöksenheter beräknas som medelvärdet av resultaten från de enskilda försöken viktade med sina respektive varianser.

Beräkningen utförs med hjälp av följande formel:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

där

$\log P_{OW,i}$ = log P_{OW}-värdet för den enskilda försöksenheten i

$\log P_{OW,Av}$ = det vägda medelvärdet för de enskilda bestämningarna av log P_{OW}

w_i = den statistiska vikt som tilldelats log P_{OW}-värdet för försöksenhet i.

Den inverterade variansen för log $P_{OW,i}$ används som w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Medelfelet av log P_{OW} uppskattas som den repeterbarhet för log C_o/C_w som bestäms under jämviktsfasen i varje enskild försöksenhet. Det uttrycks som den vägda standardavvikelsen för log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) som i sin tur är ett mått på det fel som hänger samman med $P_{OW,Av}$. Den vägda standardavvikelsen kan beräknas från den viktade variansen ($var_{\log Pow,Av}$) enligt följande formel:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symbolen n står för antalet försöksenheter.

▼M4

Testrapport

54. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testämne:

— Trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivande av den radioaktiva isotopens position för märkta ämnen) och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se punkt 17).

— Testämnets renhet (föroreningar).

— Renhet och aktivitet per mol hos den isotop som använts för märkning (i förekommande fall).

— Preliminär uppskattning av log P_{ow} samt angivande av den metod som används för att komma fram till detta värde.

Försöksbetingelser:

— Datum för utförandet av studierna.

— Temperatur under försöket.

— Volymer av 1-oktanol och vatten i början av testet.

— Borttagna provvolymer av 1-oktanol och vatten.

— Volymer 1-oktanol och vatten som återstår i testkärlen.

— Beskrivning av reaktionskärl och omrörningsparametrar (omrörarmagnetens och reaktionskärlets form, strömvirvelns djup i mm samt omrörningshastigheten om denna är känd).

— Metoder som använts för att analysera testämnet och dess kvantifieringsgräns.

— Provtagningstider.

— Vattenfasens pH-värde och eventuella buffertar som använts för att justera pH-värdet hos joniserbara molekyler.

— Antal replikat.

Resultat:

— De använda analysmetodernas repeterbarhet och känslighet.

— Koncentrationer av testämnet i 1-oktanol och vatten som funktion av tid.

— Demonstration av massbalans.

— Temperatur och standardavvikelse eller temperaturintervallet under försöket.

— En kurva som visar förhållandet mellan koncentrationer som funktion av tid.

— Medelvärdet för log $P_{ow,Av}$ och dess standardfel.

— Diskussion och tolkning av resultaten.

▼M4

— Exempel på rådata från en representativ analys (i enlighet med god laboratoriesed ska alla rådata sparas) som omfattar uppgifter om utbyten för surrogatstandarder, antal punkter på kalibreringskurvan (med angivande av kriterier för kalibreringskurvans korrelationskoefficient) samt resultat av kvalitetssäkring och kvalitetskontroll (QA/QC).

— Samt när det finns tillgängligt: Valideringsrapport för analysmetoden (ska tas upp i litteraturhänvisningarna).

LITTERATUR

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the ”slow-stirring” method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499–512.

(2) Kapitel A.8 i denna bilaga, fördelningskoefficient.

(3) Kapitel A.8 i denna bilaga, fördelningskoefficient.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, Förenta staterna.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Kapitel A.6 i denna bilaga, vattenlöslighet.

(11) Kapitel C.7 i denna bilaga, nedbrytning – abiotisk nedbrytning: hydrolys som funktion av pH.

(12) Kapitel C.4 – del II–VII (Metod A till F) i denna bilaga, bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(13) Kapitel A.4 i denna bilaga, ångtryck.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. I: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Kanada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. I Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.

(22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼M4

Tillägg 1

Kalkylblad för beräkning av de minsta vattenvolymer som krävs för detektion av testämnen med olika log P_{OW}-värden i vattenfasen

Antaganden:

— Maximal volym av enskilda alikvoter = 10 % av den totala volymen; 5 alikvoter = 50 % av den totala volymen.

— Testämnens koncentration = $0,7 \times$ löslighet i endera fasen. Vid lägre koncentrationer krävs större volymer.

— Volym som används för bestämning av detektionsgräns = 100 ml.

— log P_{ow} som en funktion av log S_w och log P_{ow} som en funktion av SR (S_{okt}/S_w) åskådliggör testämnenas förhållanden på ett rimligt sätt.

Uppskattning av S_w

log P_{ow}	Formel	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 3,192	6,427E-04

Uppskattning av S_{oct}

log P_{ow}	Formel	S_{okt} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Testämnets totala massa (mg)	$Massa_{oct}/Massa_{vatten}$	$Massa_{H2O}$ (mg)	$Konc_{H2O}$ (mg/l)	$Massa_{oct}$ (mg)	$Konc_{okt}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Beräkning av volymer

Minsta volym som krävs för H_2O-fasen vid olika detektionsgränser (uttryckta som koncentration)

$\log K_{ow}$	Detektionsgräns (mikrogram/l)	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Använd volym vid detektionsgränsen (I)	0,1					

Beräkningsnyckel

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 1 liters jämviktskärl.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 2 liters jämviktskärl.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 5 liters jämviktskärl.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 10 liters jämviktskärl.

Överskrider 10 % även av ett 10 liters jämviktskärl.

▼M4

Översikt över erforderliga volymer som en funktion av vattenlösligheten och log P_{ow}

Minsta volym som krävs för H_2O-fasen vid olika detektionsgränser (ml)

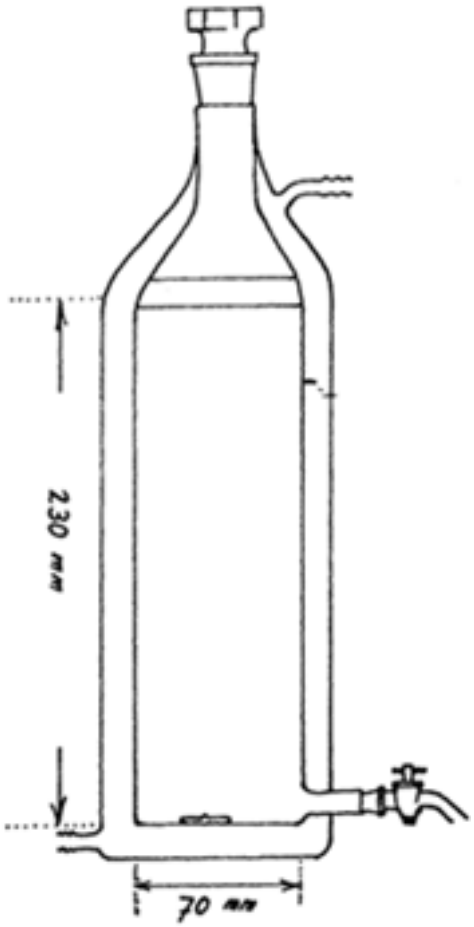
log P_{ow}	S_w (mg/l)	Detektionsgräns (mikrogram/l)	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	Detektionsgräns (mikrogram/l)	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Använd volym vid detektionsgränsen (l)		0,1					

Tillägg 2

Exempel på glasmantlat reaktionskärl för det försök med långsam omrörning som används för att bestämma P_{OW}



▼B

DEL B: METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET OCH ANDRA HÄLSOEFFEKTER

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

	ALLMÄN INLEDNING
B.1a	AKUT TOXICITET (ORALT) – METOD MED FASTA SÄRSKILJANDE DOSER
B.1b	AKUT TOXICITET ORALT – METOD FÖR BESTÄMNING AV AKUT TOXICITETSKLASS
B.2	AKUT INHALATIONSTOXICITET
B.3	AKUT TOXICITET (DERMALT)
B.4	AKUT TOXICITET: HUDIRRITATION/HUDKORROSION
B.5	AKUT TOXICITET: ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION
B.6	HUDSENSIBILISERING
B.7	28-DAGARS TOXICITETSSTUDIE MED UPPREPAD ORAL DOSERING PÅ GNAGARE
B.8	SUBAKUT INHALATIONSTOXICITET: 28-DAGARS STUDIE
B.9	TOXICITET VID UPPREPAD DOSERING (28 DAGAR, DERMALT)
B.10	MUTAGENICITET – TEST *IN VITRO* AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR
B.11	MUTAGENICITET – TEST *IN VIVO* AV KROMOSOMAVVIKELSER I BENMÄRG HOS DÄGGDJUR
B.12	MUTAGENICITET – TEST AV MIKROKÄRNOR *IN VIVO* I ERYTROCYTER HOS DÄGGDJUR
B.13/14	MUTAGENICITET – TEST AV ÅTERMUTATION HOS BAKTERIER
B.15	MUTAGENICITETSTEST OCH SVREENING FÖR CANCERGENICITET
B.16	MITOTISK REKOMBINATION – SACCHAROMYCES CEREVISIAE
B.17	MUTAGENICITET – TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER IN VITRO
B.18	DNA-SKADA OCH DNS-REPARATION – FELAKTIG DNA-SYNTES – DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*
B.19	TEST AVSEENDE SYSTERKROMATIDSBYTEN *IN VITRO*
B.20	KÖNSBUNDEN RECESSIV LETAL TEST PÅ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21	CELLTRANSFORMATIONSTEST PÅ DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*
B.22	DOMINANT LETAL TEST PÅ GNAGARE
B.23	SPERMATOGENIAL TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR
B.24	FLÄCKTEST PÅ MUS
B.25	TEST AVSEENDE ÄRFTLIG TRANSLOKATION PÅ MUS
B.26	TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET (90-DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ GNAGARE)
B.27	TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET (90-DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ ICKE-GNAGARE)
B.28	TEST AVSEENDE SUBKRONISK DERMAL TOXICITET (90-DAGARS REPETERAD DERMALTEST PÅ GNAGARE)
B.29	SUBKRONISK INHALATIONSTOXICITET: 90-DAGARSSTUDIE
B.30	STUDIER AV KRONISK TOXICITET
B.31	TEST AVSEENDE PRENATAL UTVECKLINGSTOXICITET
B.32	KARCINOGENICITETSSTUDIER
B.33	KOMBINERAD KRONISK TOXICITETS-/KARCINOGENICITETSSTUDIE
B.34	REPRODUKTIONSTOXICITETSTEST PÅ EN GENERATION
B.35	TEST AVSEENDE REPRODUKTIONSTOXICITET PÅ TVÅ GENERATIONER
B.36	TOXIKOKINETIK
B.37	FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR TILL FÖLJD AV AKUT EXPONERING
B.38	FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR (28 DAGARS UPPREPAD DOSUNDERSÖKNING)
B.39	TEST AV REPARATIONSSYNTES (uds) HOS LEVERCELLER FRÅN DÄGGDJUR *IN VIVO*
B.40	*IN VITRO*-TEST AV HUDKORROSIVITET: BESTÄMNING AV TRANSKUTANT ELEKTRISKT MOTSTÅND (TER)
B.40a	*IN VITRO*-TEST AV HUDKORROSIVITET: TEST MED MODELL AV HUMAN HUD

▼**B**

B.41	3T3 NRU-FOTOTOXICITETSTEST *IN VITRO*
B.42	HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY)
B.43	TEST AVSEENDE NEUROTOXICITET PÅ GNAGARE
B.44	HUDABSORPTION: *IN VIVO*-METOD
B.45	HUDABSORPTION: *IN VITRO*-METOD
B.46	*IN VITRO*-HUDIRRITATION: TESTMETOD MED REKONSTRUERAD HUMAN HUD
B.47.	TESTMETODEN BCOP (BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY) FÖR KLASSIFICERING AV ÄMNEN SOM FRÄTANDE ELLER KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN
B.48.	TESTMETODEN ICE (ISOLATED CHICKEN EYE TEST) FÖR IDENTIFIERING AV ÄMNEN SOM ÄR FRÄTANDE OCH KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN
B.49	MIKRONUKLEUSTEST AV DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*
B.50	HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): DA
B.51	HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): BrdU-ELISA

▼**M4**

B.52	AKUT INHALATIONSTOXICITET – AKUT TOXICITETSKLASS

▼B

ALLMÄN INLEDNING

A. BESKRIVNING AV TESTSUBSTANSEN

Testsubstansens sammansättning, inbegripet de viktigaste orenheterna, och dess relevanta fysikaliskt-kemiska egenskaper, inbegripet ämnets stabilitet, ska vara kända innan en toxicitetsundersökning inleds.

Testsubstansens fysikaliskt-kemiska egenskaper ger viktig vägledning vid val av tillförselväg, utformning av varje enskild undersökning samt hantering och lagring av testsubstansen.

En analysmetod för kvalitativ och kvantitativ bestämning av testsubstansen (om möjligt inbegripet viktiga orenheter) i doseringsmediet och i biologiska material bör utvecklas innan en undersökning inleds.

Alla uppgifter om identifiering av testsubstansen, dess fysikaliskt-kemiska egenskaper, renhet och beteende bör omfattas av testrapporten.

B. DJURVÅRD

En strikt kontroll av miljöförhållandena samt tillämpliga djurvårdsmetoder är grundläggande i fråga om toxicitetstester.

i) *Förvaltningsförhållanden*

Miljön i försöksdjurens rum eller burar ska vara avpassade efter djurarten. Lämpliga betingelser för råttor, möss och marsvin är en rumstemperatur på 22 ±3 ºC med en relativ luftfuktighet på 30 – 70 %. För kaniner och marsvin bör temperaturen hållas vid 20 ±3 ºC med en relativ luftfuktighet på 30 – 70 %.

Vissa testmetoder är särskilt känsliga för temperatureffekter och i dessa fall ingår detaljuppgifter om lämpliga betingelser i metodbeskrivningen. I alla undersökningar av toxiska effekter ska temperaturen och luftfuktigheten kontrolleras, registreras och anges i den slutliga testrapporten.

Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus, 12 timmar mörker. Detaljuppgifter om belysningsrytmen ska registreras och anges i den slutliga testrapporten.

Om inte annat anges för metoden får djuren inhysas individuellt eller i små grupper av samma kön; i fråga om grupper bör högst fem djur inhysas i varje bur.

I rapporter om djurförsök är det viktigt att ange vilken typ av bur som används och antalet djur i varje bur, både under exponering för det kemiska ämnet och under en påföljande observationstid.

▼B

ii) *Utfodring*

Fodret ska uppfylla alla näringsmässiga krav som kan ställas för den djurart som används i försöket. Om testsubstansen tillförs djuren via fodret kan näringsvärdet sjunka till följd av en samverkan mellan ämnet och någon beståndsdel i fodret. Möjligheten av en sådan reaktion ska övervägas vid tolkningen av testresultaten. Konventionellt laboratoriefoder får användas tillsammans med obegränsade mängder vatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning med testsubstansen när denna tillförs enligt denna metod.

I fodret får inte finnas störande koncentrationer av föroreningar som man vet påverkar toxiciteten.

C. ALTERNATIVA TESTER

För Europeiska unionen är det ett åtagande att främja utvecklandet och valideringen av alternativa metoder som kan ge samma informationsnivå som nuvarande djurförsök, men som använder färre djur, orsakar mindre lidande eller undviker användning av djur fullständigt.

När sådana metoder blir tillgängliga ska de om möjligt beaktas för riskbedömning och efterföljande klassificering och märkning av eventuella risker.

D. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

När tester utvärderas och tolkas ska begränsningarna för i vilken utsträckning resultaten av djurförsök och *in vitro*-undersökningar går att tillämpa på människor beaktas och därför får bevis för negativa effekter på människor i förekommande fall användas som bekräftelse av testresultaten.

E. LITTERATURHÄNVISNINGAR

De flesta av dessa metoder har utvecklats inom ramen för OECD:s program för riktlinjer för tester och bör utföras i enlighet med principerna för god laboratoriepraxis, i syfte att så långt möjligt säkerställa ”ömsesidigt godtagande av uppgifter”.

Ytterligare information finns i de hänvisningar som görs i OECD:s riktlinjer och relevant litteratur som publicerats på annat håll.

▼B

B.1a **AKUT TOXICITET (ORALT) – METOD MED FASTA SÄRSKILJANDE DOSER**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 420 (2001).

1.1 INLEDNING

Vid traditionella metoder för bedömning av akut toxicitet används djurens död som slutpunkt. 1984 föreslog British Toxicology Society en ny metod för test avseende akut toxicitet. Den nya metoden bygger på att djuren ges en serie doser på definierade nivåer (se hänvisning 1). Då behöver djurens död inte användas som slutpunkt, eftersom metoden bygger på observationer av klara tecken på toxicitet vid någon av de definierade dosnivåerna. Efter brittiska och internationella (se hänvisning 2 respektive 3) valideringsstudier *in vivo* 1992 detta förfarande som en testmetod. Därefter har metodens statistiska egenskaper utvärderats med hjälp av matematiska modeller i en serie studier (se hänvisning 4, 5, och 6). Med hjälp av dessa *in vivo*- och modelleringsstudier har man kunnat demonstrera att metoden är reproducerbar, kräver ett mindre antal djur och orsakar mindre lidande än de traditionella metoderna, och att metoden även gör det möjligt att klassificera ämnen på ett liknande sätt som med de övriga testmetoderna för akut toxicitet.

Riktlinjer för valet av den lämpligaste testmetoden för ett visst ändamål finns i vägledningen om testning av akut toxicitet oralt (se hänvisning 7). I vägledningen finns även tilläggsinformation rörande utförandet av testmetod B.1b och tolkningen av resultaten.

Metoden bygger på principen om att endast skäligen toxiska doser används i huvudtestet, och att doser som förväntas vara dödliga ska undvikas. Doser som, på grund av frätande eller allvarligt irriterande verkningar, är kända att orsaka klar smärta och svårt lidande behöver inte användas. Döende djur eller djur som uppvisar klara tecken på smärta eller allvarligt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt, och vid tolkningen av testresultaten ska dessa djur beaktas på samma sätt som djur som har dött under testets gång. Kriterierna för beslut rörande avlivning av döende eller svårt lidande djur, liksom även riktlinjer för tecknen på förutsägbar eller annalkande död, behandlas i en separat vägledning (se hänvisning 8).

Metoden ger information om ett ämnes farliga egenskaper och möjliggör klassificering av ämnet enligt det globala harmoniserade systemet (GHS) för klassificering av kemikalier som orsakar akut toxicitet (se hänvisning 9).

Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalkemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in* vivo-test avseende toxicitet, toxikologiska data om strukturellt närbesläktade ämnen och ämnets tilltänkta användningsändamål. Denna information behövs för att avgöra huruvida testet är relevant för skyddet av människors hälsa, och hjälper vid valet av en optimal startdos.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (oralt): De skadliga verkningar som uppträder efter oral tillförsel av en engångsdos av ett ämne eller upprepade doser som ges inom 24 timmar.

Fördröjd död: Det att ett djur inte dör eller är döende inom 48 timmar, men dör senare under den 14 dagar långa observationsperioden.

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (exempelvis mg/kg).

Uppenbar toxicitet: En allmän term för att beskriva klara tecken på toxicitet efter tillförsel av testämnet (exempel finns i hänvisning 3). Verkningarna är då så allvarliga att närmaste högre dos troligen leder till att största delen av djuren utsätts för svår smärta eller uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande, är döende (kriterierna anges i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 8) eller sannolikt dör.

GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier och blandningar. Systemet utarbetas gemensamt inom OECD (människors hälsa och miljö), FN:s expertkommitté om transport av farligt gods (fysikalkemiska egenskaper) och ILO (varningar). Samordningen sker genom det gemensamma programmet för sund kemikaliehantering (IOMC).

Annalkande död: När ett djur troligen är döende eller har dött före den nästa planenliga observationstidpunkten. Hos gnagare kan tecknen på annalkande död inbegripa konvulsioner, lateral kroppsställning, halvliggande ställning och tremor (närmare uppgifter finns i vägledning om konsekvenserna för människor, se hänvisning 8).

LD_{50} (median letal dos): En statistiskt fastställd engångsdos som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur som har tillförts dosen oralt. LD_{50}-värdet uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (mg/kg).

Gränsdos: En dos på den övre gränsnivån (2 000 eller 5 000 mg/kg).

Döende djur: Ett djur som håller på att dö eller som har små chanser att överleva, även om det får behandling (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenserna för människors hälsa, se hänvisning 8).

Förutsägbar död: Förekomsten av kliniska tecken som tyder på död vid en känd framtida tidpunkt som infaller före försökets planerade avslutningstidpunkt, exempelvis oförmåga att nå vatten eller föda (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenserna för människors hälsa, se hänvisning 8).

▼B

man når den dos som orsakar uppenbar toxicitet eller ett dödsfall, eller tills inga verkningar kan iakttas på den högsta dosnivån eller dödsfall inträffar på den lägsta dosnivån.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Rekommenderad gnagare är råtta, även om testet kan utföras med andra gnagare. I regel används hondjur (se hänvisning 7). Detta beror på att litteraturstudier av konventionella LD_{50}-test indikerar att känslighetsskillnaderna mellan könen är små, men att honorna i förekommande fall ofta är en aning mer känsliga (se hänvisning 10). Om däremot kunskaperna om strukturellt närbesläktade ämnens toxikologiska eller toxiko-kinetiska egenskaper tyder på att hanarna sannolikt är känsligare än honorna bör hanar användas. Om testet görs på hanar bör tillbörlig motivering ges.

Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. När dostillförseln inleds ska djuret vara mellan 8 och 12 veckor gammalt, och variationerna i vikt får vara högst ± 20 % av medelvikten för alla tidigare djur som har doserats.

1.4.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Djur som tillförs doser på samma nivå kan inhysas i samma bur, men antalet djur per bur får inte vara högre än att klara observationer kan göras av varje djur.

1.4.3 **Förberedelse av djuren**

Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst 5 dagar före doseringsstart.

▼B

1.4.4 **Förberedelse av doserna**

I regel ska de olika doserna av testämnet tillföras i en konstant volym, vilket innebär att doserna har varierande koncentration. När en slutprodukt i vätskeform eller en blandning testas, kan det med tanke på riskbedömningen vara mer relevant att använda testämnet i outspädd form (konstant koncentration), vilket även förutsätts av vissa tillsynsmyndigheter. Den maximala dosvolymen för tillförsel får aldrig överskridas. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på testdjurets storlek. För gnagare bör denna volym i regel inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt. I fråga om vattenlösningar får dock 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. För tillförsel av dosen rekommenderas alltid i första hand lösning, suspension eller emulsion i vatten, sedan lösning, suspension eller emulsion i olja (exempelvis majsolja) och därefter eventuella andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxikologiska egenskaperna vara kända. Doserna måste beredas strax före tillförseln, utom i fall där preparatets stabilitet är känd och har påvisats vara godtagbar över hela användningsperioden.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Tillförsel av doser**

Testämnet tillförs som en engångsdos genom sondmatning med hjälp av magsond eller lämplig intubationskanyl. I det sällsynta fallet att det inte är möjligt med en engångsdos, kan dosen tillföras i mindre delar över en period som inte överskrider 24 timmar.

Före dostillförseln hålls djuren fastande (utan föda och med tillgång till vatten, för råttor över natten och för möss i 3–4 timmar). Efter fasteperioden vägs djuren och testämnet tillförs. Efter tillförsel av ämnet kan djuren hållas utan föda i ytterligare 3–4 timmar (råttor) respektive 1–2 timmar (möss). Om dosen tillförs i delar över en tidsperiod kan det vara nödvändigt att ge djuren föda och vatten, beroende på periodens längd.

1.5.2 **Inledande test**

Avsikten med ett inledande test är att få en grund för valet av optimal startdos för huvudtestet. Testämnet tillförs enskilda djur enligt den sekvens som anges i flödesschemat i bilaga 1. Det inledande testet kan avslutas när sekvensen når fram till ett utfall om en startdos för huvudtestet (eller om ett djur dör på den lägsta angivna dosnivån).

Som startdos för det inledande testet väljs en av de angivna dosnivåerna 5, 50, 300 och 2 000 mg/kg. Startdosen väljs så att den troligen ger tecken på uppenbar toxicitet, och den ska i mån av möjlighet grunda sig på resultat från *in vivo*- och *in* vitro-test av samma kemikalie och strukturellt närbesläktade kemikalier. Om sådan information inte finns att tillgå, används startdosen 300 mg/kg.

Det bör gå minst 24 timmar från doseringen av att djur till doseringen av följande djur. Alla djur bör observeras i minst 14 dagar.

▼B

Undantagsvis, och endast när det kan motiveras med specifika tillsynskrav, får en ytterligare högre dosnivå på 5 000 mg/kg användas (se bilaga 3). Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur när det gäller GHS-kategori 5 (2 000–5 000 mg/kg). Sådan testning får endast göras när det finns en stark sannolikhet för att resultaten har en direkt relevans för skyddet av djurs eller människors hälsa eller av miljön.

I ett inledande test där ett djur dör vid den lägsta dosnivån (5 mg/kg), bör förfarandet i regel avslutas och ämnet klassificeras som tillhörande GHS-kategori 1 (se bilaga 1). Om det ändå behövs ytterligare bekräftelse av klassificeringen kan ett valfritt tilläggsförfarande genomföras. Detta går ut på att ett andra djur doseras vid nivån 5 mg/kg. Om detta andra djur dör, anses GHS-kategorin 1 vara bekräftad och testet avslutas omedelbart. Om det andra djuret överlever doseras högst tre tilläggsdjur vid nivån 5 mg/kg. Eftersom mortalitetsrisken är hög bör dessa djur av hänsyn till djurens välbefinnande doseras sekventiellt. Efter doseringen av ett djur får följande djur inte doseras förrän det är klart att det tidigare djuret sannolikt överlever. Om något av dessa djur dör ska doseringssekvensen omedelbart avslutas, och inga ytterligare djur ska doseras. Eftersom förekomsten av ett dödsfall till (oavsett hur många djur som har testats vid testets slut) leder till utfall A (två eller flera dödsfall), ska klassificeringen enligt bilaga 2 göras för dosen 5 mg/kg (kategori 1 om det förekommit två eller flera dödsfall eller kategori 2 om det inte förekommit fler än ett dödsfall). Dessutom innehåller bilaga 4 vägledning om klassificeringen enligt EU-systemet, som gäller tills det att det nya GHS-systemet har genomförts.

1.5.3 **Huvudtest**

1.5.3.1 *Antalet djur och dosnivåer*

I flödesschemat i bilaga 2 anges de steg som bör följas efter testning vid startdosnivå. Ett av tre steg måste tas – avsluta testet och riskklassificera ämnet på grundval av utfallet, testa vid en högre dosnivå eller testa vid en lägre dosnivå. Med hänsyn till djurens välbefinnande bör dosnivåer som har orsakat dödsfall i det inledande testet inte användas i huvudtestet (se bilaga 2). Erfarenheterna tyder på att det mest sannolika utfallet vid startdosnivån är att ämnet kan klassificeras och att ingen ytterligare testning behövs.

I regel används totalt fem djur av samma kön vid varje dosnivå. Dessa fem djur inbegriper det djur som i det inledande testet doserades vid den valda nivån och därutöver fyra djur (utom, i undantagsfall, om en dosnivå som används i huvudtestet inte har ingått i det inledande testet).

Tidsintervallet mellan doseringen vid varje nivå bestäms av start, varaktighet och allvarlighetsgrad för de toxiska tecknen. Doseringen av djuren på följande dosnivå bör inte inledas förrän det råder säkerhet om de tidigare doserade djurens överlevnad. I förekommande fall rekommenderas ett intervall på 3–4 dagar mellan doseringen vid de olika nivåerna, så att eventuella tecken på fördröjd toxicitet kan observeras. Tidsintervallet kan anpassas på tillbörligt sätt, exempelvis i fall där responsen är tvetydig.

▼B

I fall där man överväger att använda en övre dos på 5 000 mg/kg bör förfarandet enligt bilaga 3 följas (se även avsnitt 1.6.2).

1.5.3.2 *Gränstest (limit test)*

Gränstest används primärt i situationer där laboratoriet har information som tyder på att testämnet sannolikt inte är toxiskt (toxiskt endast ovanför de gränsdoser som anges i bestämmelser). Information om testämnets toxicitet kan härledas från kunskaperna om liknande testade ämnen eller liknande testade blandningar eller produkter, med hänsyn tagen till identiteten och halten av de komponenter som har känd toxikologisk signifikans. Om informationen om ämnets toxicitet är bristfällig eller saknas, eller om ämnet troligen är toxiskt, bör huvudtestet genomföras.

Som gränstest för den metod som beskrivs här kan man använda ett inledande test med en startdos på 2 000 mg/kg (eller undantagsvis 5 000 mg/kg) som åtföljs av dosering av ytterligare fyra djur vid denna nivå.

1.6 OBSERVATIONER

Efter doseringen observeras djuren individuellt minst en gång under de första 30 minuterna, periodiskt under de första 24 timmarna (med särskild uppmärksamhet under de första 4 timmarna) och därefter dagligen under totalt 14 dagar. Detta gäller inte för djur som av hänsyn till djurens välbefinnande måste avlivas skonsamt eller för djur som hittas döda. Observationsperiodens längd bör dock ha en anpassningsmån. Längden bör bestämmas enligt de toxiska reaktionerna, tidpunkten för när de sätter in och återhämtningsperiodens längd. Observationsperioden kan således förlängas om det anses vara nödvändigt. Tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om de toxiska tecknen tenderar att vara fördröjda (se hänvisning 11). Alla observationer registreras systematiskt, med individuella registreringar för varje djur.

Tilläggsobservationer behövs om djuren fortsätter att uppvisa tecken på toxicitet. Observationerna bör omfatta ändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet. Likaså bör den somatomotoriska aktiviteten och beteendemönstret observeras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Hänsyn bör tas till de principer och kriterier som anges i vägledningen om konsekvenserna för människor (se hänvisning 8). Djur som befinns vara döende och djur som visar tecken på svår smärta eller ihållande lidande bör avlivas skonsamt. I fall där djur avlivas av hänsyn till djurens välbefinnande eller hittas döda, bör tidpunkten för dödsfallet registreras så exakt som möjligt.

1.6.1 **Kroppsvikt**

Djurens individuella vikter bör registreras strax innan testämnet tillförs och därefter minst en gång per vecka. Alla viktändringar bör bestämmas och registreras. Vid testets slut vägs alla överlevande djur och därefter avlivas de skonsamt.

▼B

1.6.2 **Patologi**

Alla försöksdjur (inbegripet de som dött under testet eller som har avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande) bör obduceras. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur. Användbar information kan även fås genom mikroskopundersökning av organ som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt minst 24 timmar efter tillförsel av startdosen.

2. **DATA**

Data bör rapporteras individuellt per djur. Dessutom bör alla data sammanställas i tabellform. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur som använts, antalet djur som uppvisat tecken på toxicitet, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande, tidpunkterna för alla individuella dödsfall, en beskrivning av och förloppet för de toxiska verkningarna och deras reversibilitet samt obduktionsfynd.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter, enligt det som är relevant:

Testämne:

— Fysikalisk natur, renhet och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata, inbegripet CAS-nummer.

Vehikel (i förekommande fall).

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antalet djur, deras ålder och kön (och i förekommande fall en motivering för användning av hanar i stället för honor).

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— Detaljerade uppgifter om testämnets sammansättning, inbegripet uppgifter om den tillförda dosens fysikaliska form.

— Uppgifter om hur testämnet har tillförts, inbegripet dosens volym och doseringstidpunkt.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Motivering för valet av startdos.

▼B

Resultat:

— En tabell med responsdata och dosnivå för varje djur (djur som uppvisat tecken på toxicitet samt mortalitet, verkningarnas art, allvarlighetsgrad och varaktighet).

— Tabell med kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Djurens individuella vikt på doseringsdagen och därefter med en veckas intervall, samt tidpunkten för dödsfall eller avlivning.

— Datum och tidpunkt för dödsfall som inträffat före den planenliga avlivningen.

— Tidsförloppet för när tecken på toxicitet sätter in och huruvida tecknen är reversibla, för varje djur.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, i förekommande fall.

Diskussion och tolkning av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984), ”Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity”, *Human Toxicol.,* 3, 85–92.

2. M. J. Van den Heuvel, A.D. Dayan och R.O. Shillaker (1987), ”Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity”, *Human Toxicol.,* 6, 279–291.

3. M. J. Van den Heuvel, D.G. Clark, R.J. Fielder, P.P. Koundakjian, G.J.A. Oliver, D. Pelling, N.J. Tomlinson och A.P. Walker (1990), ”The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test”, *Fd. Chem. Toxicol.,* 28, 469–482.

4. A. Whitehead och R.N. Curnow (1992), ”Statistical evaluation of the fixed-dose procedure”, *Fd. Chem. Toxicol.,* 30, 313–324.

5. N. Stallard och A. Whitehead (1995), ”Reducing numbers in the fixed-dose procedure”, *Human Exptl. Toxicol.,* 14, 315–323.

6. Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002), Statistical evaluation of the revised fixed dose pro cedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183–196.

7. OECD (2001), ”Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing”, *Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment,* 24, Paris.

8. OECD (2000), ”Guidance Document on the Recognition”, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety *Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment,* 19.

▼B

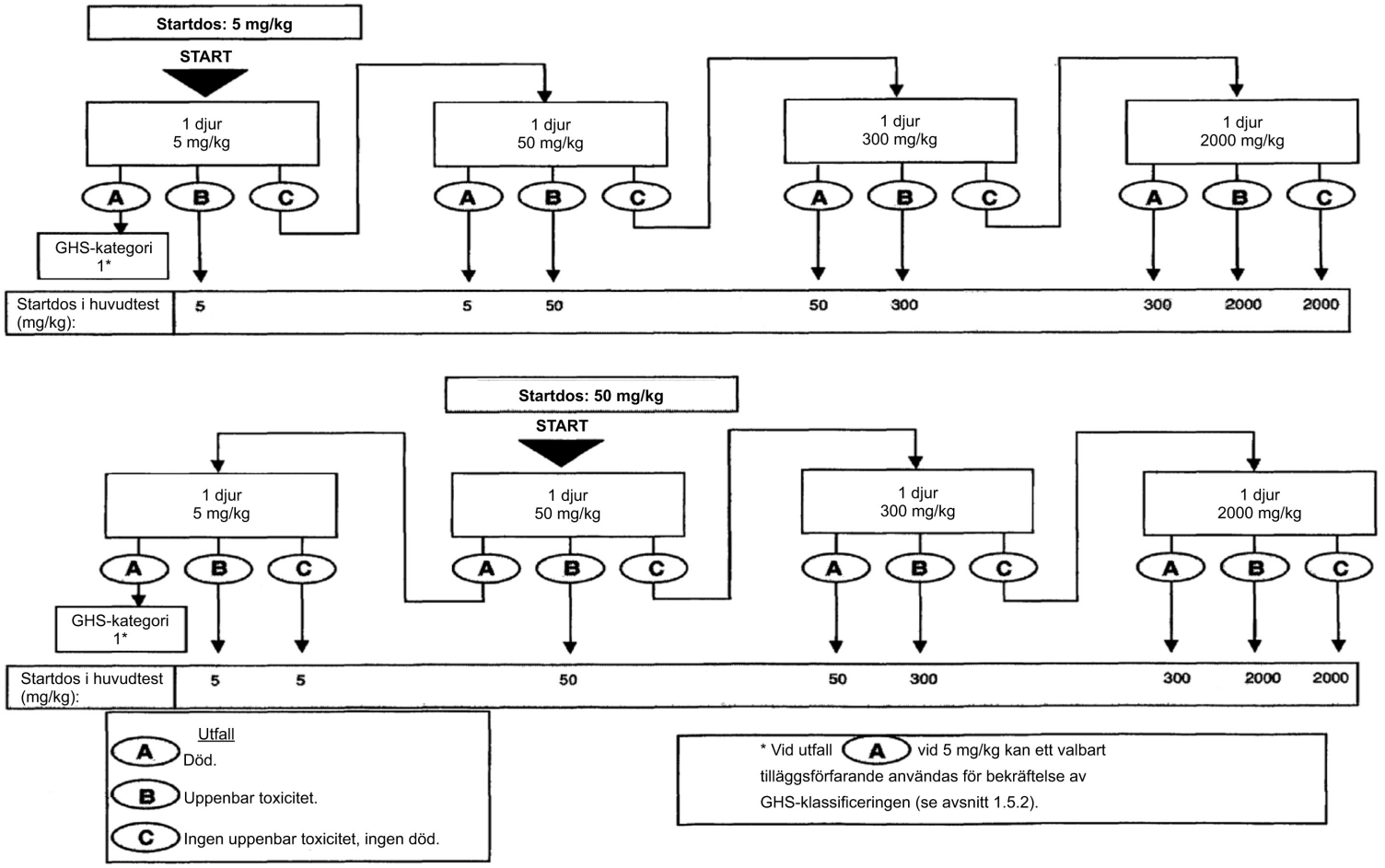
9. OECD (1998), ”Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2”, s. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/ pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html).

10. R.L. Lipnick, J.A. Cotruvo, R.N. Hill, R.D. Bruce, K.A. Stitzel, A.P. Walker, I. Chu, M. Goddard, L. Segal, J.A. Springer och R.C. Myers (1995), ”Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures”, *Fd. Chem. Toxicol.,* 33, 223–231.

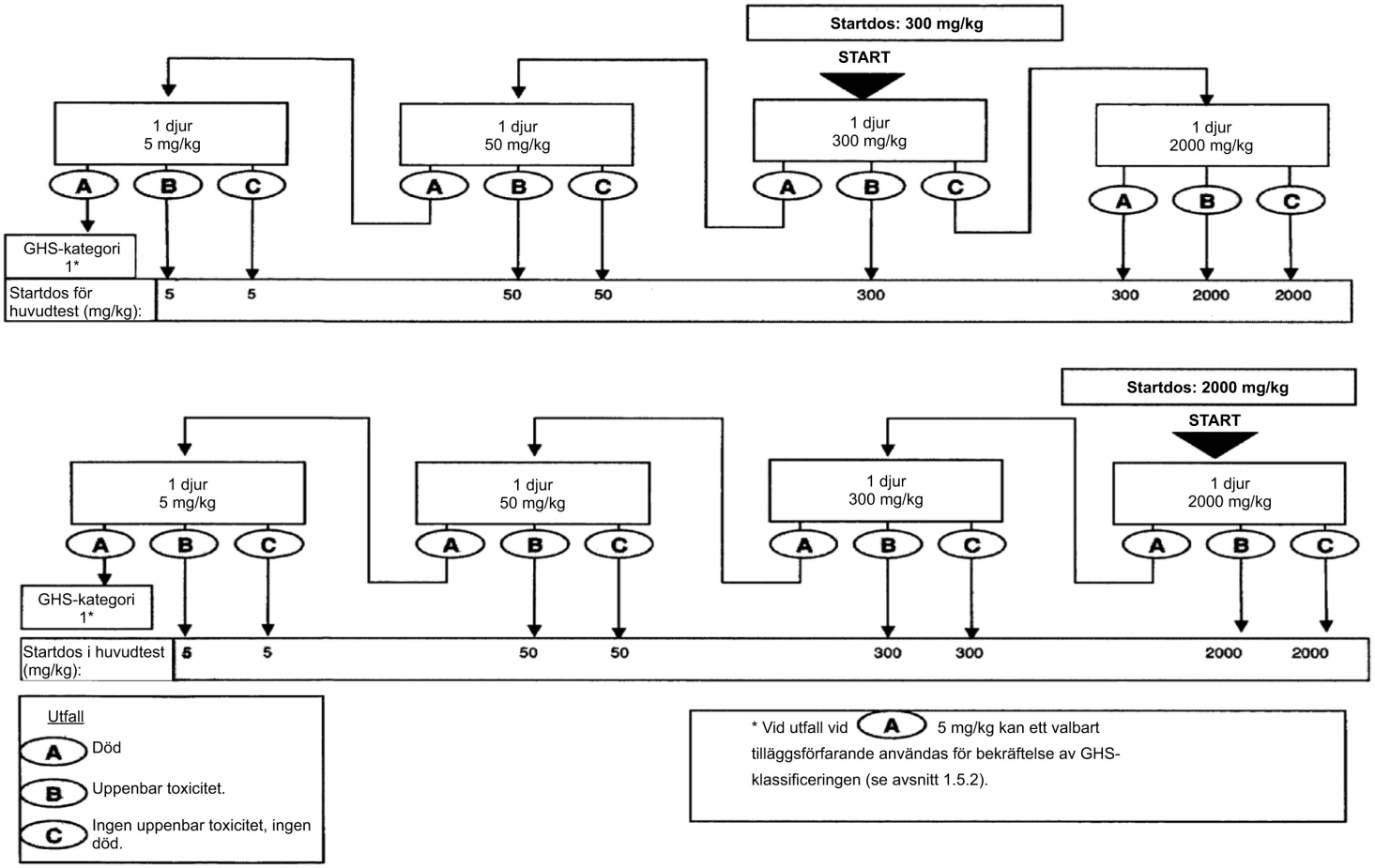
11. P.K Chan och A.W. Hayes (1994), ”Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation, *Principles and Methods of Toxicology*”, 3rd Edition, red. A.W. Hayes, Raven Press, Ltd. New York, USA.

Bilaga 1

FLÖDESSCHEMA FÖR INLEDANDE TEST

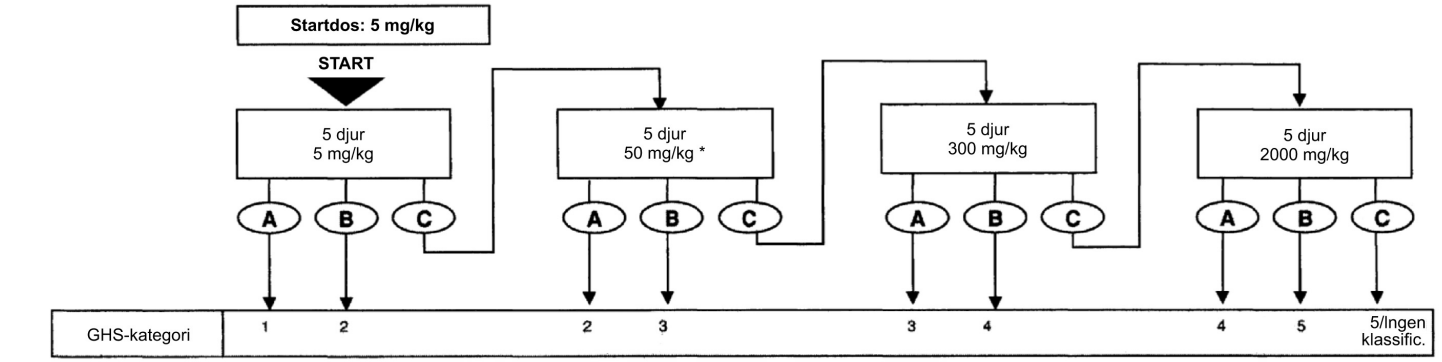


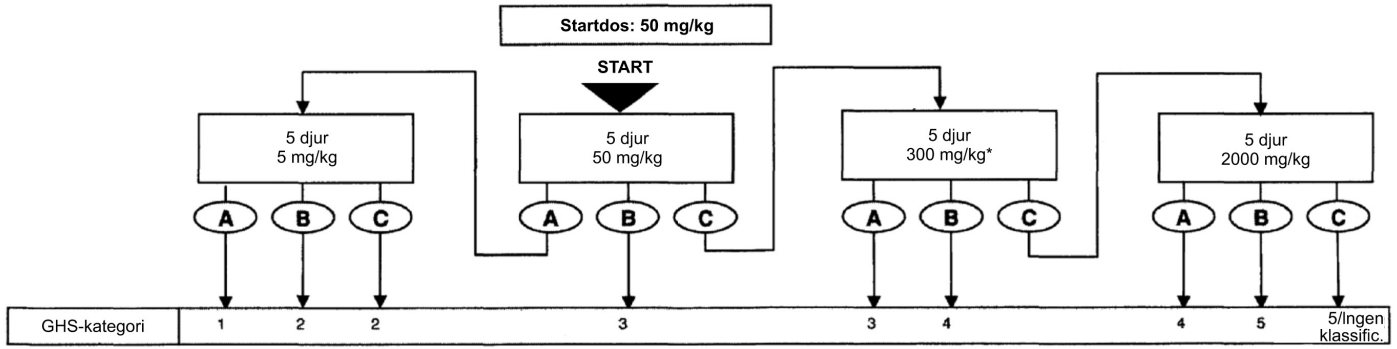
▼B


Startdos: 300 mg/kg
START
1 djur
5 mg/kg
1 djur
50 mg/kg
1 djur
300 mg/kg
1 djur
2000 mg/kg
A
B
C
GHS-kategori
1*
Startdos för
huvudtest (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Startdos: 2000 mg/kg
START
1 djur
5 mg/kg
1 djur
50 mg/kg
1 djur
300 mg/kg
1 djur
2000 mg/kg
GHS-kategori
1*
Startdos i huvudtest
(mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Utfall
A
Död
B
Uppenbar toxicitet.
C
Ingen uppenbar toxicitet, ingen död.
* Vid utfall vid A 5 mg/kg kan ett valbart tilläggsförfarande användas för bekräftelse av GHS-klassificeringen (se avsnitt 1.5.2).

Bilaga 2

FLÖDESSCHEMA FÖR HUVUDTEST





Utfall

A ≥ 2 dödsfall.

B ≥ 1 fall av uppenbar toxicitet och/eller 1 dödsfall.

C Ingen uppenbar toxicitet, inga dödsfall.

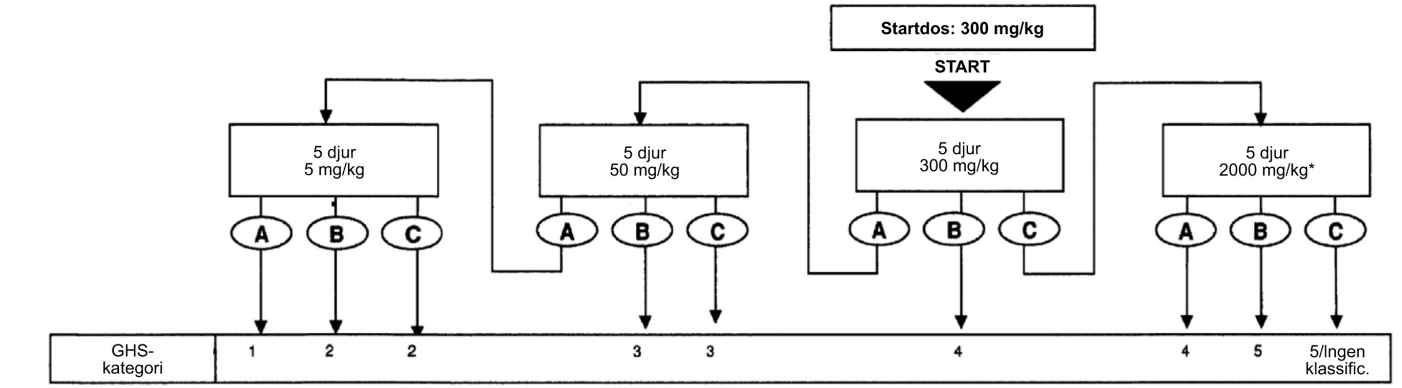
Gruppstorlek

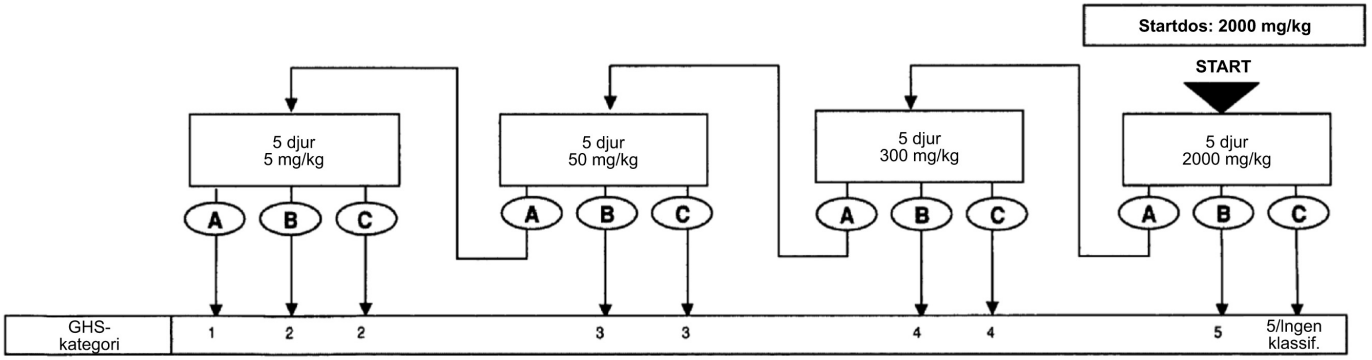
De 5 djuren i varje huvudtest inbegriper alla djur som testats vid den dosnivån i det inledande testet.

*Djurens välbefinnande styr

Om denna dosnivå har lett till dödsfall i det inledande testet skall inga fler djur testas. Gå direkt till utfall A

▼B





Utfall

A ≥ 2 dödsfall.

B ≥ 1 fall av uppenbar toxicitet och/eller 1 dödsfall.

C Ingen uppenbar toxicitet, inga dödsfall.

Gruppstorlek

De 5 djuren i varje huvudtest inbegriper alla djur som testats på den dosnivån i det inledande testet.

* Djurens välbefinnande styr

Om djur har dött vid denna dosnivå i det inledande testet skall inga fler djur testas.

Gå direkt till utfall A.

▼B

Bilaga 3

KRITERIER FÖR HUR TESTÄMNEN MED FÖRVÄNTADE LD_{50}-VÄRDEN ÖVER 2 000 MG/KG KAN KLASSIFICERAS UTAN TESTNING

Med hjälp av kriterierna för riskkategori 5 kan man identifiera testämnen som har en relativt låg risk för akut toxicitet men som under vissa omständigheter kan utgöra en risk för sårbara populationer. Dessa ämnen förväntas ha ett LD_{50}-värde (oralt eller via huden) inom området 2 000–5 000 mg/kg eller motsvarande doser i fråga om andra tillförselvägar. Ett testämne kan klassificeras enligt riskkategorin 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (GHS-kategori 5) i följande fall:

a) Om ämnet hänförs till denna kategori enligt utfallet i något av de testningsscheman som finns i bilaga 2, på grundval av mortalitet.

b) Om det redan finns tillförlitliga bevis för att LD_{50}-värdet ligger inom det intervall som motsvarar kategori 5 eller om tidigare djurförsök eller toxiska verkningar hos människor tyder på akut fara för människors hälsa.

c) På grundval av extrapolering, uppskattning eller mätning av data, om det inte är motiverat att placera ämnet i en högre riskklass.

— Om det finns tillförlitlig information som tyder på betydande toxiska verkningar hos människor, eller något av följande:

— Mortalitet kan observeras vid testning med värden upp till kategori 4.

— En bedömning av sakkunniga bekräftar betydande kliniska tecken på toxicitet vid testning upp till värden för kategori 4, med undantag av diarré, upprest päls eller ovårdat utseende.

— En bedömning av sakkunniga bekräftar tillförlitlig information från andra djurförsök som tyder på förmågan till betydande akuta verkningar.

TESTNING PÅ DOSNIVÅER ÖVER 2 000 MG/KG

Undantagsvis, och endast när det kan motiveras med specifika tillsynskrav, får en ytterligare övre dosnivå på 5 000 mg/kg användas. Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur vid dosnivån 5 000 mg/kg. Sådan testning bör endast övervägas när det finns en stark sannolikhet för att resultaten har en direkt relevans för skyddet av djurs eller människors hälsa (9).

Inledande test

De beslutsregler som styr det sekventiella förfarandet enligt bilaga 1 utökas till att innefatta en dosnivå på 5 000 mg/kg. När en startdos på 5 000 mg/kg används vid ett inledande test och utfallet blir A (död) måste således ytterligare ett djur testas vid nivån 2 000 mg/kg, medan utfallen B och C (uppenbar toxicitet eller ingen toxicitet) gör det möjligt att använda 5 000 mg/kg som startdos i huvudtestet. På samma sätt gäller att om en startdos annan än 5 000 mg/kg används i ett test där man går vidare till 5 000 mg/kg efter att ha fått utfall B eller C vid nivån 2 000 mg/kg, leder ett utfall A på nivån 5 000 mg/kg till att huvudtestets startnivå blir 2 000 mg/kg medan utfallen B och C leder till 5 000 mg/kg som startnivå.

▼B

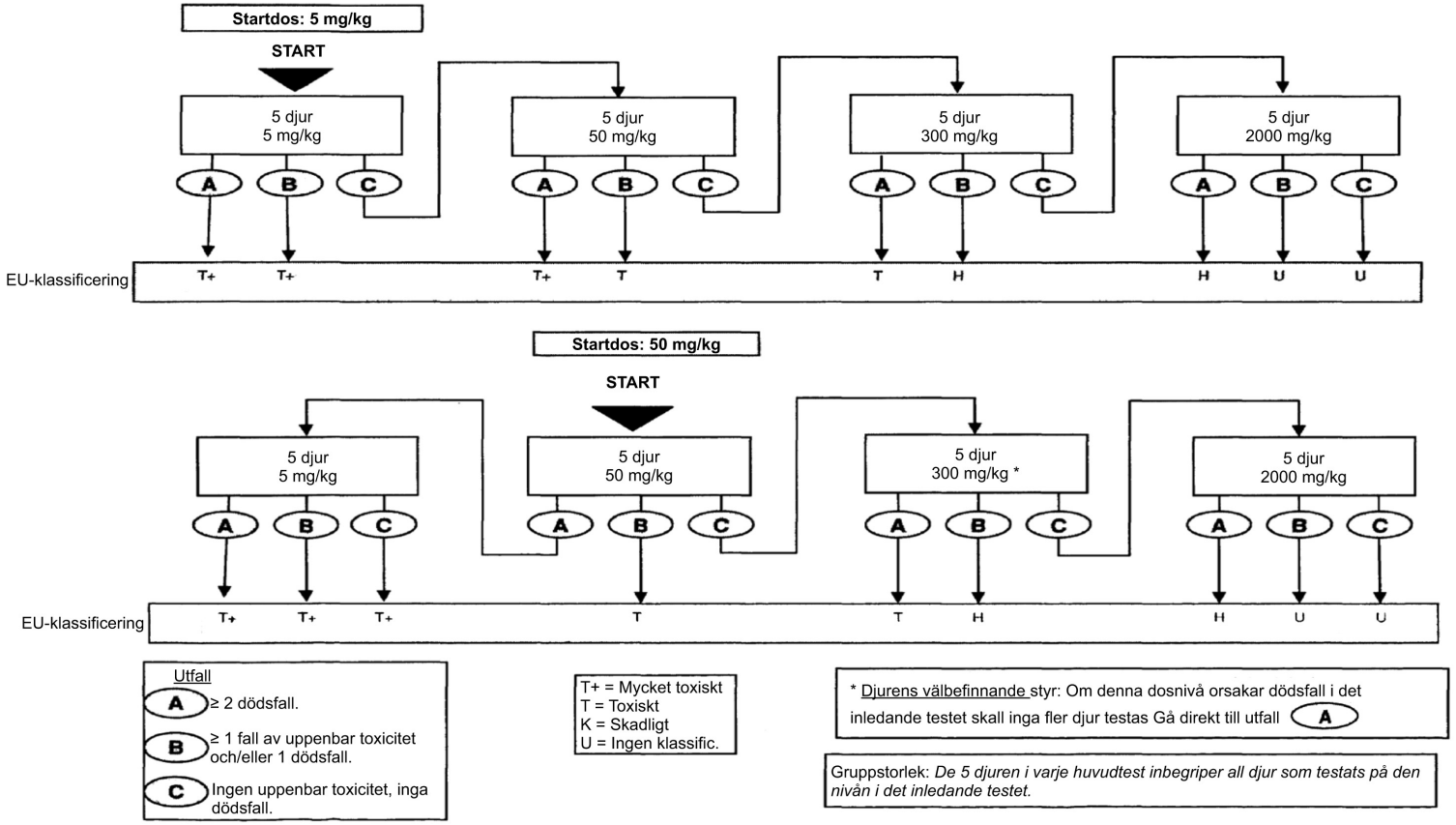
Huvudtest

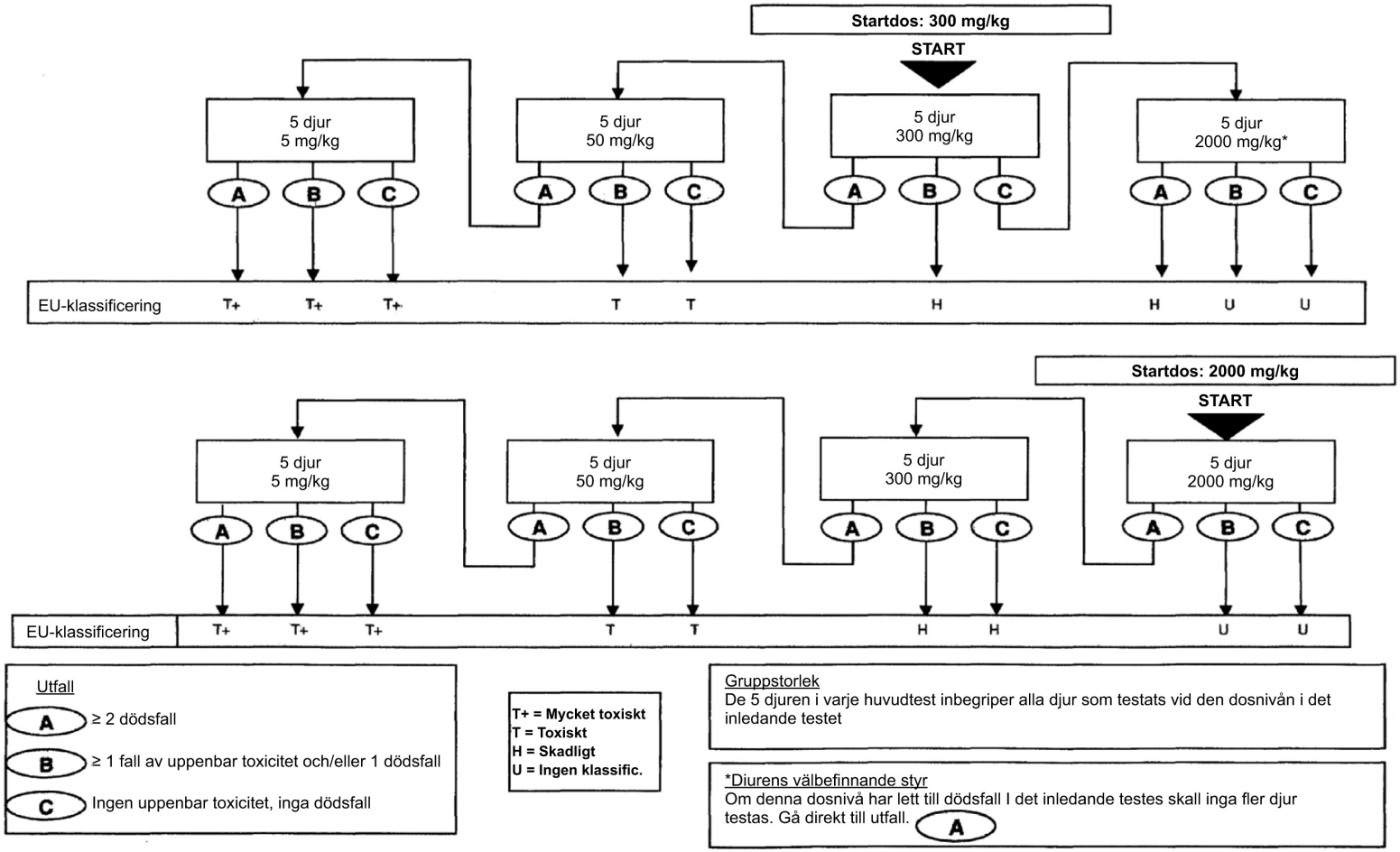
De beslutsregler som styr det sekventiella förfarandet enligt bilaga 2 utökas till att innefatta en dosnivå på 5 000 mg/kg. Detta innebär att utfallet A (≥ 2 dödsfall) i ett huvudtest med startdosen 5 000 mg/kg leder till att en ytterligare grupp måste testas vid nivån 2 000 mg/kg, medan utfallet B (uppenbar toxicitet och/eller ≤ 1 dödsfall) eller C (ingen toxicitet) leder till att ämnet inte får någon klassificering enligt GHS. På liknande sätt gäller att om en startdos annan än 5 000 mg/kg används i ett test och man har gått vidare till dosnivån 5 000 mg/kg efter att ha fått utfall C vid dosnivån 2 000 mg/kg, leder utfallet A vid dosnivån 5 000 mg/kg till att ämnet anses tillhöra GHS-kategorin 5 medan utfall B eller C leder till att ämnet inte får någon klassificering.

Bilaga 4

TESTMETOD B.1 b

– Vägledning för klassificering enligt EU-Systemet, som gäller under övergångsperioden tills det globala harmoniserade systemet (GHS) för kassificering har genomförts helt (ur hänvisning 8)




Startdos: 300 mg/kg
START
5 djur
5 mg/kg
5 djur
50 mg/kg
5 djur
300 mg/kg
5 djur
2000 mg/kg*
A
B
C
EU-klassificering
T+ T+ T+ T T H H U U
Startdos: 2000 mg/kg
START
5 djur
5 mg/kg
5 djur
50 mg/kg
5 djur
300 mg/kg
5 djur
2000 mg/kg
EU-klassificering
T+ T+ T+ T T H H U U
Utfall
A ≥ 2 dödsfall
B ≥ 1 fall av uppenbar toxicitet och/eller 1 dödsfall
C Ingen uppenbar toxicitet, inga dödsfall
T+ = Mycket toxiskt
T = Toxiskt
H = Skadligt
U = Ingen klassific.
Gruppstorlek
De 5 djuren i varje huvudtest inbegriper alla djur som testats vid den dosnivån i det inledande testet
*Diurens välbefinnande styr
Om denna dosnivå har lett till dödsfall I det inledande testes skall inga fler djur testas. Gå direkt till utfall. A

▼B

B.1b **AKUT TOXICITET ORALT – METOD FÖR BESTÄMNING AV AKUT TOXICITETSKLASS**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 423 (2001).

1.1 INLEDNING

Denna metod för bestämning av akut toxicitetsklass (se hänvisning 1) är ett stegvis förfarande där tre djur av samma kön används per steg. Beroende på mortaliteten och/eller förekomsten av döende djur behövs det i genomsnitt 2–4 steg för bedömningen av testämnets akuta toxicitet. Förfarandet är reproducerbart, kräver mycket få djur och ger en möjlighet att klassificera ämnen på ett liknande sätt som med de övriga metoderna för testning av akut toxicitet. Metoden för bestämning av akut toxicitetsklass baserar sig på biometriska bedömningar (se hänvisningarna 2, 3, 4 och 5) och fast definierade doser på tillräckligt separerade nivåer för att testämnet ska kunna kategoriseras för klassificering och riskbedömning. Metoden antogs 1996 och har validerats omfattande *in vivo* mot LD_{50}-data som erhållits vid litteraturstudier, både nationellt (se hänvisning 6) och internationellt (se hänvisning 7).

Riktlinjer för valet av den lämpligaste testmetoden för ett bestämt ändamål finns i vägledningen för testning av akut oral toxicitet (se hänvisning 8). I vägledningsdokumentet finns även tilläggsinformation rörande utförandet av testmetod B.1b och tolkningen av resultaten.

Testämnesdoser som, på grund av frätande eller allvarligt irriterande verkningar, är kända att orsaka klar smärta och svårt lidande behöver inte ges. Döende djur eller djur som uppvisar klara tecken på smärta eller allvarligt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt, och vid tolkningen av testresultaten ska dessa djur beaktas på samma sätt som djur som har dött under testets gång. Kriterierna för beslut rörande avlivning av döende eller svårt lidande djur, liksom även vägledning om igenkänning av förutsägbar eller annalkande död, behandlas i en separat vägledning (se hänvisning 9).

Metoden bygger på användning av fast definierade doser, och resultatet ger en möjlighet att kategorisera och klassificera ett ämne enligt det globala harmoniserade systemet (GHS) för klassificering och märkning av kemikalier som orsakar akut toxicitet (se hänvisning 10).

Även om metoden i princip inte är avsedd att användas för beräkning av exakta LD_{50}-värden ger den ändå en möjlighet att bestämma exponeringsområden där ämnets verkan sannolikt är dödlig, eftersom den viktigaste ändpunkten för detta test fortfarande är andelen djur som dör. Bestämning av ett LD_{50}-värde med denna metod kan endast göras när minst två doser leder till en mortalitet som är högre än 0 % och lägre än 100 %. Eftersom testningen alltid utförs med fast definierade doser, oavsett vilket ämne som testas, och klassificeringen uttryckligen är bunden till antalet djur som reagerar på ett visst sätt, ökas möjligheterna till enhetliga testrapporter och repeterbarhet mellan olika laboratorier.

▼B

Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalkemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vivo*- eller *in* vitro-test avseende toxicitet, toxikologiska data om strukturellt närbesläktade ämnen och ämnets förutsedda användningsändamål. Denna information behövs för att avgöra huruvida testet är relevant för skyddet av människors hälsa, och utgör en hjälp vid valet av en optimal startdos.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (oralt): De skadliga verkningar som uppträder efter oral tillförsel av en engångsdos av ett ämne eller upprepade doser som ges inom 24 timmar.

Fördröjd död: Det att ett djur inte dör eller är döende inom 48 timmar, men dör senare under den 14 dagar långa observationsperioden.

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (exempelvis mg/kg).

GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier och blandningar. Systemet utarbetas gemensamt inom OECD (människors hälsa och miljö), FN:s expertkommitté om transport av farligt gods (fysikalkemiska egenskaper) och ILO (varningar). Samordningen sker genom det gemensamma programmet för sund kemikaliehantering (IOMC).

Annalkande död: När ett djur troligen är döende eller har dött före den nästa planenliga observationstidpunkten. Tecken som tyder på detta tillstånd kan hos gnagare inbegripa konvulsioner, kroppsställning på sidan, bakåtlutad kroppsställning och tremor (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 9).

LD_{50} (median letal dos, oralt): En statistiskt fastställd engångsdos som troligen leder till döden för 50 % av de djur som har tillförts dosen oralt. LD_{50}-värdet uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (mg/kg).

Gränsdos: En testdos vid den övre gränsnivån (2 000 eller 5 000 mg/kg).

Döende djur: Ett djur som håller på att dö eller som har små chanser att överleva, även om det får behandling (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 9).

Förutsägbar död: Förekomsten av kliniska tecken som tyder på död vid en känd framtida tidpunkt som infaller före försökets planerade avslutningstidpunkt, exempelvis oförmåga att nå vatten eller föda (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 9).

▼B

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testmetoden bygger på principen om att man genom ett stegvis förfarande med ett minimalt antal djur per steg kan få tillräcklig information om testämnets akuta toxicitet för att det ska vara möjligt att klassificera ämnet. Ämnet tillförs oralt till en grupp försöksdjur vid en av de definierade dosnivåerna. Ämnet testas genom ett stegvis förfarande med tre djur av samma kön (i regel honor) per steg. Avsaknaden eller förekomsten av ämnesrelaterad mortalitet hos de djur som doserats på ett visst steg avgör vilket av följande som blir nästa steg:

— Ingen ytterligare testning behövs.

— Ytterligare tre djur tillförs en lika stor dos.

— Ytterligare tre djur tillförs en dos på nästa högre eller lägre dosnivå.

Testningsförfarandet beskrivs närmare i bilaga 1. När denna metod används kan testämnet genom de olika utfallen placeras i en av de toxicitetsklasser som definieras genom fasta LD_{50}-gränsvärden.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Rekommenderad gnagare är råtta, även om testet kan utföras med andra gnagare. I regel används hondjur (se hänvisning 9). Skälet till detta är att litteraturundersökningar av konventionella LD_{50}-test tyder på att känslighetsskillnaderna mellan könen är små, men att honorna i förekommande fall ofta är en aning mer känsliga (se hänvisning 11). Om däremot kunskaperna om strukturellt närbesläktade ämnens toxikologiska eller toxikokinetiska egenskaper tyder på att hanarna sannolikt är känsligare än honorna bör hanar användas. Om testet görs på hanar bör tillbörlig motivering ges.

Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. När dostillförseln inleds ska djuret vara mellan 8 och 12 veckor gammalt, och variationerna i vikt får vara högst ± 20 % av medelvikten för alla tidigare djur som har doserats.

1.4.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Djur som tillförs doser på samma nivå kan inhysas i samma bur, men antalet djur per bur får inte vara högre än att klara observationer kan göras av varje djur.

▼B

1.4.3 **Förberedelse av djuren**

Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst 5 dagar före doseringsstart.

1.4.4 **Förberedelse av doserna**

I regel ska de olika doserna av testämnet tillföras i en konstant volym, vilket innebär att doserna har varierande koncentration. När slutprodukter i vätskeform eller blandningar testas, kan det med tanke på riskbedömningen vara mer relevant att använda testämnet i outspädd form (konstant koncentration), vilket även förutsätts av vissa tillsynsmyndigheter. Den maximala dosvolymen för tillförsel får aldrig överskridas. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på testdjurets storlek. För gnagare bör denna volym i regel inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt. I fråga om vattenlösningar får dock 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. För tillförsel av dosen rekommenderas alltid i första hand lösning, suspension eller emulsion i vatten, sedan lösning, suspension eller emulsion i olja (exempelvis majsolja) och därefter eventuella andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxikologiska egenskaperna vara kända. Doserna måste beredas strax före tillförseln, om inte preparatets stabilitet är känd och har påvisats vara godtagbar över hela användningsperioden.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Tillförsel av doser**

Testämnet tillförs som en engångsdos genom sondmatning med hjälp av magsond eller lämplig intubationskanyl. I det sällsynta fall det inte är möjligt med en engångsdos, kan dosen tillföras i mindre delar över en period som inte överskrider 24 timmar.

Före dostillförseln hålls djuren fastande (utan föda och med tillgång till vatten, för råttor över natten och för möss i 3–4 timmar). Efter fasteperioden vägs djuren och testämnet tillförs. Efter tillförsel av ämnet kan djuren hållas utan föda i ytterligare 3–4 timmar (råttor) respektive 1–2 timmar (möss). Om dosen tillförs i delar över en tidsperiod kan det vara nödvändigt att ge djuren föda och vatten, beroende på tidsperiodens längd.

1.5.2 **Antalet djur och dosnivåer**

Tre djur används per steg. För startdosen väljs en av fyra fast definierade nivåer (5, 50, 300 eller 2 000 mg per kg kroppsvikt). För startdosen väljs den nivå som högst sannolikt leder till att ett antal av de doserade djuren dör. I flödesschemat i bilaga 1 beskrivs de förfaranden som gäller för de olika startdoserna. Dessutom innehåller bilaga 4 vägledning om klassificeringen enligt EU-systemet, som gäller tills det att det nya GHS-systemet har genomförts.

▼B

Om den tillgängliga informationen tyder på att inga djur dör vid den högsta startdosnivån (2 000 mg per kg kroppsvikt) bör ett gränstest utföras. Om det inte finns någon information tillgänglig om testämnet, rekommenderas med hänsyn till djurens välbefinnande att startdosen 300 mg per kg kroppsvikt används.

Tidsintervallet mellan dostillförseln till de olika grupperna bestäms av start, varaktighet och allvarlighets-grad för de toxiska tecknen. Doseringen av djuren på nästa dosnivå bör inte inledas förrän det råder säkerhet om de tidigare doserade djurens överlevnad.

Undantagsvis, och endast när det kan motiveras med specifika tillsynskrav, får en ytterligare övre dosnivå på 5 000 mg per kg kroppsvikt användas (se bilaga 2). Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur när det gäller GHS-kategori 5 (2 000–5 000 mg per kg kroppsvikt). Sådan testning bör endast övervägas när det finns en stark sannolikhet för att resultaten har direkt relevans för skyddet av människors eller djurs hälsa eller av miljön.

1.5.3 **Gränstest**

Gränstest används primärt i situationer där laboratoriet har information som tyder på att testämnet sannolikt inte är toxiskt (toxiskt endast ovanför de gränsdoser som anges i gällande föreskrifter). Information om testämnets toxicitet kan härledas från kunskaperna om liknande testade ämnen eller liknande testade blandningar eller produkter, med hänsyn tagen till identiteten och halten av de komponenter som har känd toxikologisk signifikans. Om informationen om ämnets toxicitet är bristfällig eller saknas, eller om ämnet troligen är toxiskt, bör huvudtestet genomföras.

Ett gränstest vid en dosnivå 2 000 mg per kg kroppsvikt kan utföras med sex djur (tre djur per steg). Undantagsvis kan ett gränstest på dosnivån 5 000 mg per kg kroppsvikt utföras med tre djur (se bilaga 2). Om testämnet orsakar dödsfall måste eventuellt ytterligare testning utföras på närmaste lägre nivå.

1.6 OBSERVATIONER

Efter doseringen observeras djuren individuellt minst en gång under de första 30 minuterna, periodiskt under de första 24 timmarna (med särskild uppmärksamhet under de första 4 timmarna) och därefter dagligen under totalt 14 dagar. Detta gäller inte för djur som av hänsyn till djurens välbefinnande måste avlivas skonsamt eller för djur som hittas döda. Observationsperiodens längd bör dock ha en anpassningsmån. Längden bör bestämmas enligt de toxiska reaktionerna, tidpunkten för när de sätter in och återhämtningsperiodens längd. Observationsperioden kan således förlängas om det anses vara nödvändigt. Tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om de toxiska tecknen tenderar att vara fördröjda (se hänvisning 12). Alla observationer registreras systematiskt, med individuella registreringar för varje djur.

▼B

Tilläggsobservationer behövs om djuren fortsätter att uppvisa tecken på toxicitet. Observationerna bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet. Likaså bör den somatomotoriska aktiviteten och beteendemönstret observeras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Hänsyn bör tas till de principer och kriterier som anges i vägledningen om konsekvenser för människor (se hänvisning 8). Djur som befinns vara döende och djur som visar tecken på svår smärta eller ihållande lidande bör avlivas skonsamt. I fall där djur avlivas av hänsyn till djurens välbefinnande eller hittas döda, bör tidpunkten för dödsfallet registreras så exakt som möjligt.

1.6.1 **Kroppsvikt**

Djurens vikt bör registreras individuellt strax före testämnet tillförs och därefter minst en gång per vecka. Alla viktändringar bör bestämmas och registreras. Vid testets slut vägs alla överlevande djur och avlivas därefter skonsamt.

1.6.2 **Patologi**

Alla försöksdjur (inbegripet de som dött under testet eller som har avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande) bör obduceras. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur. Användbar information kan även fås genom mikroskopundersökning av organ som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt minst 24 timmar efter tillförsel av startdosen.

2. **DATA**

Data bör rapporteras individuellt per djur. Dessutom bör alla data sammanställas i tabellform. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur som använts, antalet djur som uppvisat tecken på toxicitet, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande, tidpunkterna för alla individuella dödsfall, en beskrivning av och förloppet för de toxiska verkningarna och deras reversibili-tet samt obduktionsfynd.

3. **RAPPORTERING**

3.1 **Testrapport**

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter, enligt det som är relevant:

Testämne:

— Fysikalisk natur, renhet och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata, inbegripet CAS-nummer.

Vehikel (i förekommande fall).

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

▼B

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antalet djur, deras ålder och kön (och i förekommande fall en motivering för användning av hanar i stället för honor).

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— Detaljerade uppgifter om testämnets sammansättning, inbegripet uppgifter om den tillförda dosens fysikaliska form.

— Uppgifter om hur testämnet har tillförts, inbegripet dosens volym och doseringstidpunkten.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Motivering för valet av startdos.

Resultat:

— En tabell med responsdata och dosnivå för varje djur (djur som uppvisat tecken på toxicitet samt mortalitet, verkningarnas natur, allvarlighetsgrad och varaktighet).

— Tabell med kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Djurens individuella vikt på doseringsdagen och därefter med en veckas intervall, samt tidpunkten för dödsfall eller avlivning.

— Datum och tidpunkt för dödsfall som inträffat före den planenliga avlivningen.

— Tidsförloppet för när tecken på toxicitet sätter in och huruvida dessa är reversibla, för varje djur.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, i förekommande fall.

Diskussion och tolkning av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Roll R., Höfer-Bosse T. and Kayser D. (1986), New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

2. Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989), Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

3. Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994), The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral), Arch. Toxicol. 68, 559–610.

4. Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995), The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729–734.

5. Diener W. and Schlede E. (1999), Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129–134.

6. Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992), A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

7. Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994), The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659–670.

8. OECD (2001), Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

9. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

10. OECD (1998), Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environ mental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1. oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380, EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

11. Lipnick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I., Goddard M., Segal L., Springer J.A. and Myers R.C. (1995), Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223–231.

12. Chan P.K. and Hayes A.W. (1994), Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Bilaga 1

FÖRFARANDEN SOM BÖR FÖLJAS BEROENDE PÅ STARTDOS

ALLMÄNNA ANMÄRKNINGAR

För de olika startdoserna finns det olika testningsscheman som bör följas, enligt beskrivningen i denna bilaga.

— Bilaga 1 a: Startdosen är 5 mg per kg kroppsvikt.

— Bilaga 1 b: Startdosen är 50 mg per kg kroppsvikt.

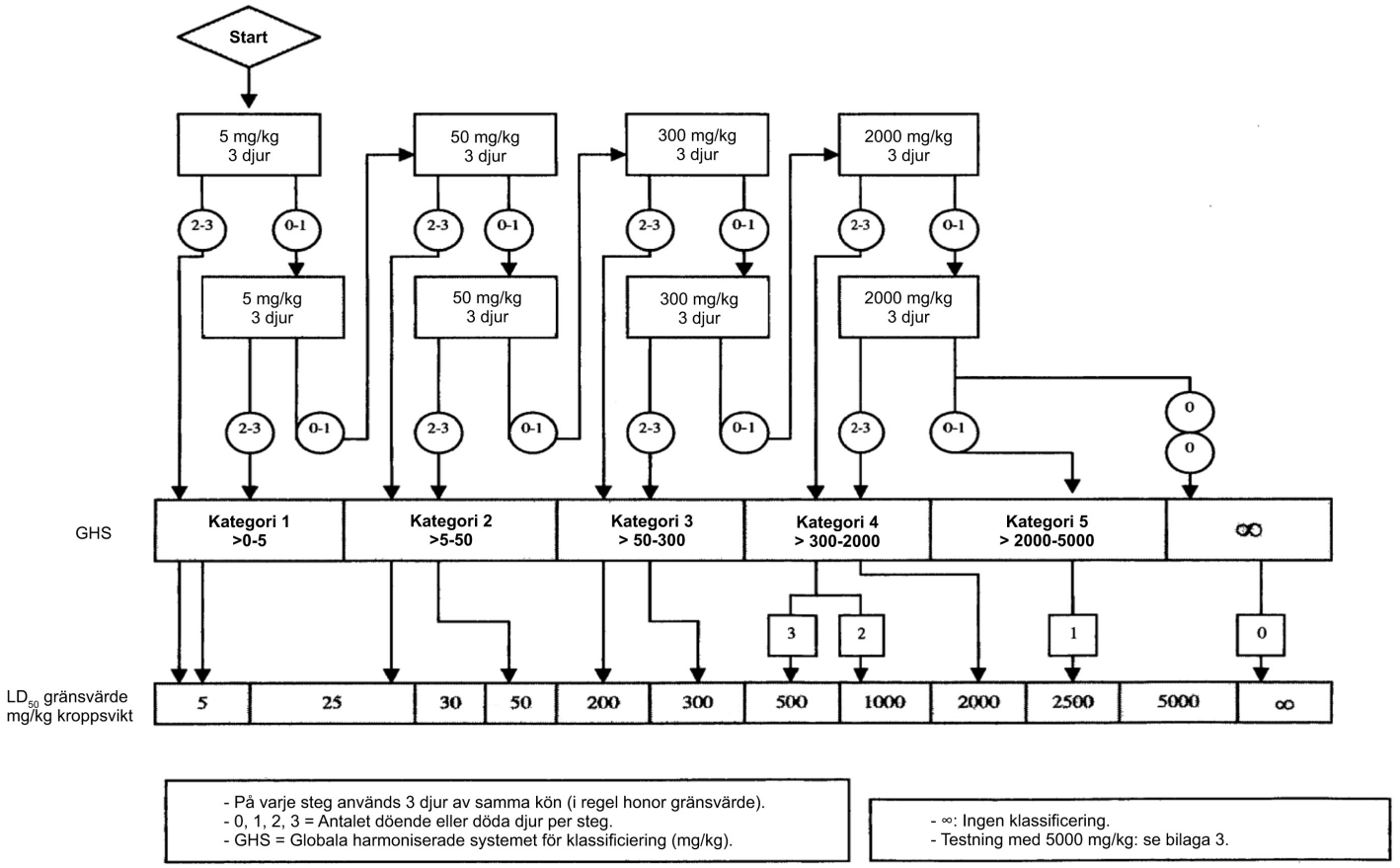
— Bilaga 1 c: Startdosen är 300 mg per kg kroppsvikt.

— Bilaga 1 d: Startdosen är 2 000 mg per kg kroppsvikt.

Testningens förlopp anges av pilarna och beror på antalet avlivade djur eller djur som dött.

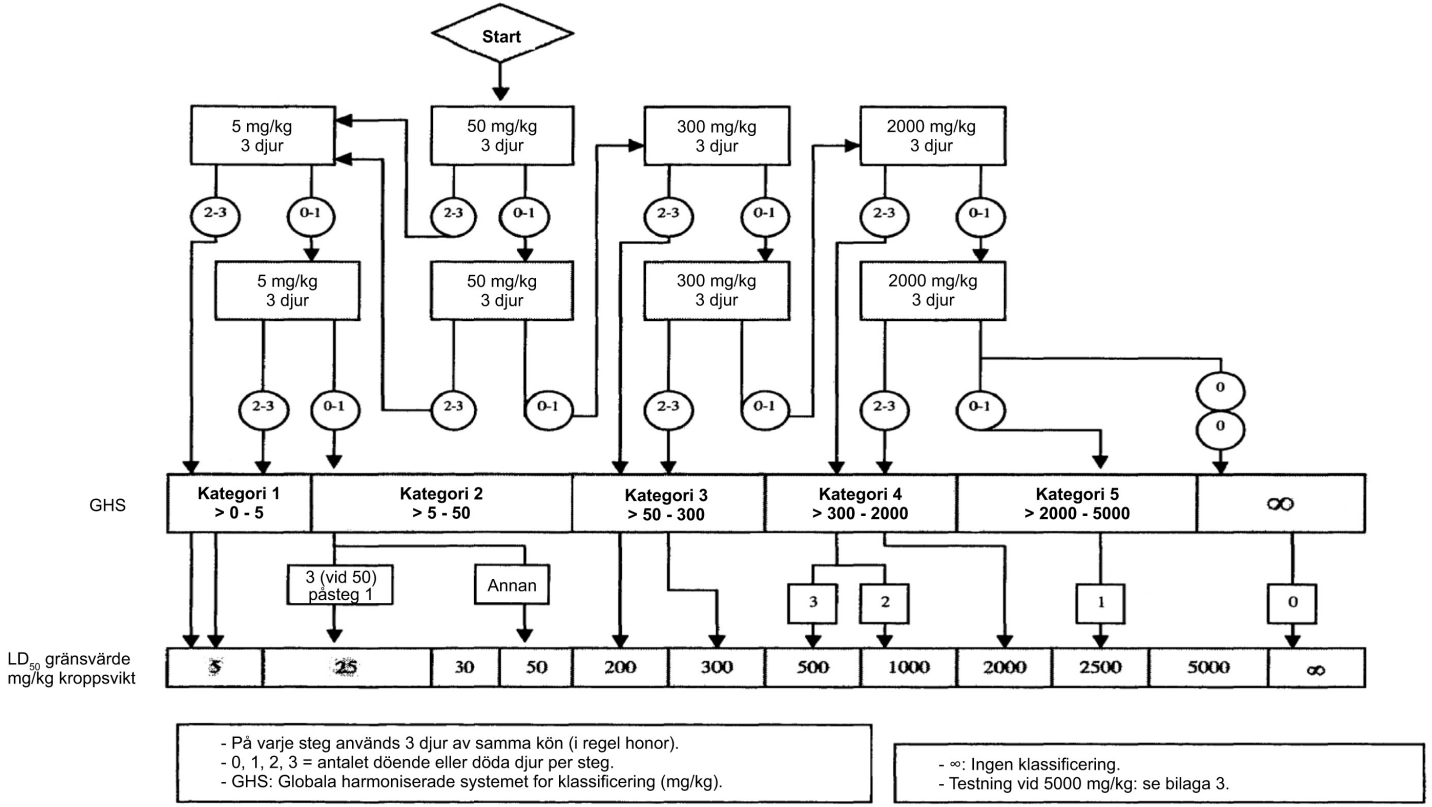
Bilaga 1 A

TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 5 MG PER KG KROPPSVIKT



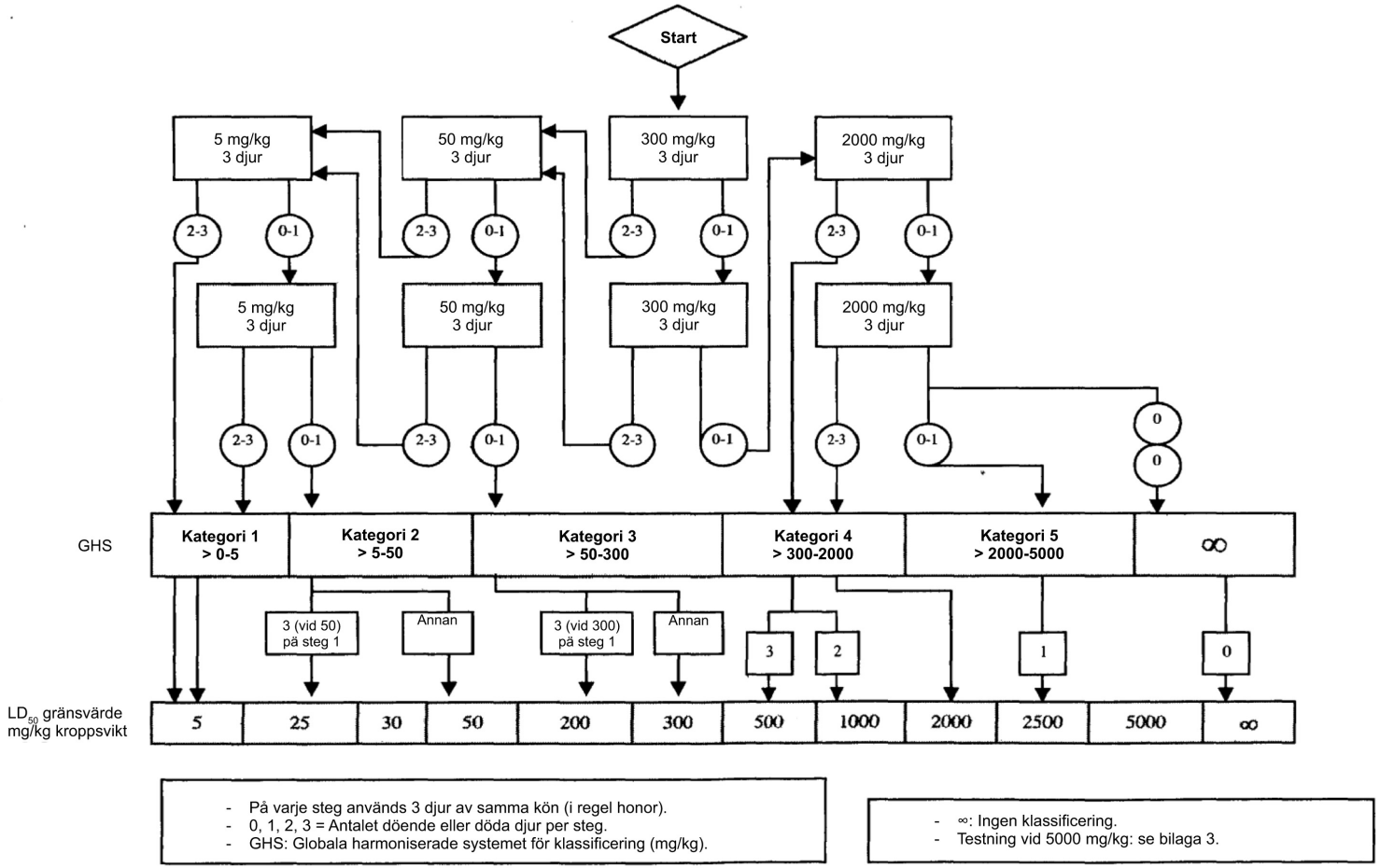
Bilaga 1 B

TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 50 MG PER KG KROPPSVIKT



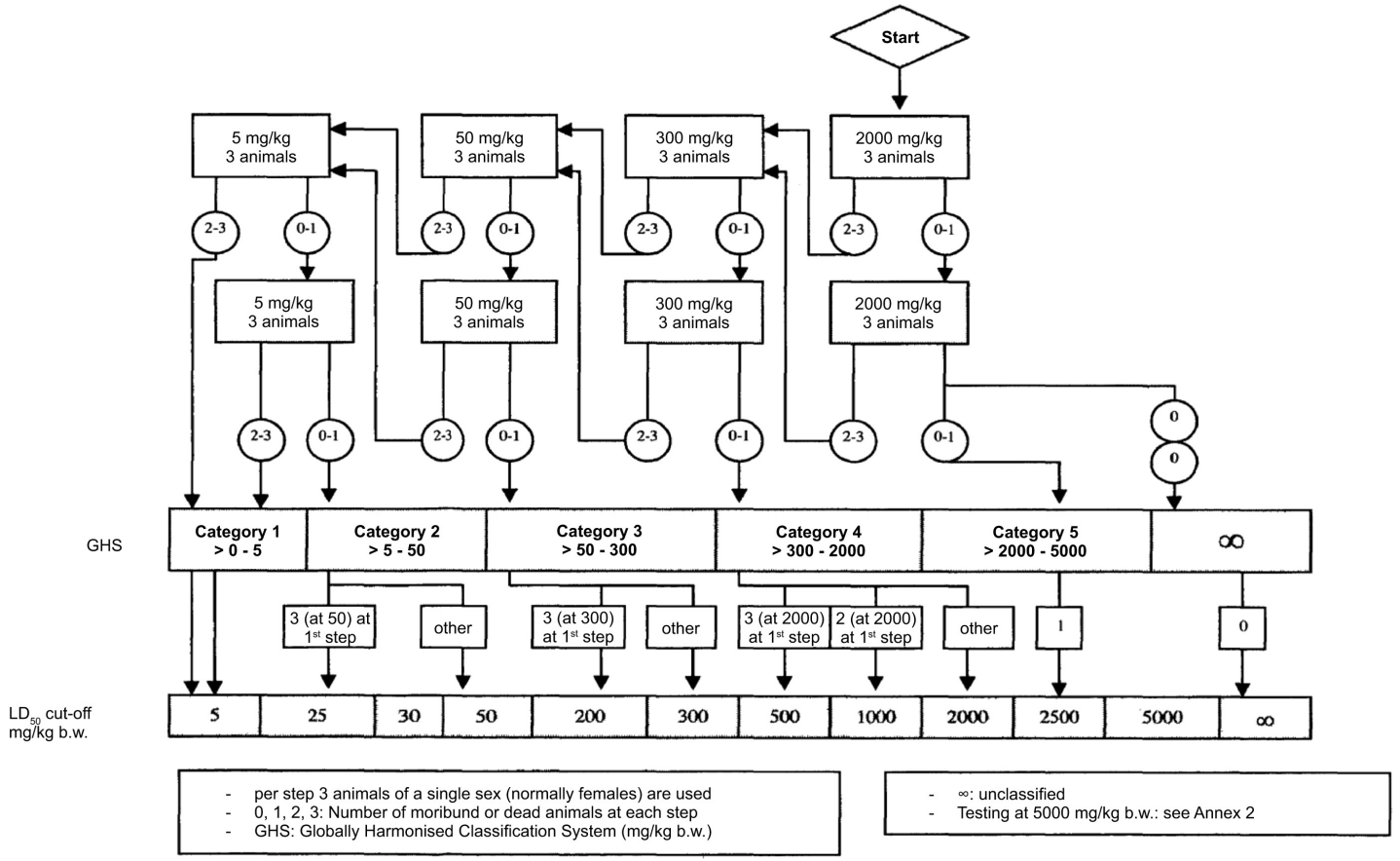
Bilaga 1 C

TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 300 MG PER KG KROPPSVIKT



Bilaga 1 D

TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 2 000 MG PER KG KROPPSVIKT



▼B

Bilaga 2

KRITERIER FÖR HUR TESTÄMNEN MED FÖRVÄNTADE LD_{50}-VÄRDEN ÖVER 2 000 MG/KG KAN KLASSIFICERAS UTAN TESTNING

Med hjälp av kriterierna för riskkategori 5 kan man identifiera testämnen som har en relativt låg risk för akut toxicitet men som under vissa omständigheter kan utgöra en risk för sårbara populationer. Dessa ämnen förväntas ha ett LD_{50}-värde (oralt eller via huden) inom området 2 000–5 000 mg/kg eller motsvarande doser i fråga om andra tillförselvägar. Ett testämne kan klassificeras enligt riskkategorin 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (GHS-kategori 5) i följande fall:

a) Om ämnet hänförs till denna kategori enligt utfallet i något av de testningsscheman som finns i bilaga 1A–1 D, på grundval av mortalitet.

b) Om det redan finns tillförlitliga bevis för att LD_{50}-värdet ligger inom det intervall som motsvarar kategori 5 eller om tidigare djurförsök eller toxiska verkningar hos människor tyder på akut fara för människors hälsa.

c) På grundval av extrapolering, uppskattning eller mätning av data, om det inte är motiverat att placera ämnet i en högre riskklass.

   — Om det finns tillförlitlig information som tyder på betydande toxiska verkningar hos människor, eller något av följande:

   — Mortalitet kan observeras vid testning med värden upp till kategori 4 via oral tillförsel.

   — Om en bedömning av sakkunniga bekräftar signifikanta kliniska tecken på toxicitet vid testning med värden upp till kategori 4, med undantag av diarré, upprest päls eller ett ovårdat utseende.

   — Om en bedömning av sakkunniga bekräftar tillförlitlig information från andra djurförsök som tyder på förmåga till signifikanta akuta verkningar.

TESTNING PÅ DOSNIVÅER ÖVER 2 000 MG/KG

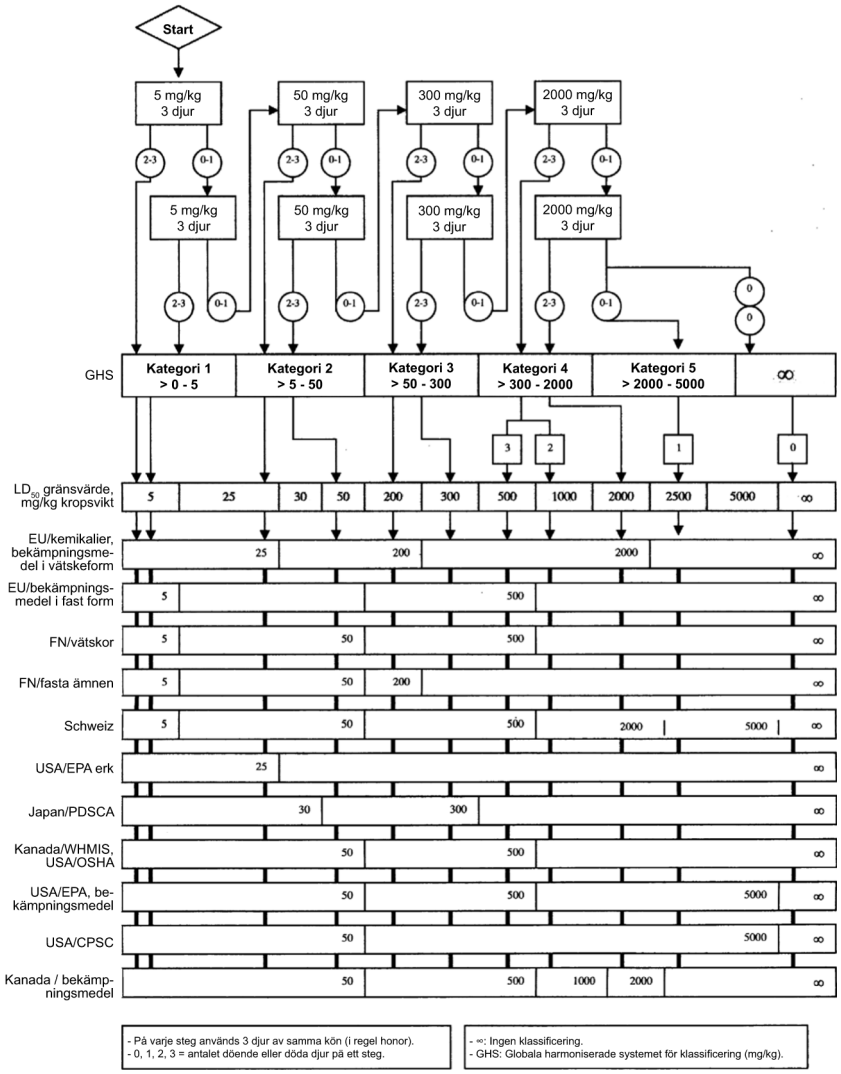
Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur när det gäller kategori 5 (5 000 mg/kg). Sådan testning bör endast övervägas när det finns en hög sannolikhet för att resultaten har direkt relevans för skyddet av djurens eller människors hälsa (se hänvisning 10). Ingen ytterligare testning bör utföras vid högre dosnivåer.

I nödvändiga fall används en dos på 5 000 mg/kg i ett enda steg (tre djur). Om det först doserade djuret dör, fortsätts doseringen till 2 000 mg/kg i enlighet med flödesschemat i bilaga 1. Om det första djuret överlever, doseras ytterligare två djur. Om endast ett av de tre djuren dör antas LD_{50}-värdet överskrida 5 000 mg/kg. Om de två djuren dör fortsätts doseringen med 2 000 mg/kg.

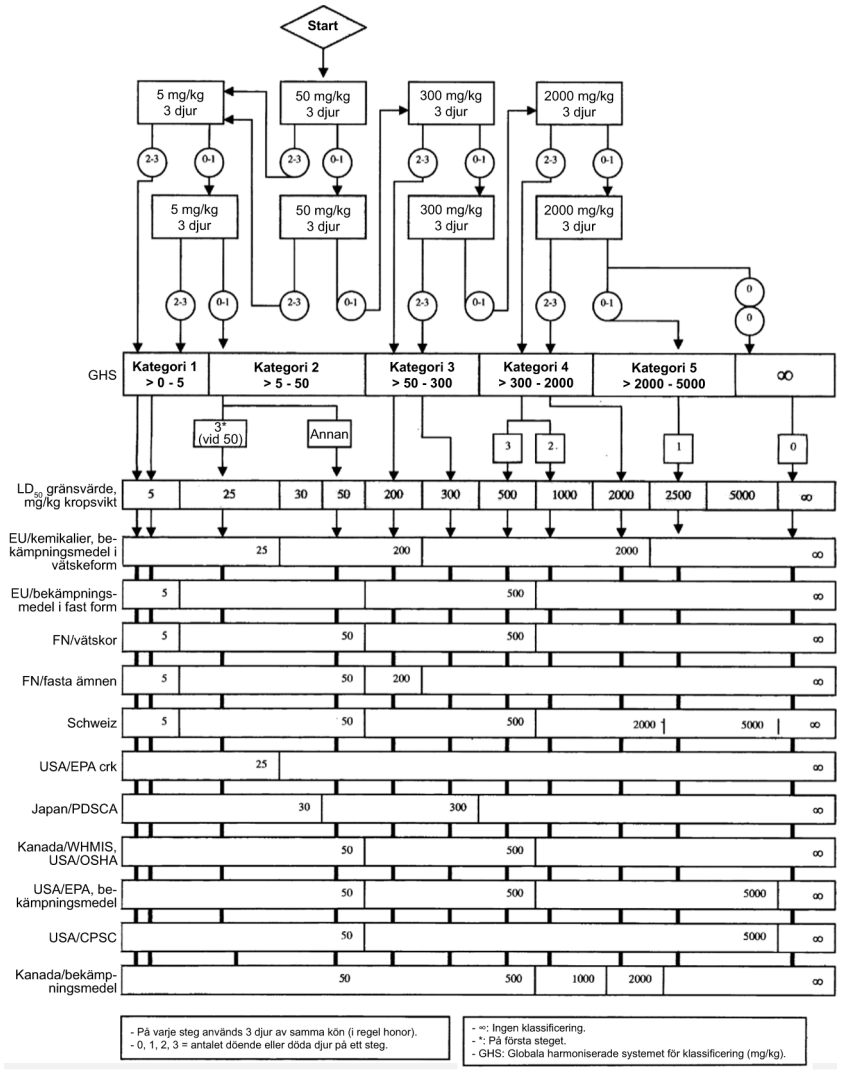
▼B

Bilaga 3

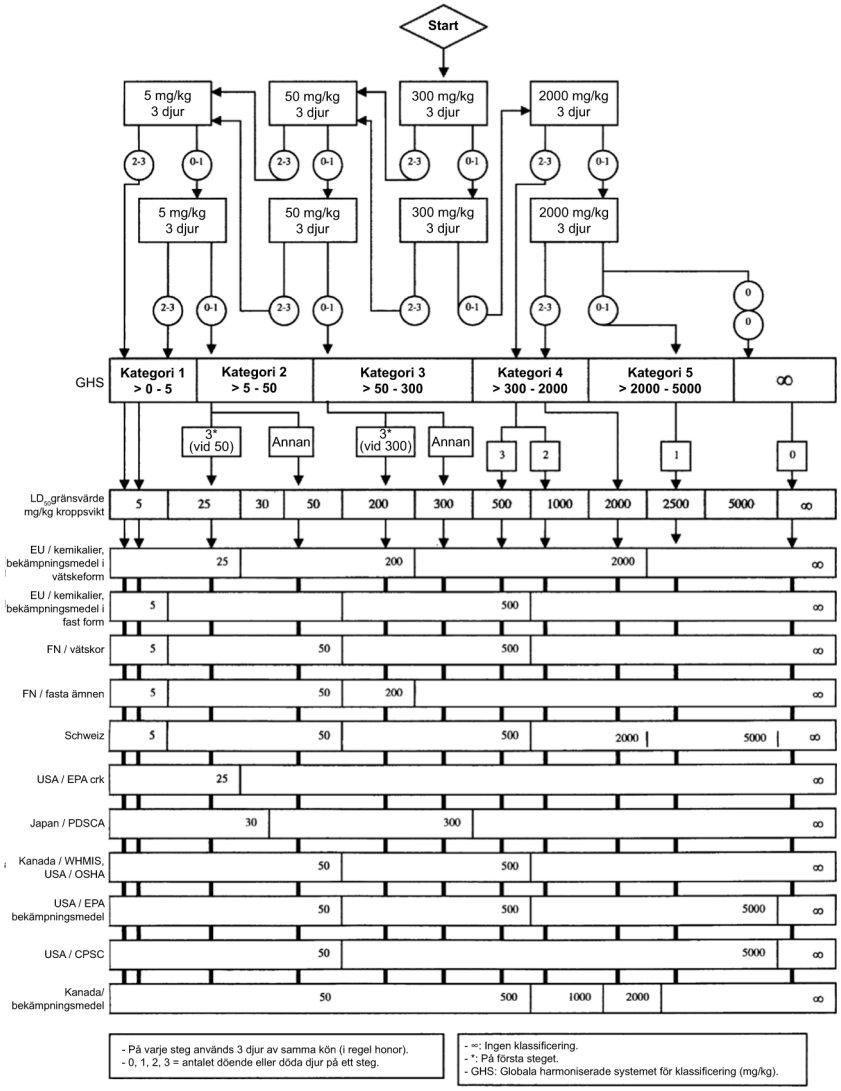
TESTMETOD B.1b: Vägledning för klassificering enligt EU-systemet, som gäller tills det globala harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) har genomförts helt (ur hänvisning 8)



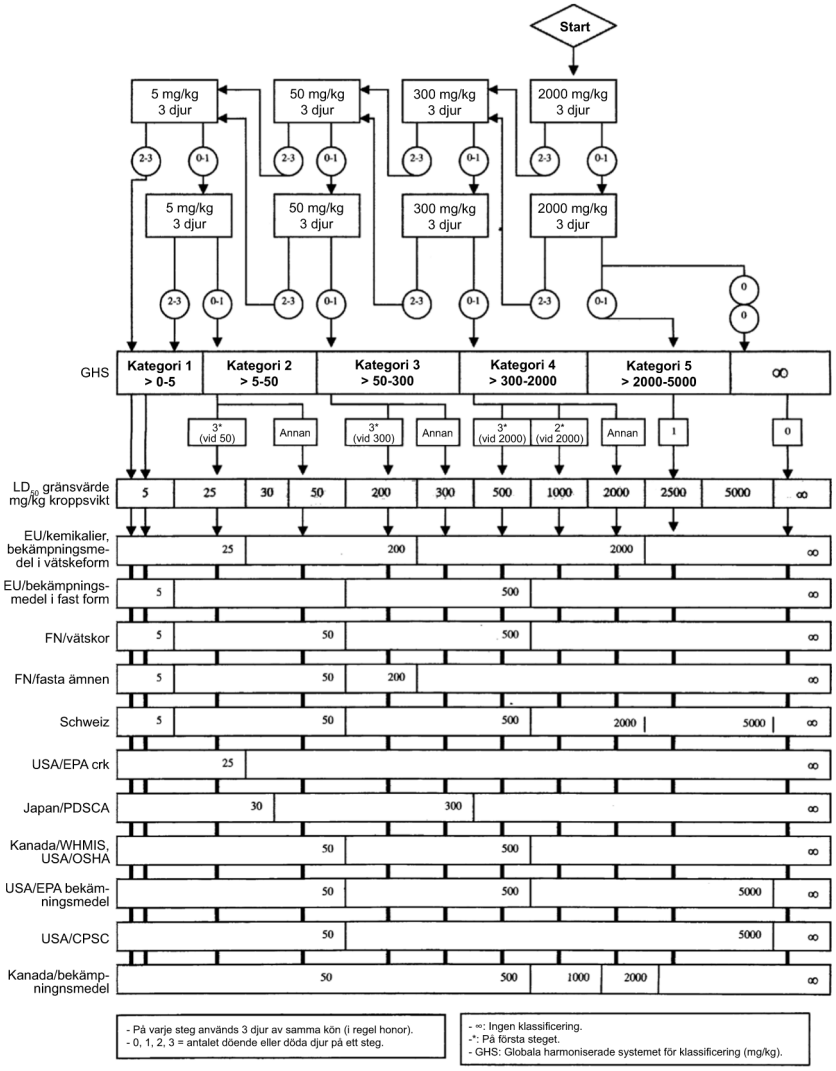
▼B


Start
5 mg/kg 3 djur
50 mg/kg 3 djur
300 mg/kg 3 djur
2000 mg/kg 3 djur
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0 - 5
Kategori 2 > 5 - 50
Kategori 3 > 50 - 300
Kategori 4 > 300 - 2000
Kategori 5 > 2000 - 5000
∞
3* (vid 50)
Annan
LD50 gränsvärde, mg/kg kropsvikt
EU/kemikalier, bekämpningsmedel i vätskeform
EU/bekämpningsmedel i fast form
FN/vätskor
FN/fasta ämnen
Schweiz
USA/EPA crk
Japan/PDSCA
Kanada/WHMIS, USA/OSHA
USA/EPA, bekämpningsmedel
USA/CPSC
Kanada/bekämpningsmedel
- På varje steg används 3 djur av samma kön (i regel honor).
- 0, 1, 2, 3 = antalet döende eller döda djur på ett steg.
- ∞: Ingen klassificering.
- *: På första steget.
- GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering (mg/kg).

▼B


Start
5 mg/kg 3 djur
50 mg/kg 3 djur
300 mg/kg 3 djur
2000 mg/kg 3 djur
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0 - 5
Kategori 2 > 5 - 50
Kategori 3 > 50 - 300
Kategori 4 > 300 - 2000
Kategori 5 > 2000 - 5000
∞
3* (vid 50)
Annan
3* (vid 300)
3
2
1
LD50-gränsvärde mg/kg kroppsvikt
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU / kemikalier, bekämpningsmedel i vätskeform
EU / kemikalier, bekämpningsmedel i fast form
FN / vätskor
FN / fasta ämnen
Schweiz
USA / EPA crk
Japan / PDSCA
Kanada / WHMIS, USA / OSHA
USA / EPA bekämpningsmedel
USA / CPSC
Kanada/ bekämpningsmedel
- På varje steg används 3 djur av samma kön (i regel honor).
- 0, 1, 2, 3 = antalet döende eller döda djur på ett steg.
- ∞: Ingen klassificering.
- *: På första steget.
- GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering (mg/kg).

▼B


Start
5 mg/kg 3 djur
50 mg/kg 3 djur
300 mg/kg 3 djur
2000 mg/kg 3 djur
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0-5
Kategori 2 > 5-50
Kategori 3 > 50-300
Kategori 4 > 300-2000
Kategori 5 > 2000-5000
∞
3* (vid 50)
Annan
3* (vid 300)
3* (vid 2000)
2* (vid 2000)
1
LD50 gränsvärde mg/kg kroppsvikt
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalier, bekämpningsmedel i vätskeform
EU/bekämpningsmedel i fast form
FN/vätskor
FN/fasta ämnen
Schweiz
USA/EPA crk
Japan/PDSCA
Kanada/WHMIS, USA/OSHA
USA/EPA bekämningsmedel
USA/CPSC
Kanada/bekämpningsmedel
- På varje steg används 3 djur av samma kön (i regel honor).
- 0, 1, 2, 3 = antalet döende eller döda djur på ett steg.
- ∞: Ingen klassificering.
-*: På första steget.
- GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering (mg/kg).

▼M4

B.2 AKUT INHALATIONSTOXICITET

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 403 (2009) (1). Den ursprungliga testriktlinjen för akut inhalation 403 (TG 403) antogs 1981. Denna reviderade testmetod B.2 (som motsvarar den reviderade TG 403) har utformats för att vara mer flexibel, för att minska användningen av djur, och för att uppfylla regulatoriska behov. Den reviderade testmetoden presenterar två studietyper: Ett traditionellt LC_{50}-protokoll och ett koncentration × tid-protokoll (k × t). Den här testmetodens visar primärt förhållandet mellan koncentration-respons vars räckvidd sträcker sig från icke-dödlig till dödlig utgång så att man kan komma fram till en genomsnittlig dödlig koncentration (LC_{50}), icke-dödlig tröskelkoncentration (t.ex. LC01), och kurva, och för att identifiera en möjlig könsberoende mottaglighet. K × t-protokollet ska användas om det finns ett specifikt rättsligt eller vetenskapligt behov som kräver testning av djur som sträcker sig över flera tidsperioder, såsom katastrofhanteringsplanering (värden för att t.ex. komma fram till riktnivåer för akut exponering (AEGL), riktlinjer för katastrofhanteringsplanering (ERPG) eller tröskelvärden för akut exponering (AETL)), eller markanvändningsplanering.

2. I vägledningsdokumentet om akut inhalationstoxicitet (GD 39) (2) kan man få vägledning om den här beskrivna metodens genomförande och tolkning vid studier.

3. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i GD 39 (2).

4. Den här testmetoden möjliggör karakterisering och kvantitativ riskbedömning av testkemikalierna och gör det möjligt att rangordna och klassificera testkemikalierna i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008 (3). GD 39 (2) ger en vägledning om valet av en lämplig testmetod vid akuttestning. Om endast information om klassificering och märkning krävs, rekommenderas rent allmänt kapitel B.52 i denna bilaga (4) (se GD 39 (2)). Den här testmetoden B.2 är inte specifikt avsedd för testning av specialmaterial såsom svårlösliga isometriska eller fibrösa material, eller avsiktligt tillverkade nanomaterial.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Innan man överväger ett test i enlighet med den här testmetoden bör testlaboratoriet överväga all information avseende testkemikalien, inklusive befintliga studier (t.ex. kapitel B.52 i denna bilaga (4)) vars data visar att man inte behöver göra fler tester för att därmed minska djuranvändningen. Information som kan underlätta val av lämplig art, stam, kön, exponeringssätt och lämplig testkoncentration är ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultat från andra eventuella in vitro- eller in vivo-tester avseende toxicitet; förväntad användning och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade ämnen (se GD 39 (2)).

▼M4

6. Testning av frätande och/eller irriterande kemikalier vid koncentrationer som förväntas orsaka svår smärta och/eller lidande bör undvikas så vitt det är möjligt. Eventuell frätning/irritation bör utvärderas genom en sakkunnig bedömning som grundas på erfarenheter från människa och djur (t.ex. genom upprepade doseringsstudier utförda med doser som inte är frätande/irriterande), befintliga in vitro-data (t.ex. från kapitel B.40, (5), B.40a (6) i denna bilaga eller OECD TG 435 (7)), pH-värden, information om liknande ämnen eller eventuellt andra relevanta data i syfte att undersöka om man kan undvika ytterligare testning. För specifika regulatoriska behov (t.ex. i beredskapsplaneringssyften), kan den här testmetoden användas för att exponera djur för dessa ämnen, eftersom det ger försöksledaren eller den ansvarige prövaren kontroll över valet av målkoncentrationer. I vilket fall som helst ska målkoncentrationer inte medföra allvarlig irritation/frätning, men ändå vara tillräckliga för att utvidga koncentrations-responskurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppfyllas. Dessa koncentrationer ska väljas från fall till fall och det ska finnas en motivering för valet av koncentration (se GD 39 (2)).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Den här reviderade testmetoden B.2 har utformats för att man ska erhålla tillräcklig information om en testkemikalies akuta toxicitet för att klassificera den och tillhandahålla dödlighetsdata (t.ex. $LC_{50,}$ LC_{01} och lutning) för ett eller båda könen efter behov för kvantitativ riskbedömning. Den här testmetoden erbjuder två metoder. Den första metoden är ett traditionellt protokoll i vilka grupper av djur exponeras för en begränsad koncentration (toleranstest) eller en serie koncentrationer i ett stegvist förfarande under en förutbestämd period på normalt 4 timmar. Andra exponeringstider kan gälla för specifika regulatoriska ändamål. Den andra metoden är ett ($k \times t$) protokoll i vilka grupper av djur exponeras för en (gränskoncentration) eller en serie av koncentrationer som sträcker sig över flera perioder.

8. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt och medtas i tolkningen av testresultaten på samma sätt som de som avled under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecknen på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om humana endpoints (8).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

9. I testet används friska unga vuxna djur av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta och det ska motiveras om annan art används.

Förberedelse av djuren

10. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På exponeringsdagen bör djuren vara unga vuxna 8 till 12 veckor gamla och kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet av eventuella tidigare exponerade djur i samma ålder. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt. Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten. Djuren bör också acklimatisera sig till testutrustningen en kort period före testet, eftersom detta minskar den stress som en ny miljö innebär.

▼M4

Djurhållning

11. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

12. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och testets ändamål. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringen, deras principer och särskilda för- och nackdelar finns beskrivna i GD 39 (2).

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

13. Enbart nos-exponering kan för råttor vara av vilken längd som helst upp till 6 timmar. Om möss exponeras enbart nos överskrider exponeringen i allmänhet inte 4 timmar. Motivering bör ges om längre tidsperioder för studier behövs (se GD 39 (2)). Djur som exponeras för aerosoler i helkroppskammare ska inhysas individuellt för att hindra intagandet av testkemikalien vid skötsel av de andra djuren i buren. Inget foder ska ges under exponeringsperioden. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

14. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas.

▼M4

Partikelstorleksfördelning

15. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 4 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (2) (9) (10). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard bör en sakkunnig bedömning göras om detta inte kan uppnås. Till exempel kan metalldimma understiga denna standard, och laddade partiklar, fibrer och hygroskopiska material (som ökar i storlek i den fuktiga miljön i andningsvägarna) kan överstiga denna standard.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

16. En vehikel kan användas för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien i atmosfären. I regel bör vatten ha företräde. För att uppnå den erfordrade partikelstorleksfördelningen bör partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer, emellertid bör man iaktta försiktighet så att inte testkemikalien sönderdelas eller förändras. I de fall där mekaniska processer tros ha förändrat testkemikaliens sammansättning (t.ex. extrema temperaturer från friktionen vid överdriven fräsning), bör testkemikaliens sammansättning verifieras analytiskt. Det är viktigt att testkemikalien inte förorenas. Det är inte nödvändigt att testa icke-spröda granulära material som avsiktligt är sammansatta så att de inte kan inhaleras. Ett friktionstest ska användas för att visa att inga inandningsbara partiklar bildas när det granulära materialet hanteras. Om ett friktionstest bildar inandningsbara ämnen ska ett test utföras avseende inhalationstoxicitet.

Kontrolldjur

17. Det är inte nödvändigt med en parallell negativ (luft-) kontrollgrupp. Om en annan vehikel än vatten används för att skapa testatmosfären ska en vehikelkontrollgrupp endast användas när historiska data om inhalationstoxicitet inte är tillgängliga. Om en toxicitetsstudie av en testkemikalie som har beretts i en vehikel inte påvisar någon toxicitet, framgår det att vehikeln är icke-toxisk vid den testade koncentrationen, och därmed finns det inget behov av en vehikelkontroll.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

18. Luftflödet genom kammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen av testatmosfärens koncentration (eller stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta atmosfärsskapande dynamiska parametrar. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare i de fall där luftflödet genom exponeringssystemet är otillräckligt för att ge ett dynamiskt flöde i testkemikalieatmosfären. Det finns föreskrivna metoder som kan användas för att visa att återandning inte sker under de valda processförhållandena (2) (11). Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att dessa standarder inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid.

▼M4

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

19. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsområden, gäller både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas och registreras minst tre gånger under tidsperioder på upp till 4 timmar, och varje timme för kortare tidsperioder. Den relativa fuktigheten bör företrädesvis upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar) eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: Nominell koncentration

20. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom kammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: Faktisk koncentration

21. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliens koncentration i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller av icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.

22. Målkoncentrationerna och de nominella och faktiska koncentrationerna ska finnas med i undersökningsrapporten, men endast de faktiska koncentrationerna används i de statistiska analyserna för att beräkna värdena för dödlig koncentration. En sats av testkemikalien ska användas, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: Retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

23. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt och övervakas kontinuerligt och/eller intermittent beroende på analysmetoden. När intermittent provtagning används bör prover på kammaratmosfären tas minst två gånger under en fyratimmarsstudie. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, kan ett prov tas under hela exponeringsperioden. Om märkta prov-till-prov-fluktationer förekommer, bör man för de påföljande koncentrationerna som ska testas ta

▼M4

fyra prover per exponering. Provtagning av koncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor eller ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tiden tills kammaren når jämvikt (t_{95}) bör beräknas och registreras. Varaktigheten för en exponering spänner sig över den tid som testkemikalien genereras och tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå t_{95}. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).

24. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning). Varje fas kan bete sig annorlunda i en inhalationskammare så minst en indikatorsubstans ska väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva substansen i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i blandningen rapporteras, inte bara den aktiva substansen eller komponenten (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: Partikelstorleksfördelning

25. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst två gånger under varje 4-timmarsexponering med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare. Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor eller det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela försöket. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas i ett tidigt skede av försöket kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till en upprepning av exponeringen. Partikeldimensionering bör utföras för ångorna, om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas (se punkt 15).

PROCEDUR

26. Två studietyper beskrivs nedan: det traditionella protokollet och k × t-protokollet. Båda protokollen kan inkludera en inledande studie, en huvudstudie och/eller ett toleranstest (traditionellt protokoll), eller testning av en gränskoncentration (k × t). Om det ena könet är känt för att vara mer mottagligt kan försöksledaren välja att utföra studierna med enbart det mottagliga könet. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. Innan försöket påbörjas ska alla tillgängliga data beaktas för att minimera djuranvändningen. Till exempel kan data som genereras genom användning av kapitel B.52 i denna bilaga (4) eliminera behovet av en inledande studie, och kan också visa om ett kön är mer mottagligt (se GD 39 (2)).

▼M4

TRADITIONELLT PROTOKOLL

Allmänna överväganden: Traditionellt protokoll

27. I en traditionell studie exponeras grupper av djur för testkemikalier under en fast tidsperiod (vanligtvis 4 timmar) i antingen en exponeringskammare för enbart nos eller en helkroppskammare. Djuren exponeras antingen för en begränsad koncentration (toleranstest) eller för minst tre koncentrationer i ett stegvist förfarande (huvudstudie). En inledande studie kan föregå en huvudstudie om det inte redan finns någon information om testkemikalien, såsom en tidigare utförd B.52-studie (se GD 39 (2)).

Inledande studie: Traditionellt protokoll

28. En inledande studie används för att uppskatta testkemikaliens potens, identifiera könsskillnader beträffande mottaglighet, och för att välja nivå på exponeringskoncentrationen för huvudstudien eller toleranstestet. När man väljer nivå på koncentrationen för den inledande studien ska alla tillgängliga data användas, inklusive tillgängliga (Q)SAR-data och data för liknande kemikalier. Inte fler än tre hanar och tre honor ska exponeras för varje koncentration (3 djur per kön kan behövas för att fastställa en könsskillnad). En inledande studie kan bestå av en engångskoncentration, men fler koncentrationer kan testas vid behov. En inledande studie ska inte testa så många djur och koncentrationer att det liknar en huvudstudie. En tidigare utförd B.52-studie (4) kan användas i stället för en inledande studie (se GD 39 (2)).

Toleranstest: Traditionellt protokoll

29. Ett toleranstest används när testkemikalien är känd eller förväntas vara praktiskt taget icke-toxisk, dvs. framkalla en toxisk reaktion endast över den regulatoriska gränskoncentrationen. I ett toleranstest exponeras en enda grupp bestående av tre hanar och tre honor för testkemikalien vid en koncentrationsgräns. Information om testkemikaliens toxicitet kan erhållas genom kunskap om liknande testade kemikalier, med beaktande av identitet och procentandel av komponenter kända för en signifikant toxicitet. I situationer när det finns lite eller ingen information om dess toxicitet, eller testkemikalien förväntas vara toxisk, ska huvudtestet utföras.

30. Valet av koncentrationsgräns är vanligtvis beroende av regulatoriska krav. När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l (eller den maximalt uppnåeliga koncentrationen) (3). Det kan vara tekniskt utmanande att generera koncentrationsgränser för vissa kemikalier, särskilt ångor och aerosoler. När man testar aerosoler bör det primära målet vara att uppnå en andningsbar partikelstorlek (MMAD av 1–4 μm). Det är möjligt för de flesta kemikalier med en koncentration på 2 mg/l. Testning av aerosoler med högre än 2 mg/l ska endast göras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås (se GD 39 (2)). Förordning (EG) nr 1272/2008 avråder från testning över koncentrationsgränsen av djurskyddsskäl (3). Koncentrationsgränsen ska endast övervägas om ett sådant test har en direkt relevans för skyddet av människors hälsa (3), och motivering angiven i undersökningsrapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig användning av djur ska ett test genomföras utan djur före toleranstestet, för att se till att förhållandena i kammaren kan uppnås för ett toleranstest.

▼M4

31. Om mortalitet eller döende observeras vid koncentrationsgränsen kan resultaten från toleranstestet tjäna som ett inledande test för ytterligare tester vid andra koncentrationer (se huvudstudie). Om en testkemikalies fysikaliska eller kemiska egenskaper gör det omöjligt att nå koncentrationsgränsen ska den maximalt uppnåeliga koncentrationen testas. Om dödligheten är lägre än 50 % vid den maximalt uppnåeliga koncentrationen behöver inga fler tester utföras. Om koncentrationsgränsen inte kunde uppnås ska undersökningsrapporten ge en förklaring och understödjande data. Om den maximalt nåbara koncentrationen för en ånga inte framkallar toxicitet kan det bli nödvändigt att generera testkemikalien som en flytande aerosol.

Huvudstudie: Traditionellt protokoll

32. En huvudstudie utförs normalt med fem hanar och fem honor (eller 5 djur av det mottagliga könet, om detta är känt) per koncentrationsnivå, med minst tre koncentrationsnivåer. För att uppnå en gedigen statistisk analys ska tillräckliga koncentrationsnivåer användas. Tidsintervallet mellan exponeringsgrupperna fastställs genom start, varaktighet och allvarlighetsgrad för tecknen på toxicitet. Exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå ska fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att tidigare testade djur överlever. Detta gör att försöksledaren kan justera målkoncentrationen för nästa exponeringsgrupp. På grund av att man behöver sofistikerad teknik är detta inte alltid praktiskt genomförbart i inhalationsstudier, därför bör djurens exponering baseras på tidigare erfarenheter och vetenskapliga bedömningar. Man bör konsultera GD 39 (2) vid testning av blandningar.

PROTOKOLL FÖR KONCENTRATION × TID (K × T)

Allmänna överväganden: k × t-protokoll

33. En stegvis k × t-studie kan övervägas som ett alternativ till ett traditionellt protokoll vid bedömning av inhalationstoxicitet (12) (13) (14). Detta tillvägagångssätt låter djuren exponeras för en testkemikalie på flera koncentrationsnivåer och med olika varaktigheter. Samtliga tester utförs i en enbart nos-kammare (helkroppskammare är inte praktiska för detta protokoll). Ett flödesdiagram i tillägg 1 belyser detta protokoll. En simuleringsanalys har visat att det traditionella protokollet och k × t-protokollet båda är kapabla att ge gedigna LC_{50}-värden, men k × t-protokollet är generellt bättre på att ge gedigna LC_{01}- och LC_{10}-värden (15).

34. En simuleringsanalys har visat att användningen av två djur per k × t-intervall (ett per kön vid användning av båda könen eller två av det mer mottagliga könet) i allmänhet kan vara tillräckligt när man testar 4 koncentrationer och 5 exponeringsvaraktigheter i en huvudstudie. Under vissa omständigheter kan försöksledaren välja att använda två råttor per kön per k × t-intervall (15). Att använda 2 djur per kön per koncentration och tidpunkt kan minska förutfattade meningar angående uppskattningarnas variation, öka framgångsgraden och förbättra konfidensintervallets täckning. I händelse av att resultatet inte ligger tillräckligt nära uppskattningsdatan (vid användning av ett djur per kön eller två av det mer mottagliga könet) kan dock även en 5:e koncentrationsexponering räcka. Ytterligare vägledning om antalet djur och koncentrationer som ska användas i en k × t-studie finns i GD 39 (2).

▼M4

Inledande studie: k × t-protokoll

35. En inledande studie används för att uppskatta testkemikaliens potens och underlätta valet av exponeringens koncentrationsnivåer för huvudstudien. En inledande studie som använder upp till tre djur per kön och koncentration (beträffande detaljer se tillägg III till GD 39 (2)) kan behöva välja en lämplig startkoncentration till huvudstudien för att minimera antalet djur som används. Det kan vara nödvändigt att använda tre djur per kön för att fastställa en könsskillnad. Dessa ska exponeras för en enstaka tidsperiod, vanligtvis 240 min. Möjligheten att generera adekvata testatmosfärer bör utvärderas vid tekniska förtester utan djur. Vanligtvis behöver man inte genomföra en inledande studie om det finns tillgängliga mortalitetsdata från en B.52-studie (4). När man väljer den inledande målkoncentrationen i en B.2-studie bör försöksledaren beakta mortalitetsmönstret som observerats i eventuella tillgängliga B.52-studier (4) för båda könen och för alla testade koncentrationer (se GD 39 (2)).

Inledande koncentration: k × t-protokoll

36. Den inledande koncentrationen (exponeringssession 1) (tillägg 1) är antingen en gränskoncentration eller en koncentration vald av försöksledaren baserad på den inledande studien. Grupper om 1 djur per kön exponeras för den här koncentrationen under flera tidsperioder (t.ex. 15, 30, 60, 120 eller 240 minuter) vilket resulterar i ett totalt antal av 10 djur (vilket kallas exponeringssession I) (tillägg 1).

37. Valet av koncentrationsgräns är vanligtvis beroende av regulatoriska krav. När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l (eller den maximalt uppnåeliga koncentrationen) (3). Det kan vara tekniskt utmanande att generera koncentrationsgränser för vissa kemikalier, särskilt ångor och aerosoler. Vid testning av aerosoler bör målet vara att uppnå en inandningsbar partikelstorlek (dvs. en MMAD på 1–4 μm) vid en koncentrationsgräns på 2 mg/l. Detta är möjligt för de flesta testkemikalier. Testning av aerosoler med mer än 2 mg/l bör endast utföras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås (se GD 39 (2)). Förordning (EG) nr 1272/2008 avråder från testning över koncentrationsgränsen av djurskyddsskäl (3). Testning över koncentrationsgränsen ska endast övervägas när ett sådant test har en direkt relevans för skyddet av människors hälsa (3), motiveringen ska anges i undersökningsrapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig djuranvändning ska ett test genomföras utan djur före testningen med den inledande koncentrationen för att säkerställa att förhållandena i kammaren kan uppnås för denna koncentration.

38. Om mortalitet eller döende observeras vid den inledande koncentrationen kan resultaten från denna koncentration tjäna som en inledande studie för ytterligare tester vid andra koncentrationer (se huvudstudie). När en testkemikalies fysikaliska eller kemiska egenskaper gör det omöjligt att nå koncentrationsgränsen ska den maximalt uppnåeliga koncentrationen testas. Om dödligheten är lägre än 50 % vid den maximalt uppnåeliga koncentrationen behöver inga fler tester utföras. Om koncentrationsgränsen inte kunde uppnås ska undersökningsrapporten ge en förklaring och understödjande data. Om den maximalt nåbara koncentrationen för en ånga inte framkallar toxicitet kan det bli nödvändigt att generera testkemikalien som en flytande aerosol.

▼M4

Huvudstudie: k × t-protokoll

39. Den inledande koncentrationen (exponeringssession 1) (tillägg 1) som testas i huvudstudien är antingen en gränskoncentration eller en koncentration vald av försöksledaren baserad på den inledande studien. Om mortalitet har observerats under eller efter exponeringssession 1 kommer den minsta exponering (k × t) som leder till mortalitet att användas som riktlinje för fastställande av koncentration och exponeringsperiod för exponeringssession II. Varje efterföljande exponeringssession bygger på den föregående (se tillägg 1).

40. För många testkemikalier är det resultat som erhålls vid den initiala koncentrationen, tillsammans med ytterligare tre exponeringssessioner med ett mindre tidsrutsystem (dvs. det geometriska mellanrummet för exponeringsperioder som anges av faktorn mellan på varandra följande perioder, i allmänhet √2), tillräckligt för att fastslå k × t-dödlighetsförhållandet (15), men det kan finnas vissa fördelar med att använda en 5:e exponeringskoncentration (se tillägg 1 och GD 39 (2)). För matematisk behandling av resultaten från k × t-protokollet, se tillägg 1.

IAKTTAGELSER

41. Djuren bör ofta observeras kliniskt under exponeringsperioden. Efter exponeringen ska kliniska observationer göras minst två gånger på dagen för exponeringen, eller oftare om djurens respons på behandlingen indikerar det, och därefter minst en gång per dag under en period av 14 dagar. Observationstidens längd är inte fast, utan bör bestämmas utifrån art och tidpunkt för de första kliniska tecknen samt längden på återhämtningsperioden. De tillfällen då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om tecknen på toxicitet visar en tendens att fördröjas. Alla observationer registreras systematiskt med individuella registreringar för varje djur. Djur som påträffas döende och djur som visar tecken på uppenbar smärta och/eller svårt ihållande lidande ska avlivas skonsamt av djurskyddsskäl. Försiktighet bör iakttas vid utförande av undersökningar för kliniska tecken på toxicitet, så att djur som ser dåliga ut och har övergående respiratoriska förändringar till följd av exponeringsförfarandet, inte misstas för testkemikalierelaterad toxicitet som kräver förtida avlivande av djuren. Principerna och kriterierna som finns sammanfattade i vägledningsdokumentet om humana endpoints (GD 19) bör tas i beaktande (7). När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

42. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i bur och päls, ögon och slemhinnor, samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet, samt kroppsmotorik och beteendemönster. Om möjligt bör eventuella skillnader mellan lokala och systematiska effekter noteras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektal temperatur kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning.

Kroppsvikt

43. Vikten på individuella djur bör registreras en gång under acklimatiseringsperioden på exponeringsdagen före exponeringen (dag 0), och åtminstone dag 1, 3 och 7 (och därefter varje vecka), och vid tidpunkten då döden eller avlivningen inträffar om dag 1 överskrids. Kroppsvikt är en erkänt viktig indikator på toxicitet, så djur som uppvisar en fortsatt minskning på ≥ 20 % jämfört med värdena i förstudien bör noggrant övervakas. Djur som överlever vägs och avlivas skonsamt i slutet av perioden efter exponeringsperioden.

▼M4

Patologi

44. Alla försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl bör obduceras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur har upptäckts, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

45. Ytterligare undersökningar inklusive a priori genom beräkning kan anses utöka studiens tolkningsvärde, såsom mätning av lungvikt hos överlevande råttor, och/eller ge prov på irritation genom den mikroskopiska undersökningen av luftvägarna. Undersökta organ kan också innefatta sådana som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt 24 timmar eller mer, och organ kända för, eller som förväntas, att påverkas. Mikroskopisk undersökning av hela luftvägarna kan ge användbar information om testkemikalier som är reaktiva med vatten, såsom syror och hygroskopiska testkemikalier.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Individuella data om kroppsvikt och obduktionsfynd bör tillhandahållas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd.

Testrapport

47. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

— Art/stam som används och motivering för användning av andra arter än råtta.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

▼M4

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Beskrivning av inhalationskammaren inklusive mått och volym.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla och behandling av luft som tillförs/extraheras och system som används för luftkonditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i systemet (helkropp).

— Temporal homogenitet/stabilitet för testatmosfären.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Information om utrustningen som används för att mäta syre och koldioxid, i förekommande fall.

— Tid som krävs för att uppnå jämvikt i inhalationskammaren ($t_{95)}$.

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grunden för valet av målkoncentration i huvudstudien.

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testkemikalier som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.

▼M4

— Alla luftkoncentrationer ska rapporteras i viktenheter (t.ex. mg/l, mg/m^3, etc.). Enheter för volym (t.ex. ppm, ppb etc.) kan också redovisas inom parantes.

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σg), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om beredning av testkemikalien, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta material eller för att bereda testlösningar. I de fall där mekaniska processer kan ha förändrat testkemikaliens sammansättning ska analysresultaten inkluderas för att bekräfta dess sammansättning.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som använts och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).

— Djurens individuella kroppsvikt som samlats in under studien, datum och tid för dödsfall som inträffat före planerad avlivning, tidsförlopp för första tecknen på toxicitet och om dessa var reversibla för varje enskilt djur.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

— Dödlighetsuppskattning (t.ex. LC_{50}, LD_{01}) inklusive 95 % konfidensgräns, och lutning (om det tillhandahålls av utvärderingsmetoden).

— Statistisk relation, inklusive uppskattningen av exponenten n (k × t-protokoll). Namnet på den statistiska programvara som används bör tillhandahållas.

▼M4

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av använda metoder för att uppfylla kriterierna för den här testmetoden, t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör åtgärdas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— En förklaring bör ges om det fanns ett behov av att avliva djur av humanitära skäl som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (8).

— Om testning enligt kapitel B.52 i denna bilaga (4) avbröts till förmån för testmetod B.2, bör motivering för detta lämnas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

LITTERATUR

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Finns på http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Finns på http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(3) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

(4) Kapitel B.52 i denna bilaga, akut inhalationstoxicitet – akut toxicitetsklass.

(5) Kapitel B.40 i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).

(6) Kapitel B.40a i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: test med modell av human hud.

(7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Finns på http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Finns på http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼M4

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278–290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105–117.

(14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65–71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Finns på http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 1

K × t-protokoll

1. En stegvis koncentration × tid-studie (k × t) kan övervägas som ett alternativ till det traditionella protokollet för bedömning av inhalationstoxicitet (12) (13) (14). Den bör företrädesvis utföras när det finns ett specifikt regelverk eller vetenskapligt behov som kräver testning av djur under flera tidsperioder, såsom katastrofhanterings- eller markanvändningsplanering. Detta tillvägagångssätt börjar med ett test vid en koncentrationsgräns (exponeringssession 1) i vilka djuren exponeras för en testkemikalie under fem tidsperioder (t.ex. 15, 30, 60, 120 och 240 minuter) så att flera löptider kommer att erhållas inom en exponeringssession (se figur 1). När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l. Dessa nivåer kan endast överskridas om det finns ett specifikt regelverk eller vetenskapligt behov som kräver testning vid dessa nivåer (se punkt 37 i B.2 i huvudtexten).

2. I situationer där det finns lite eller ingen information om en testkemikalies toxicitet, bör en inledande studie utföras, i vilken grupper om maximalt 3 djur per kön exponeras för de målkoncentrationer som försöksledaren har valt, vanligtvis i 240 minuter.

3. Om en koncentrationsgräns testas under exponeringssession 1 och lägre mortalitet än 50 % observeras, behövs inga ytterligare tester utföras. Om det finns ett regelverk eller vetenskapligt behov av att fastställa förhållandet koncentration/tid/respons för högre nivåer än den angivna koncentrationsgränsen bör nästa exponering utföras vid en högre nivå som t.ex. två gånger koncentrationsgränsen (dvs. 2 L i figur 1).

4. Om toxicitet observeras vid koncentrationsgränsen behöver ytterligare tester utföras (huvudstudie). Dessa exponeringar utförs antingen vid lägre koncentrationer (i figur 1: exponeringssession II, III eller IV) eller högre koncentrationer med kortare varaktigheter (i figur 1: exponeringssession IV) med anpassade tidsperioder som inte är så vitt åtskilda.

5. Testet (inledande koncentration och ytterligare koncentrationer) utförs med 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt eller med 2 djur av det mer mottagliga könet per koncentration/tidpunkt. Under vissa omständigheter kan försöksledaren välja att använda 2 råttor per kön per koncentration/tidpunkt (eller 4 djur av det mer mottagliga könet per koncentration/tidpunkt) (15). Att använda 2 djur per kön per koncentration och tidpunkt kan generellt minska förutfattade meningar angående uppskattningarnas variation, öka framgångsgraden och förbättra konfidensintervallets täckning i förhållande till det protokoll som beskrivs här. Mer information finns i GD 39 (2).

6. Helst ska varje exponeringssession genomföras på en dag. Detta ger möjlighet att fördröja nästa exponering tills det finns en rimlig garanti för överlevnad, och det gör att försöksledaren kan justera målkoncentrationen och tidsperioden för nästa exponeringssession. Det rekommenderas att börja varje exponeringssession med den grupp som kommer att exponeras längst, t.ex. gruppen för exponering i 240 minuter följt av den som exponeras i 120 minuter, och så vidare. Om, till exempel, djur i 240-minutersgruppen dör efter 90 minuter eller uppvisar allvarliga tecken på toxicitet (t.ex. extrema förändringar i andningsmönster såsom ansträngd andning) är det inte meningsfullt att utsätta en grupp för 120 minuter eftersom dödligheten sannolikt skulle vara 100 %. Därför bör försöksledaren välja kortare exponeringstider för den koncentrationen (t.ex. 90, 65, 45, 33 och 25 minuter).

▼M4

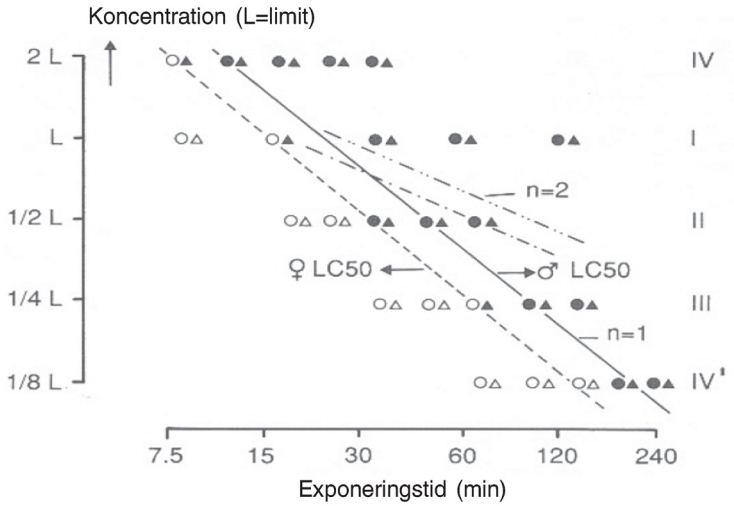
7. Kammarens koncentration bör mätas ofta för att bestämma den tidsviktade genomsnittskoncentrationen för varje exponeringsvaraktighet. När det är möjligt bör tidpunkten för dödsfallet för varje djur (snarare än exponeringsvaraktighet) användas för den statistiska analysen.

8. Man bör se närmare på resultaten från de fyra första exponeringssessionerna för att identifiera luckor i koncentration-tidskurvan (se figur 1). Vid en otillräcklig tillpassning bör en ytterligare exponering (5:e koncentration) genomföras. Koncentrations- och exponeringsvaraktigheter för den 5:e exponeringen bör väljas för att täcka denna lucka.

9. Alla exponeringssessioner (inklusive den första exponeringssessionen) används för att beräkna förhållandet koncentration-tid-respons med hjälp av statistisk analys (16). Om det är möjligt ska för varje k × t-intervall det tidsviktade medelvärdet och exponeringsvaraktigheten fram till döden användas (om dödsfallet inträffar under exponeringen).

Figur 1

Hypotetisk illustration av förhållandet koncentration-tid-mortalitet för råttor



Ofyllda symboler = överlevande; fyllda symboler = döda djur

Trianglar = honor; cirklar = hanar

Heldragen linje = LC_{50}-värden (7,5–240 min) för hanar med n = 1

Streckad linje = LC_{50}-värden (7,5–240 min) för honor med n = 1

Prickad linje = hypotetiska LC_{50}-värdeslinjer för hanar och honor om n hade varit lika med 2 (12).

Ordförklaringar

Koncentration:

Exponeringstid:

▼M4

10. Nedan finns ett exempel på ett stegvist förfarande:

Exponeringssession 1 – testning vid koncentrationsgräns (se figur 1)

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt ([a])

— Målkoncentration ([b]) = koncentrationsgräns.

— Exponera fem grupper av djur för denna målkoncentration för respektive varaktighet 15, 30, 60, 120 och 240 minuter.

↓

Exponeringssession II ([c]) – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ([d]) (1/2 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor √2 utspritt; se figur 1).

↓

Exponeringssession III – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ([d]) (1/4 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor √2 utspritt; se figur 1).

↓

Exponeringssession IV′ – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ([d]) (1/8 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor √2 utspritt; se figur 1).

↓ eller

([a]) Om det inte finns någon information tillgänglig om könsmottaglighet används råttor av båda könen, dvs. 1 djur/kön per koncentration. Baserat på befintlig information eller om det blir uppenbart under denna exponeringssession att ett kön är mer mottagligt, används 10 djur av det mer mottagliga könet (2 djur per koncentration/tidpunkt) för varje koncentrationsnivå under efterföljande testning.10 djur

([b]) När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l. Vid förväntad toxicitet, eller baserat på resultaten från det inledande testet, bör lägre startkoncentrationer väljas. I fall av regulatoriska eller vetenskapliga behov kan högre koncentrationer användas.

([c]) Helst ska exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att de tidigare testade djuren överlever. Detta gör att försöksledaren kan justera målkoncentration och varaktighet för nästa exponeringssession.

([d]) Den minsta dosering (koncentration × tid) som resulterade i mortalitet vid den inledande koncentrationen (första exponeringssessionen) gäller som vägledning för att fastställa nästa kombination av koncentration och exponeringsvaraktighet. Normalt minskas koncentrationen tvåfaldigt (1/2 l) och djuren exponeras under ett nytt tidsintervall med ett finare rutnät av geometrisk uppdelning av exponeringsperioder med faktor 1,4 (√2; se hänvisning 11) runt tiden för den minsta letala dosnivån (tid × koncentration) som observerades under den första exponeringen. I denna figur (figur 1), observerades mortalitet först i exponeringssession I efter 15 min., varaktigheterna under session II centreras därför omkring 30 min., och är 15, 21 30, 42 och 60 min. Efter de första två exponeringarna rekommenderas att plotta datan i en liknande figur som visas ovan, och att kontrollera att förhållandet mellan koncentration och tid har en vinkel på 45 grader (n = 1), eller om förhållandet koncentration-tid-respons är mindre brant (t.ex. n = 2) eller brantare (t.ex. n = 0,8). I de senare fallen rekommenderas det att anpassa efterföljande koncentrationer och varaktigheter enligt detta.

▼M4

Exponeringssession IV – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en högre koncentration ([e]) (2 l) med något kortare exponeringsvaraktigheter (faktor √2 utspritt; se figur 1).

Matematisk behandling av resultaten för k × t-protokollet

11. Ett k × t-förfarande med 4 eller 5 exponeringskoncentrationer och fem varaktigheter ger 20 respektive 25 datapunkter. Med dessa datapunkter kan k × t-förhållandet beräknas med hjälp av statistisk analys (16):

Ekvation 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

där C = koncentration; t = exponeringstid, eller

Ekvation 2:

$$Response = f(C^n t)$$

där $n = b_1/b_2$.

Med hjälp av ekvation 1 kan LC_{50}-värdet beräknas för en given tidsperiod (t.ex. 4 timmar, 1 timme, 30 minuter eller valfri tidsperiod inom intervallet för testets tidsperioder) med P = 5 (50 % respons). Observera att Habers lag endast är tillämplig när n = 1. LC_{01} kan beräknas med hjälp av P = 2,67.

([e]) I vissa fall kan det vara nödvändigt att öka koncentrationen (2 l) under ett nytt tidsintervall med ett ännu finare rutnät av geometrisk uppdelning av exponeringsperioder med faktor 1,4 (√2) omkring tiden för den minsta letala koncentrationsnivån som observerades under den första exponeringen. Den minsta exponeringstiden bör helst överstiga 5 minuter, den maximala exponeringstiden bör inte överstiga 8 timmar.

▼B

B.3 **AKUT TOXICITET (DERMALT)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet appliceras i graderade doser på huden till flera grupper av försöksdjur, en bestämd dos per grupp. Därefter observeras effekter och dödsfall. Djur som dör under försöket ska obduceras och i slutet av försöket obduceras överlevande djur.

Det kan vara nödvändigt att på ett humant sätt avliva djur som uppvisar ihållande tecken på stark smärta och lidande. Undersökningar av ämnen på ett sätt som på grund av deras frätande eller irriterade egenskaper vållar avsevärd smärta och lidande behöver inte utföras.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

I minst fem dagar före försöket ska djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i behandlingsgrupper. Ungefär 24 timmar före testet ska päls avlägsnas från djurens rygg genom klippning eller rakning. Vid klippning eller rakning ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas, eftersom det kan ändra dess genomtränglighet. Minst 10 % av kroppsytan ska göras klar för applicering av testämnet. Vid test av fasta ämnen, som får pulvriseras om det är lämpligt, ska testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. När vehikel används ska hänsyn tas till vehikelns inverkan på testämnets penetrering av huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda.

1.6.2 **Testbetingelser**

1.6.2.1 *Försöksdjur*

Könsmogna råttor eller kaniner får användas. Andra arter kan användas men i så fall ska detta motiveras. De vanligen nyttjade laboratoriestammarna ska användas. För både han- och honkön gäller att vikten hos djur som används i ett försök inte får avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

▼B

1.6.2.2 *Antal och kön*

Minst 5 djur ska användas på varje dosnivå. De ska alla vara av samma kön. Om hondjur används får de inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Om det finns information som visar att ett kön är väsentligt mer känsligt ska djur av detta kön användas.

Anmärkning: Vid användning av djur som är högre upp i näringskedjan än gnagare vid tester av akut toxicitet ska man överväga användning av ett mindre antal djur. Doserna ska fastställas med omsorg och man ska anstränga sig för att inte utnyttja högre doser än moderat toxiska doser. Vid sådana undersökningar bör tillförsel av dödliga doser av testämnet undvikas.

1.6.2.3 *Dosnivåer*

Till försöket ska användas ett tillräckligt antal dosnivåer, minst tre, som ska vara så valda att man får en gra-dering av de toxiska verkningarna och av dödligheten i behandlingsgrupperna. När dosnivåerna bestäms ska hänsyn tas till eventuellt irriterande eller trätande effekter. Datauppgifterna ska vara tillräckliga för framställning av en dos-/responskurva och, om möjligt, för att medge en rimlig bestämning av LD_{50}.

1.6.2.4 *Gränstest*

Ett gränstest med en dosnivå av minst 2 000 mg/kg kroppsvikt kan utföras med en grupp av fem djur av varje kön enligt ovan beskrivna förfarande. Om ämnesrelaterade dödsfall inträffar bör en fullständig undersökning övervägas.

1.6.2.5 *Observationsperiod*

Observationstiden ska vara minst 14 dagar. Observationstiden ska emellertid inte vara strikt fastställd utan ska bestämmas utifrån de toxiska reaktionerna, tidpunkten för deras uppträdande och återhämtningsperiodens längd. Den kan följaktligen förlängas när detta anses nödvändigt. Tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner och tidpunkten för dödsfall är viktiga, särskilt om det finns en tendens till att sena dödsfall inträffar.

1.6.3 **Förfarande**

Djuren ska hållas i var sin bur. Testämnet ska appliceras jämnt över ett område som motsvarar ungefär 10 % av den totala kroppsytan. Vid användning av kraftigt toxiska ämnen kan en mindre yta täckas, men ämnet ska appliceras på ytan i ett så tunt och jämnt lager som möjligt.

Testämnen ska hållas i kontakt med huden med en porös gaskompress och icke hudirriterande tejp under en 24 timmar lång exponeringstid. Testytan ska vidare täckas på lämpligt sätt för att säkerställa att gaskompressen och testämnet hålls på plats så att djuren inte kan svälja testämnet. För att förhindra att djuren intar testämnet kan

▼B

rörelsehindrande anordningar användas, men total immobilisering rekommenderas inte.

I slutet av exponeringsperioden ska resterande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med annan lämplig metod för rengöring av huden. Observationer ska registreras systematiskt när de görs. Varje enskilt djur ska registreras separat. Den första dagen ska täta observationer göras. En grundlig klinisk undersökning ska göras minst en gång varje arbetsdag, andra observationer ska göras dagligen och lämpliga åtgärder ska vidtas för att minimera förlust av djur som ingår i studien, t.ex. ska djur som hittas döda obduceras eller nedfrysas och svaga eller döende djur ska isoleras eller avlivas.

Observation av djuren i burarna ska omfatta pälsförändringar, behandlad hud, ögon och slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Särskilt uppmärksamhet ska ägnas åt observation av skälvningar, kramper, salivavsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Tidpunkten för dödsfall ska registreras så noggrant som möjligt. Djur som dör under försöket ska obduceras och i slutet av försöket ska överlevande djur obduceras. Alla makroskopiska patologiska förändringar ska registreras. När det är indicerat ska vävnadsprov tas för histopatologisk undersökning.

Bedömning av toxicitet bos det motsatta könet

Sedan en undersökning av det ena könet avslutats ska minst en grupp med fem djur av det motsatta könet testas för att fastställa om djur av detta kön är avsevärt mer känsliga för testämnet. I vissa fall kan användning av färre djur vara motiverat. Om det finns tillräckligt med information om att djur av det kön som har testats är avsevärt mer känsliga, behöver djur av det motsatta könet inte testas.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp ska anges antal djur i början av försöket, tidpunkten för enskilda djurs dödsfall, antal djur som visar andra tecken på toxicitet, beskrivning av toxiska effekter och obduktionsfynd. De enskilda försöksdjurens vikt ska bestämmas och registreras omedelbart innan testämnet appliceras, därefter varje vecka och vid dödsfall. Viktförändringar ska beräknas och registreras om överlevnaden överstiger en dag efter applicering av testämnet. Avlivning av djur på ett humant sätt till följd av ämnesrelaterat lidande och smärta ska registreras som ämnesrelaterade dödsfall. LD_{50} ska bestämmas enligt en erkänd metod.

Utvärderingen av data ska omfatta eventuellt samband mellan djurens exponering för testämnet och omfattningen och svårighetsgraden av alla abnormiteter, inklusive beteendemässiga och kliniska abnormiteter, makro-skopiska lesioner, ändringar av kroppsvikt, dödlighet och eventuella andra toxikologiska effekter.

3. RAPPORTERING

3.1 **TESTRAPPORT**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

▼B

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser (inklusive metod för hudrengöring och slag av bandage: med eller utan ocklusion).

— Dosnivåer (med angivande av vehikel, om sådan används, och koncentrationer).

— Försöksdjurens kön.

— Tabelluppställning av responsdata efter kön och dosnivå (dvs. antal döda djur, antal djur som uppvisar tecken på toxicitet, antal exponerade djur).

— Dödstidpunkt efter dosering, motivering och kriterier för human avlivning av djur.

— Alla observationer.

— LD_{50}-värde för det kön som har varit föremål för en fullständig undersökning bestämt efter 14 dagar med angivande av bestämningsmetod.

— 95 % tillförlitlighetsintervall för LD_{50} (där detta är möjligt).

— Dos-dödlighetskurva och lutning (om bestämningsmetoden medger detta).

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Resultat av försök med motsatt kön.

— Diskussion av resultaten (med särskild uppmärksamhet på om human avlivning av djur under försöket kan ha inverkat på det beräknade LD_{50}-värdet).

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (E).

▼B

B.4 **AKUT TOXICITET: HUDIRRITATION/HUDKORROSION**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 404 (2002).

1.1 INLEDNING

Vid utarbetandet av denna uppdaterade metod lades särskilt stor vikt vid möjligheterna till bättre testningsförfaranden, där djurskyddsfrågor beaktas så väl som möjligt. Sådana förfaranden innebär att all existerande information om testämnet utvärderas i syfte att undvika onödiga djurförsök. Metoden inbegriper en rekommendation om att laboratoriet, innan det beskrivna *in* vivo-testet för hudkorrosion/hudirritation utförs, gör en *weight-of-the-evidence-analys* av existerande relevanta data. Om de data som finns att tillgå inte är tillräckliga, kan behövliga data genereras med hjälp av stegvis testning (1). Den rekommenderade testningsstrategin inbegriper validerade och godkända *in* vitro-test (se bilagan till denna metod). Dessutom rekommenderas att de tre testkompresserna, där det är lämpligt, appliceras på djuret i följd, i stället för samtidigt, vid det inledande *in vivo*-testet.

Med hänsyn till sund vetenskaplig praxis och djurens välbefinnande bör *in vivo*-testning inte genomföras förrän alla tillgängliga data som är relevanta för ämnets förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation har utvärderats genom en *weight-of-the-evidence-analys*. Sådana data är belägg från gjorda undersökningar på människor och/eller försöksdjur, belägg på korrosion/irritation i fråga om ett eller flera strukturellt besläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, data som demonstrerar att ämnet är stark surt eller alkaliskt (2), (3) samt resultat från validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-test (4), (5), (5a). Genom analysen bör man kunna minska behovet av *in* vivo-testning med avseende på hudkorrosion/hudirritation när det gäller ämnen för vilka det redan finns tillräckliga belägg från andra undersökningar av dessa två end points.

En rekommenderad strategi för stegvis testning, som inbegriper validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-test med avseende på korrosion/irritation finns som bilaga till denna metod. Strategin utvecklades av och rekommenderades enhälligt av deltagarna i en OECD-arbetsgrupp (6). Strategin har antagits som den rekommenderade testningsstrategin i Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Sub-stances (GHS) (7). Strategin för stegvis testning ingår inte i testmetod B.4, men användning av den rekommenderas ändå innan man går in för *in vivo*-testning. För nya ämnen rekommenderas den som ett stegvis testningsförfarande för generering av vetenskapligt sunda data om ett ämnes förmåga att framkalla korrosion/irritation. För befintliga ämnen med otillräckliga data om hudkorrosion/hudirritation bör strategin användas för att fylla upp luckor i tillgängliga data. Om en annan testningsstrategi eller en annan procedur används, eller om man beslutar att inte använda ett stegvis testningsförfarande, bör detta motiveras.

Om bestämningen av korrosivitet eller irritationsförmåga inte kan göras med hjälp av en *weight-of-the-evi*dence-analys som står i överensstämmelse med strategin för stegvis testning, bör ett *in vivo*-test övervägas (se bilagan).

▼B

1.2 DEFINITIONER

Hudirritation: Uppkomsten av reversibel skada på huden efter att testämnet har applicerats i upp till 4 timmar.

Hudkorrosion (hudfrätning): Uppkomsten av irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter att ett testämne har applicerats i upp till fyra timmar. Frätningsreaktioner karakteriseras av sår, blödning, blodiga sårskorpor och, vid slutet av observationsperioden på 14 dagar, avfärgning genom blekning av huden, hela områden med alopeci (håravfall) och ärr. Histopatologi bör övervägas för utvärdering av skador som inte är entydiga.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet appliceras som en engångsdos på försöksdjurets hud. Djurets obehandlade hudområden används som referens. Graden av irritation eller korrosion granskas och poängsätts med specifierade intervall, och beskrivs närmare i syfte att få en fullständig utvärdering av verkningarna. Testet bör pågå tillräckligt länge för att ge möjlighet att utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.

Djur som uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande eller smärta vid något skede av testningen bör avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av ämnet. Kriterier för att fatta beslut om skonsam avlivning av döende eller svårt lidande djur finns i hänvisning (8).

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser för *in vivo-test***

1.4.1.1 *Val av djurart*

Rekommenderat försöksdjur är albinokanin. Friska, unga vuxna exemplar bör användas. Om andra arter används bör detta motiveras.

1.4.1.2 *Förberedelse av djuren*

Cirka 24 timmar före testet bör djurens päls avlägsnas genom kortklippning av flankens ryggsida. Varsamhet bör iakttas för att inte repa huden, och endast djur med frisk och intakt hud bör användas.

Kaniner från vissa stammar har områden med speciellt tät päls, särskilt under vissa årstider. Sådana områden bör inte användas för testning.

1.4.1.3 *Förvarings- och utfodringsbetingelser*

Djuren ska inhysas individuellt. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 20 °C (± 3 °C) för kaniner. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Konventionellt laboratoriefoder kan användas för utfodringen, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

▼B

1.4.2 **Testförfarande**

1.4.2.1 *Applicering av testämnet*

Testämnet appliceras på en liten yta (cirka 6 cm^2) av huden och täcks med en kompress som hålls på plats med ett icke-irriterande häftförband. Om det inte är möjligt att applicera ämnet direkt (exempelvis vätskor eller vissa pastor) bör ämnet först appliceras på kompressen, som därefter placeras på huden. Kompressen ska under exponeringsperioden hållas i lös kontakt med huden med hjälp av ett lämpligt halvocklusivt förband. Om testämnet appliceras på kompressen bör denna fästas vid huden på sådant sätt att det finns god kontakt och en jämn fördelning av ämnet på huden. Man bör se till att djuret inte når kompressen, eller kan äta eller andas in ämnet.

Ämnen i vätskeform används i regel outspädda. Vid testning av fasta ämnen (som vid behov kan pulverise-ras) ska ämnet vätas med minsta möjliga mängd vatten (eller vid behov någon annan lämplig vehikel), som behövs för att säkerställa god hudkontakt. Om annan vehikel än vatten används bör vehikelns potentiella inverkan på den hudirritation som testämnet framkallar vara minimal eller noll.

I slutet av exponeringsperioden (som i regel varar fyra timmar) ska överskottsämne om möjligt avlägsnas med vatten eller ett lämpligt lösningsmedel, utan att störa existerande respons eller skada huden.

1.4.2.2 *Dosnivå*

En dos på 0,5 ml vätska eller 0,5 g fast ämne eller pasta appliceras på huden.

1.4.2.3 *Inledande test (test avseende hudirritation/hudkorrosion* in vivo *på ett enskilt djur)*

Det rekommenderas starkt att ett första *in* vivo-test görs på ett enskilt djur, särskilt om det föreligger misstanke om att ämnet kan vara korrosivt. Detta är i enlighet med strategin för stegvis testning (se bilaga 1).

Om ett ämne har bedömts vara korrosivt på grundval av en *weight-of-the-evidence*-analys, behövs ingen ytterligare testning på djur. För de flesta ämnen som misstänks vara korrosiva, behövs i regel ingen ytterligare *in* vivo-testning. I fall där det på grund av otillräckliga bevis är motiverat att generera ytterligare data, kan begränsade test på djur genomföras enligt följande princip: Upp till tre testkompresser appliceras sekventiellt på djuret. Den första kompressen tas bort efter tre minuter. Om ingen allvarlig hudreaktion kan observeras, appliceras en andra kompress, som i sin tur tas bort efter en timme. Om observationerna i detta skede tyder på att exponeringen kan förlängas till fyra timmar utan lidande för testdjuret, appliceras en tredje kompress, som tas bort efter fyra timmar. Därefter kan responsen graderas.

Om korrositivitet kan observeras efter någon av de tre sekventiella exponeringarna, avslutas testet omedelbart. Om ingen korrosion observeras efter att den sista kompressen har tagits bort, hålls djuret under observation i 14 dagar, utom om korrosion framkallas tidigare.

▼B

I fall där testämnet inte förväntas framkalla korrosion men där det kan vara irriterande, appliceras en enstaka kompress på ett djur i fyra timmar.

1.4.2.4 *Bekräftande test (*in vivo*-test avseende hudirritation med ytterligare djur)*

Om ingen korrosion observeras vid det inledande testet bör irritationsrespons eller negativ respons bekräftas med hjälp av ytterligare två djur. En kompress appliceras på vardera djuret för en exponeringsperiod på fyra timmar. Om irritation har observerats vid det inledande testet, kan bekräftelsetestet göras enligt det sekventiella förfarandet eller genom samtidig exponering på ytterligare två djur. Om inledande test i undantagsfall inte utförs, kan två eller tre djur behandlas med en enskild kompress som tas bort efter fyra timmar. Om två djur används, och samma respons observeras hos båda, behövs ingen ytterligare testning. I annat fall testas även det tredje djuret. Om den respons som observeras inte är entydig, kan det vara nödvändigt att klargöra responsen med hjälp av ytterligare djur.

1.4.2.5 *Observationsperiod*

Observationsperioden bör vara tillräckligt lång för att man till fullo ska kunna utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller inte. Försöket bör dock avslutas omedelbart, oavsett hur länge det pågått, om ett djur uppvisar tecken på svåra smärtor eller lidande. För utvärderingen av om verkningarna är reversibla, bör djuren observeras i upp till 14 dagar efter att kompresserna har tagits bort. Om reversibilitet kan observeras innan 14 dagar har gått kan försöket omedelbart avslutas.

1.4.2.6 *Kliniska observationer och gradering av hudreaktionerna*

Alla djur bör undersökas för tecken på erytem och ödem, och den respons som erhållits vid 60 minuter och därefter vid 24, 48 och 72 timmar efter borttagning av kompresserna registreras. Vid inledande test på ett enskilt djur undersöks applikationsstället omedelbart efter att kompressen har tagits bort. Hudreaktionerna graderas och registreras enligt klassificeringsskalan i tabellen nedan. Om djuret har fått en hudskada som vid 72 timmar inte kan identifieras som irritation eller korrosion, kan observationer behövas fram till dag 14 för att avgöra om verkningarna är reversibla. Utöver observationerna av irritation, bör alla lokala toxiska effekter, såsom avfettning av huden och alla eventuella systemiska skadliga verkningar (exempelvis kliniska tecken på toxicitet eller verkningar på kroppsvikten) till fullo beskrivas och registreras. I fall av tvetydig respons bör en histopatologisk undersökning övervägas i klargörande syfte.

Graderingen av hudrespons är oundgängligen subjektiv. För att främja en harmonisering i fråga om graderingen av hudrespons och som stöd för testningslaboratorier och alla som är med om att utföra och tolka observationer, bör den personal som gör observationsarbetet få tillbörlig utbildning i det poängsättnings-system som används (se tabellen nedan). En illustrerad vägledning för gradering av hudirritation och andra hudskador kan vara till hjälp (9).

2. **DATA**

2.1 PRESENTATION AV RESULTATEN

Undersökningens resultat bör sammanställas i tabellform i den slutliga testrapporten. Resultaten bör omfatta alla aspekter som uppräknas i avsnitt 3.1.

▼B

2.2 **UTVÄRDERING AV RESULTATEN**

Graderna av hudirritation bör bedömas med hänsyn till skadornas natur och allvarlighetsgrad samt till om skadorna är reversibla eller irreversibla. Individuella resultat av graderingen representerar ingen absolut standard för ett ämnes förmåga att framkalla irritation, eftersom även andra verkningar av testämnet utvärderas. De enskilda bedömningarna bör däremot ses som referensvärden, som bör utvärderas i kombination med alla andra observationer från undersökningen.

Reversibiliteten hos hudskador bör beaktas när man utvärderar respons med avseende på irriterande egenskaper. Om verkningar av typen alopeci (begränsat område), hyperkeratos, hyperplasi och flagning håller i till slutet av den 14 dagar långa observationsperioden, bör testämnet betraktas som irriterande.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Motivering för *in vivo*-testning: *weight-of-evidence-analys* av tidigare existerande data, inbegripet resultat från stegvis testning enligt den rekommenderade strategin, enligt följande:

— Beskrivning av relevanta data som erhållits före testningen.

— Data som erhållits från de enskilda stegen enligt testningsstrategin.

— Beskrivning av utförda *in vitro*-test, inbegripet detaljerade uppgifter om förfaranden och resultat som erhållits med test- och referensämnen.

— *Weight-of-the-evidence*-analys för utförandet av *in vivo*-test.

Testämne:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer),

— Fysikalisk natur och fysikalkemiska egenskaper (till exempel pH, flyktighet, löslighet, stabilitet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa andelar (i procent).

Vehikel:

— Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.

— Motivering för valet av vehikel.

Testdjur:

— Art och stam som har använts, motivering om albinokanin inte har använts.

— Antalet djur per kön.

— De enskilda djurens vikt vid testets start och slut.

— Djurens ålder vid testets start.

— Ursprung, förvarsförhållanden, foder och dylikt.

▼B

Testbetingelser:

— Teknik som använts för att förbereda appliceringsstället.

— Detaljerade uppgifter om de kompressmaterial som har använts och om förbandstekniken.

— Detaljerade uppgifter om beredning, applicering och borttagning av testämnet.

Resultat:

— En tabell med graderad irritations-/korrosionsrespons för varje djur vid alla observationspunkter.

— Beskrivningar av alla observerade skador.

— Beskrivande redogörelse av naturen och graden av den irritation eller korrosion som har observe rats samt eventuella histopatologiska fynd.

— Beskrivning av övriga skadliga lokala (till exempel avfettning av huden) och systemiska verkningar utöver hudirritation eller hudkorrosion.

Diskussion om resultaten.

4. HÄNVISNINGAR

1. Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

2. Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19–26.

3. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998), Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709–720.

4. ECETOC (1990), Monograph No. 15, Skin Irritation, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483–524.

5a. Testing Method B.40 Skin Corrosion.

6. OECD (1996), OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (http://www.oecd1.org/ehs/test/background.htm).

7. OECD (1998), Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

8. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd1.org/ehs/test/ monos.htm).

9. EPA (1990), Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

(Available from OECD Secretariat upon request.)

▼B

Tabell 1

GRADERING AV HUDREAKTIONER

Rodnad och sårskorpebildning

Ingen rodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbart)	1
Väldefinierad rodnad	2
Moderat till svår rodnad	3
Svår rodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

Maximum: 4

Ödembildning

Inget ödem	0
Mycket svagt ödem (knappt skönjbart)	1
Milt ödem (området är väl avgränsat genom klar svullnad)	2
Moderat ödem (svullnadens höjd cirka 1 mm)	3
Svårt ödem (höjd över 1 mm och svullnaden sträcker sig utöver exponeringsområdet)	4

Maximum: 4

I fall av tvetydig respons kan en histopatologisk undersökning utföras i klargörande syfte.

▼B

Bilaga

Strategi för stegvis testning med avseende på hudirritation och hudkorrosion

ALLMÄNT

Även om denna strategi för stegvis testning inte ingår som en del av testmetod B.4, är den ett uttryck för det tillvägagångssätt som rekommenderas för bestämning av hudirriterande eller hudkorrosiva egenskaper. Detta tillvägagångssätt representerar både bästa praxis och etiska riktlinjer för *in vivo*-testning med avseende på hudirritation/hudkorrosion. Testmetoden utgör en vägledning för utförandet av *in vivo*-test och en sammanfattning av de faktorer som bör beaktas innan ett sådant test påbörjas. Strategin utgör ett tillvägagångssätt för utvärderingen av existerande data om olika testämnens egenskaper med avseende på hudirritation/hudkorrosion. Den utgör också ett stegvis förfarande för generering av relevanta data om ämnen för vilka det krävs ytterligare testning eller för ämnen som ännu inte har testats. Enligt strategin rekommenderas även validerade och godkända test *in vitro* eller *ex vivo* med avseende på hudkorrosion/hudirritation under specifika betingelser.

Med hänsyn till sund vetenskaplig praxis och djurens välbefinnande är det viktigt att undvika onödig användning av djur, och att minimera all testning som sannolikt framkallas allvarlig respons hos djuren. All information som är relevant för ämnets förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation bör utvärderas innan man överväger *in vivo*-testning. Det kan eventuellt redan finnas tillräckliga bevis för att klassificera ett testämne med avseende på dess förmåga att framkalla hudkorrosion eller hudirritation, utan att för den skull behöva utföra testning på laboratoriedjur. När man använder en *weight-of-the-evidence*-analys och en strategi för stegvis testning minimeras behovet av *in vivo*-testning, särskilt för ämnen som sannolikt framkallar allvarliga reaktioner.

Det rekommenderas att en *weight-of-the-evidence*-analys används för att utvärdera existerande information om olika ämnens förmåga att framkalla hudirritation eller hudkorrosion för att avgöra om det behövs ytterligare testningar, andra än hudtestningar *in vivo,* som hjälp för att karakterisera en sådan egenskap. I fall där ytterligare undersökningar behövs, rekommenderas strategin för stegvis testning när det gäller att generera relevanta försöksdata. För ämnen som inte har testats tidigare bör strategin för stegvis testning användas för att generera de data som behövs för att utvärdera ämnets förmåga att framkalla hudkorrosion eller hudirritation. Den testningsstrategi som beskrivs i denna bilaga har utarbetats inom ramen för en OECD-arbetsgrupp (1). Strategin bekräftades och utvidgades senare i *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances,* i den form det godkändes vid 28th *Joint Meeting ofthe Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals,* i november 1998 (2).

BESKRIVNING AV UTVÄRDERINGS- OCH TESTNINGSSTRATEGIN

Innan testning utförs som en del av strategin för stegvis testning (se schemat), bör all tillgänglig information utvärderas i syfte att fastställa behovet av *in* vivo-testning. Trots att signifikant information kan fås genom utvärdering av enskilda parametrar (till exempel extrema pH-värden), bör den tillgängliga informationen utvärderas som en helhet. Alla relevanta data om det berörda ämnets (eller analoga ämnens) verkningar bör utvärderas genom beslut som grundas på en *weight-of-the*-evidence-analys, och en motivering för beslutet bör anges. Huvudvikten bör läggas vid existerande data om ämnet (både i fråga om människor och djur). Därefter följer resultatet av testning *in vitro* eller *ex vivo. In vivo*-testning av korrosiva ämnen bör alltid undvikas när det är möjligt. Till de faktorer som bör beaktas inom ramen för testningsstrategin hör följande:

▼B

Utvärdering av existerande data rörande människor och djur (steg 1). Existerande data rörande människor, till exempel kliniska undersökningar eller undersökningar inom arbetslivet och fallstuder och/eller data om testning på djur, såsom data från toxicitetsundersökningar med enstaka eller upprepadhudexponering, bör beaktas först, eftersom de ger tillgång till information som direkt hör samman med verkningarna på huden. Ämnen med kända irriterande eller korrosiva egenskaper, samt ämnen med klara bevis om att de inte har sådana egenskaper, behöver inte testas *in vivo.*

Analys av strukturaktivitetssamband (SAR) (steg 2). I mån av tillgänglighet bör resultaten från testning av strukturellt närbesläktade ämnen beaktas. Om det finns tillgång till data rörande människa och/eller djur för strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, och dessa data är tillräckliga för att indikera att dessa ämnen har förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation, kan man anta att det ämne som utvärderas kommer att framkalla samma respons. I sådana fall behöver ämnet eventuellt inte testas. Negativa data från undersökningar med strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen utgör inte, inom ramen för strategin för stegvis testning, tillräckliga bevis på att ett ämne inte skulle ha korrosiva eller irriterande egenskaper. Validerade och godkända metoder för bestämning av strukturaktivitetssamband bör användas för att identifiera förmågan att framkalla hudkorrosion och hudirritation.

Fysikalkemiska egenskaper och kemisk reaktivitet (steg 3). Ämnen med extrema pH-värden, till exempel $\leq 2{,}0$ eller $\geq 11{,}5$ kan ha kraftiga lokala verkningar. Om ett extremt pH-värde används som grund för att konstatera att ett ämne är korrosivt eller irriterande för huden, behöver eventuellt också ämnets syra/basreserv (buffertkapacitet) beaktas (3), (4). Om buffertkapaciteten tyder på att ämnet eventuellt inte är korrosivt för huden, bör ytterligare testning utföras för att bekräfta detta. Härvid bör man helst använda validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-tester (se stegen 5 och 6).

Toxicitet för huden (steg 4). Om ett ämne har konstaterats vara mycket toxiskt när det tillförs via huden, kan en *in vivo*-undersökning med avseende på hudirritation/hudkorrosion eventuellt inte utföras på grund av att den normalt applicerade mängden testämne skulle överskrida den mycket toxiska dosen, vilket skulle leda till att djuren dör eller utsätts för svårt lidande. Om dessutom undersökningar med avseende på toxicitet för huden har gjorts på albinokanin med doser upp till gränsnivån på 2 000 mg/kg kroppsvikt eller högre, och ingen hudirritation eller hudkorrosion har observerats, behövs sannolikt ingen ytterligare testning för hudirritation eller hudkorrosion. Ett antal faktorer bör beaktas vid utvärderingen av resultaten från tidigare utförda undersökningar med avseende på akut toxicitet för huden. Som exempel kan nämnas att den rapporterade informationen om hudskador kan vara ofullständig. Testningen och observationerna kan ha gjorts på en annan art än kanin, och arterna kan vara mycket olika när det gäller responskänsligheten. Testämnet kan också ha applicerats på djuren i en form som inte är lämplig när det gäller bedömning av hudirritation/hudkorrosion, till exempel utspädda ämnen för testning av toxicitet för huden (5). I fall där välplanerade och välutförda undersökningar med avseende på toxicitet för huden har gjorts på kanin, kan dock negativa fynd anses vara tillräckligt bevis på att ämnet i fråga inte är korrosivt eller irriterande.

Resultat från in vitro- eller ex vivo-test (steg 5 och 6). Ämnen som har uppvisat korrosiva eller starkt irriterande egenskaper i ett validerat och godkänt test *in vitro eller ex vivo* (6), (7) avsett för utvärdering av dessa specifika verkningar, behöver inte testas på djur. Man kan anta att sådana ämnen framkallar liknande allvarliga verkningar *in vivo.*

▼B

In vivo-test på kanin (steg 7 och 8). Om ett beslut grundat på en *weight-of the-evidence*-analys fattats för *in vivo*-testning, bör man börja med ett inledande test där ett enskilt djur används. Om resultatet av ett sådant test tyder på att ämnet framkallar korrosion på huden, bör ingen ytterligare testning utföras. Om ingen korrosion observeras vid det inledande testet bör irritationsrespons eller negativ respons bekräftas med hjälp av ytterligare två djur och en exponeringsperiod på fyra timmar. Om irritation har observerats vid det inledande testet, kan bekräftelsetestet göras enligt den stegvisa principen eller genom samtidig exponering på ytterligare två djur.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1996), ”Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods”, Solna, Sverige, den 22–24 januari 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2. OECD (1998), Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, november 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3. A.P. Worth, J.H. Fentem, M. Balls, P.A. Botham, R.D. Curren, L.K. Earl, J. Esdaile, M. Liebsch (1998), ”An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion”, *ATLA*. 26, 709–720.

4. J.R. Young, M.J. How, A.P. Walker, W.M.H.Worth (1988), ”Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals”, *Toxic In Vitro, 2* (1) 19–26.

5. S.M. Patil, E. Patrick, H.I. Maibach (1996), ”Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation”, Francis N. Marzulli och Howard I. Maibach (red.), *Dermatotoxicology,* femte utgåvan ISBN 1-56032-356-6, kapitel 31, 411–436.

6. Testmetod B.40.

7. J.H. Fentem, G.E.B. Archer, M. Balls, P.A. Botham, R.D. Curren, L.K. Earl, D.J. Esdaile, H.G. Holzhutter och M. Liebsch (1998), ”The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team”, *Toxicology in Vitro,* 12, 483–524.

▼B

Schema

TESTNINGS- OCH UTVÄRDERINGSSTRATEGI FÖR HUDIRRITATION/HUDKORROSION

	Activity	Finding	Conclusion
1	Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes	Corrosive	Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed.
		Irritating	Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed.
		Not corrosive/not irritating	Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required.
	↓ *No information available, or available information is not conclusive*		
2	Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation	Predict severe damage to skin	Considered corrosive. No testing is needed.
		Predict irritation to skin	Considered an irritant. No testing is needed.
	↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative*		
3	Measure pH (consider buffering capacity, if relevant)	pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant)	Assume corrosivity. No testing is needed.
	↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant*		
4	Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1)	Very toxic	No further testing is needed.
		Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits	Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed.
	↓ *Such information is not available or is non-conclusive*		
5	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion	Corrosive response	Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Substance is not corrosive*		
6	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation	Irritant response	Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant*		
7	Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal	Severe damage to skin	Considered corrosive. No further testing is needed.
	↓ *No severe damage*		
8	Perform confirmatory test using one or two additional animals	Corrosive or irritating	Considered corrosive or irritating. No further testing is needed
		Not corrosive or irritating	Considered not corrosive or irritating. No further testing needed

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5 AKUT TOXICITET: ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION

1. METOD

Denna testmetod motsvarar OECD TG 405 (2002).

1.1 INLEDNING

Vid utarbetandet av denna uppdaterade metod lades särskilt stor vikt vid möjligheterna till bättre testningsförfaranden, där djurskyddsfrågor beaktas så väl som möjligt. Sådana förfaranden innebär att all existerande information om testämnet utvärderas i syfte att undvika onödiga djurförsök. Metoden innehåller en rekommendation om att laboratoriet, innan det beskrivna *in vivo*-testet för akut ögonkorrosion/ögonirritation inleds, gör en *weight-of-the-evidence*-analys av existerande relevanta data. Om de data som finns att tillgå inte är tillräckliga, kan behövliga data genereras med hjälp av stegvis testning (2) (3). Den rekommenderade testningsstrategin inbegriper validerade och godkända *in vitro*-test (se bilagan till denna metod). Likaså rekommenderas, innan *in vivo*-ögontest övervägs, utförandet av ett *in vivo*-test med avseende på hudirritation/hudkorrosion i syfte att förutsäga eventuell ögonkorrosion.

Med hänsyn till sund vetenskaplig praxis och djurens välbefinnande bör *in vivo*-testning inte övervägas förrän alla tillgängliga data som är relevanta för ämnets förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation har utvärderats genom en *weight-of-the-evidence*-analys. Till sådana data hör bevis från gjorda undersökningar på människor och/eller försöksdjur, bevis på förmåga att framkalla korrosion/irritation som finns hos ett eller flera strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, data om att ämnet är starkt surt eller alkaliskt (4) (5) samt resultat från validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-test med avseende på hudkorrosion och hudirritation (6) (6a). Sådana undersökningar kan ha gjorts före, eller motiverade av, *weight-of-the-evidence-analys.*

För vissa ämnen kan en sådan analys peka på att det behövs *in vivo*-testning av ämnets förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation. I alla sådana fall bör man, innan ett *in vivo*-ögontest övervägs, helst göra ett *in vivo*-test (testmetod B.4) för utvärdering av ämnets verkningar på huden (7). Med hjälp av *weight-of-the-evidence*-analys och strategin för stegvis testning bör man kunna minska behovet av *in* vivo-testning med avseende på ögonkorrosion/ögonirritation när det gäller ämnen för vilka det redan finns tillräckliga bevis från andra undersökningar. Om det inte går att fastställa ett ämnes förmåga att framkalla ögonkorrosion eller ögonirritation i enlighet med strategin för stegvis testning, inte ens efter det att man utfört en *in vivo*-undersökning med avseende på hudkorrosion och hudirritation, kan ett *in vivo*-test med avseende på ögonkorrosion och ögonirritation genomföras.

▼B

En rekommenderad strategi för stegvis testning, som inbegriper validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-test med avseende på korrosion/irritation, finns som bilaga till denna metod. Strategin utvecklades av och rekommenderades enhälligt av deltagarna i en OECD-arbetsgrupp (8). Strategin har antagits som den rekommenderade testningsstrategin i *Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances* (GHS) (9). Denna strategi för stegvis testning ingår inte i testmetod B.4, men användning av den rekommenderas ändå innan man går in för *in vivo*-testning. För nya ämnen rekommenderas den som en stegvis testningsmetod för generering av vetenskapligt sunda data om ett ämnes korrosion/irritation. För befintliga ämnen med otillräckliga data om korrosion/irritation för hud och ögon bör strategin användas för att fylla upp luckor i tillgängliga data. Om en annan testningsstrategi eller ett annat förfarande används, eller om man beslutar att inte använda ett förfarande med stegvis testning, bör detta motiveras.

1.2 DEFINITIONER

Ögonirritation: Ändringar som uppstår i ögat efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen.

Ögonkorrosion (ögonfrätning): Vävnadsskador som uppstår i ögat, eller allvarlig fysisk synnedsättning, efter applicering av ett testämne på ögats främre yta, och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet appliceras som en engångsdos i försöksdjurets ena öga. Det obehandlade ögat används som referens. Graden av ögonirritation eller ögonkorrosion utvärderas genom klassificering av skadorna på konjunktiva, hornhinnan och iris med specifika intervall. Likaså bör övriga verkningar i ögat och skadliga systemiska verkningar beskrivas för att en fullständig utvärdering av verkningarna ska fås. Testet bör pågå tillräckligt länge för att ge möjlighet att utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.

Djur som uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande eller smärta vid något skede av testningen bör avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av ämnet. Kriterier för att fatta beslut om skonsam avlivning av döende eller allvarligt lidande djur finns i hänvisning (10).

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser för *in vivo*-test**

1.4.1.1 *Val av art*

Rekommenderat försöksdjur är albinokanin. Friska, unga vuxna exemplar bör användas. Om andra arter eller stammar används bör detta motiveras.

1.4.1.2 *Förberedelse av djuren*

De djur som preliminärt har valts ut för testning bör undersökas med avseende på båda ögonen inom 24 timmar före testets början. Djur som har irriterade ögon, okulära defekter eller existerande skada på hornhinnan bör inte användas.

▼B

1.4.1.3 *Förvarings- och utfodringsbetingelser*

Djuren ska inhysas individuellt. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 20 ºC (±3 ºC) för kaniner. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Konventionellt laboratoriefoder kan användas för utfodringen, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

1.4.2 **Testförfarande**

1.4.2.1 *Applicering av testämnet*

Testämnet tillförs i ena ögats konjunktivasäck (alla djur). Före tillförseln bör det undre ögonlocket varsamt dras ut en bit ut från ögongloben. Ögonlocken förs därefter samman för cirka en sekund för att förhindra att ämnet kommer ut. Det andra, obehandlade ögat används som referens.

1.4.2.2 *Sköljning*

Försöksdjurens ögon bör inte sköljas under minst 24 efter tillförseln av testämnet, utom när det gäller fasta ämnen (se avsnitt 1.4.2.3.2) eller om det uppstår omedelbara korrosiva eller irriterande verkningar. Efter 24 timmar kan ögonen sköljas, om detta bedöms vara lämpligt.

Användningen av en satellitgrupp för att undersöka inverkan av sköljningen rekommenderas inte, utom om det är vetenskapligt motiverat. Om en satellitgrupp används, ska den bestå av två kaniner. Sköljningsbetingelserna bör dokumenteras omsorgsfullt, till exempel sköljningstidpunkten, lösningens sammansättning och temperatur samt sköljningstiden, applicerad volym och sköljningsintensitet (volymström).

1.4.2.3 *Dosnivå*

1.4.2.3.1 *Testning av vätskor*

Vid testning av vätskor används en dos på 0,1 ml. Pumpsprej bör inte användas för att tillföra ämnet direkt i ögat. I stället bör vätskan sprejas in i en behållare, som används för att tillföra 0,1 ml i ögat.

1.4.2.3.2 *Testning av fasta ämnen*

Vid testning av fasta ämnen, pastor och ämnen i partikelform, bör den tillförda mängden ha en volym på 0,1 ml eller en medelvikt på högst 100 mg. Testämnet bör malas ned till fint stoft. Det fasta materialets volym bör mätas efter en varsam kompaktering, som görs till exempel genom att klappa mätbehållaren. Om ett fast testämne inte har tagis bort ur försöksdjurets öga med hjälp av fysiologiska mekanismer vid den första observationstidpunkten (en timme efter behandlingen), kan ögat sköljas med saltslösning eller destillerat vatten.

▼B

1.4.2.3.3 *Testning av aerosoler*

Det rekommenderas att material i form av pumpsprej eller aerosol sprejas i en behållare, som sedan används för tillförsel i ögat. Det enda undantaget är aerosoler i tryckbehållare som inte går att samla in på grund av förångning. I sådana fall hålls djurets öga öppet och testämnet sprutas in i ögat under cirka en sekund, på cirka 10 cm avstånd direkt framför ögat. Avståndet kan variera beroende på behållarens tryck och innehåll. Det är viktigt att se till att ögat inte skadas av sprejtrycket. I tillämpliga fall kan det vara nödvändigt att utvärdera om sprejstyrkan kan framkalla ’mekanisk’ skada i ögat.

En uppskattning av dosen från en aerosol kan göras genom en simulering på följande sätt: Ämnet sprejas på ett vägningspapper genom en öppning som har storleken av ett kaninöga och som hålls strax framför papperet. Papperets viktökning används som grund för att uppskatta den mängd som har sprejats i ögat. För flyktiga ämnen kan dosen uppskattas genom att väga en mottagningsbehållare före och efter borttagning av testämnet.

1.4.2.4 *Inledande test (*in vivo-*test avseende ögonirritation/ögonkorrosion på ett enskilt djur)*

I enlighet med det som anges i strategin för stegvis testning (se bilaga 1), rekommenderas starkt att *in vivo*-testet först görs på ett enskilt djur.

Om resultatet av ett sådant test tyder på att ämnet är korrosivt eller framkallar allvarlig irritation i ögat när man använder det beskrivna förfarandet, bör ingen ytterligare testning utföras.

1.4.2.5 *Lokalbedövning*

Lokalbedömning kan användas beroende på fall. Om *weight-of-the-evidence*-analysen tyder på att ämnet kan framkalla smärta, eller om en inledande testning tyder på att en smärtsam reaktion kommer att ske, kan djuret få lokalbedövning innan testämnet tillförs. Typen, koncentrationen och dosen för lokalbedövningsmedlet bör väljas omsorgsfullt för att säkerställa att lokalbedövningen inte påverkar den reaktion som testämnet framkallar. Lokalbedövning bör även ges i det andra ögat (referensögat).

1.4.2.6 *Bekräftande test (*in vivo-*test avseende ögonirritation med ytterligare djur)*

Om ingen korrosiv verkan observeras vid det inledande testet, bör responsen (irriterande eller negativ) bekräftas med hjälp av högst två ytterligare djur. Om en allvarlig irritation har observerats vid det inledande testet, vilket tyder på en eventuell stark (irreversibel) verkan vid den bekräftande testningen, rekommenderas bekräftande test som görs stegvis på ett djur i taget, i stället för samtidigt test på båda tilläggsdjuren. Om frätning eller kraftig irritation kan observeras på det tilläggsdjur som först används, bör testningen avbrytas. Om irritationsresponsen är mild till moderat behövs eventuellt även det andra tilläggsdjuret för bekräftelse.

▼B

1.4.2.7 *Observationsperiod*

Observationsperioden bör vara tillräckligt lång för att det till fullo ska gå att utvärdera omfattningen och reversibiliteten hos de observerade verkningarna. Försöket bör dock avslutas omedelbart, oavsett hur länge det pågått, om det berörda djuret uppvisar tecken på svåra smärtor eller lidande (9). För fastställandet av verkningarnas reversibilitet bör djuren i regel observeras i 21 dagar efter tillförsel av testämnet. Om reversibilitet kan observeras innan 21 dagar har gått kan försöket omedelbart avslutas.

1.4.2.7.1 *Kliniska observationer och gradering av ögonreaktionerna*

Ögonen bör undersökas 1, 24, 48 och 72 timmar efter tillförsel av testämnet. Djuren bör inte utsättas för testning längre än det är nödvändigt för att få definitiv information. Djur som uppvisar allvarliga och ihållande tecken på smärta eller lidande bör omedelbart avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av ämnet. Djur som fått följande ögonskador efter tillförsel av ämnet bör avlivas på ett skonsamt sätt: perforering eller signifikant ulceration av kornea inklusive stafylom, blod i främre ögonkammaren, korneaopacitet av grad 4 som varar i 48 timmar; ingen ljusreaktion (irisreaktion av grad 2) som varar i 72 timmar, ulceration av konjuktivamembran, nekros i konjunktiva- eller blinkhinna eller bildning av sårskorpa. Skälet till avlivningen är att dessa skador i regel är irreversibla.

Djur som inte utvecklar okulära skador ska inte avlivas förrän det har gått tre dagar från tillförsel av ämnet. Djur med milda till moderata skador bör observeras tills skadorna läks, eller under 21 dagar. Efter det avslutas undersökningen. Observationer bör göras på dag 7, 14 och 21 i syfte att fastställa skadornas status och huruvida de är reversibla eller inte.

Graderna av okulär reaktion (konjunktiva, kornea och iris) bör registreras vid varje undersökning (se tabell 1). Likaså bör alla andra ögonskador (till exempel pannus, missfärgning) eller skadliga systemiska verkningar även rapporteras.

Som hjälpmedel vid undersökningen av reaktionerna kan användas en binokulärlupp, ficklampa, biomikroskop eller annan lämplig utrustning. Efter det att observationerna har registrerats vid 24 timmar efter tillförseln, kan ögonen undersökas ytterligare med hjälp av fluorescein.

Graderingen av okulär respons är oundgängligen subjektiv. För att främja en tillnärmning av graderingen av okulär respons, och som stöd för testningslaboratorier och alla som är med om att utföra och tolka observationer, bör den personal som gör observationsarbetet få tillbörlig utbildning om klassificeringssystemet. Graderingen av okulär respons bör göras i blindo.

2. **DATA**

2.2 UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Klassificeringen av okulär respons bör göras med hänsyn till skadornas natur och allvarlighetsgrad samt deras reversibilitet eller irreversibilitet. Individuella klassificeringsresultat representerar ingen absolut standard för ett ämnes förmåga att framkalla irritation, eftersom även andra verkningar av testämnet utvärderas. Enskilda klassificeringsresultat bör i stället ses som referensvärden, och de är meningsfulla endast när de åtföljs av en fullständig beskrivning och utvärdering av alla observationer.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Motivering för *in vivo*-testning: *weight-of-evidence*-analys av tidigare existerande data, inbegripet resultat från ett förfarande enligt strategin för stegvis testning, enligt följande:

— Beskrivning av relevanta data som erhållits före testningen.

— Data som erhållits vid de olika stegen enligt testningsstrategin.

— Beskrivning av utförda *in vitro*-test, inbegripet detaljerade uppgifter om förfaranden och resultat som erhållits med test- och referensämnen.

— Beskrivning av utförda *in vivo*-test med avseende på hudirritation/hudkorrosion, inbegripet de resultat som erhållits.

— *Weight-of-the-evidence*-analys för utförandet av *in vivo*-test.

Testämne:

— Identifieringsdata (till exempel CAS-nummer, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalkemiska egenskaper (till exempel pH, flyktighet, löslighet, stabilitet, reaktivitet med vatten).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa andelar (i procent).

— Om lokalbedövning används, anges identifieringsdata, renhet, typ, dos och potentiell växelverkan med testämnet.

Vehikel:

— Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.

— Motivering för valet av vehikel.

Testdjur:

— Art och stam som har använts, motivering om albinokanin inte har använts.

— Djurens ålder, enskilt för varje djur vid testets start.

— Antalet djur per kön i test- och kontrollgrupperna (vid behov).

— De enskilda djurens vikt vid testets start och slut.

— Ursprung, förvaringsbetingelser, foder och dylikt.

Resultat:

— Beskrivning av den metod som har använts för att klassificera irritationen vid varje observationstidpunkt (till exempel ficklampa, biomikroskop, fluorescein),

▼B

— En sammanställning i tabellform av responsdata rörande irritation/korrosion för varje djur vid varje observationstidpunkt fram till dess att testningen avslutas för det djurets del.

— Narrativ beskrivning av graden och naturen hos den irritation eller korrosion som har observerats.

— Beskrivning av alla andra eventuella ögonskador som har observerats (till exempel vaskularisering, pannusbildning, adhesioner, missfärgning).

— Beskrivning av icke-okulära lokala och systemiska skadliga verkningar och, i förekommande fall, histopatologiska fynd.

Diskussion om resultaten.

3.2 TOLKNING AV RESULTATEN

En extrapolering av resultaten från undersökningar av ögonirritation som gjorts på försöksdjur är valid endast till en begränsad utsträckning. I många fall är albinokaniner mycket känsligare än människor i fråga om ämnen som är irriterande eller korrosiva för ögat.

Särskild noggrannhet bör iakttas vid tolkning av resultaten i syfte att utesluta irritation som beror på en sekundär infektion.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

2. de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159–164.

3. Worth, A.P. och Fentem, J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.

4. Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19–26.

5. Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.

6. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. och Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

(6a) Testmetod B.40 Hudkorrosion.

(7) Testmetod B.4. Akut toxicitet: hudirriation/hudkorrosion.

(8) OECD (1996), OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, Solna, Sverige, den 22–24 januari 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998), Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, november 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tabell 1

GRADERING AV OKULÄRA SKADOR

Hornhinna (kornea)

Opacitet: graden av densitet (avläsningarna bör göras på området med den högsta densiteten) (*)

Ingen ulceration eller opacitet	0
Spridda eller diffusa områden med opacitet (annan än svag avmattning av den normala lystern), iris alla detaljer är klart synliga	1
Enkelt skönjbart translucent område, detaljerna i iris är lätt förmörkade	2
Pärlemorliknande område, inga detaljer i iris synliga, pupillens storlek kan knappt skönjas	3
Opak hornhinna, iris kan inte skönjas genom opaciteten	4

Maximum: 4

ANMÄRKNINGAR

NOTER

(*) Området för hornhinneopacitet bör noteras

Iris

Normal	0
Märkbart fördjupade rugae, blodstockning, svullnad, moderate hyperemi kring kornea eller injektion; iris reagerar för ljus (en långsam reaktion bedöms som en verkning)	1
Blödning, kraftig destruktion eller ingen reaktion för ljus	2

Maximum: 2

Konjunktiva

Rodnad (hänför sig till palpebral och bulbär konjunktiva, exklusive hornhinnan och iris)

Normal	0
Vissa blodkärl är hyperemiska (injekterade)	1
Diffus, blodröd färg; individuella blodkärl kan inte skönjas med lätthet	2
Diffust köttröd	3

Maximum: 3

Chemos

Svullnad (hänför sig till ögonlocken och/eller blinkhinnor)

Normalt	0
En viss svullnad över det normala	1
Klar svullnad, delvis eversion av ögonlocken	2
Svullnad, ögonlocken ungefär halvstängda	3
Svullnad, ögonlocken mer än halvstängda	4

Maximum: 4

▼B

Bilaga

Strategi för stegvis testning med avseende på ögonirritation och ögonkorrosion

ALLMÄNT

För en sund vetenskaplig praxis och för djurens välbefinnande är det viktigt att undvika onödig användning av djur, och minimera all testning som sannolikt framkallar allvarlig respons hos djuren. All information som är relevant för ett ämnes förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation bör utvärderas innan *in vivo*-testning övervägs. Det finns eventuellt redan tillräckliga bevis för att klassificera ett testämne med avseende på dess förmåga att framkalla ögonkorrossion eller ögonirritation, utan behov av testning på laboratoriedjur. Man kan därför, genom att använda en *weight-of-the-evidence*-analys och följa strategin för stegvis testning, minimera behovet av *in vivo*-testning, särskilt i fråga om ämnen som sannolikt framkallar allvarliga reaktioner.

Det rekommenderas att en *weight-of-the-evidence*-analys används för att utvärdera existerande information om olika ämnens förmåga att framkalla ögonirritation eller ögonkorrosion. Därefter kan man avgöra om det behövs ytterligare undersökningar, andra än *in vivo*-test, som hjälp för att karakterisera sådan egenskap. I fall där ytterligare undersökningar behövs, rekommenderas ett förfarande enligt strategin för stegvis testning för att få fram relevanta försöksdata. För ämnen som inte har testats tidigare bör strategin för stegvis testning följas för att få fram de data som behövs för att utvärdera ämnets förmåga att framkalla ögonkorrosion eller ögonirritation. Testningsstrategin som beskrivs i denna bilaga har utarbetats inom ramen för en OECD-arbetsgrupp (1). Strategin bekräftades och utvidgades senare i *Harmonised Integrated Hazard Clas-sification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, i den form systemet godkändes av vid det 28:e gemensamma mötet för kemikaliekommittén och kemikaliearbetsgruppen (*Chemicals Committee* och *Working Party on Chemicals*), i november 1998 (2).

Även om denna strategi för stegvis testning inte ingår som en del av testmetod B.5, är den ett uttryck för de rekommenderade principerna för bestämning av ett ämnes förmåga att framkalla ögonirritation eller ögonkorrosion. Dessa principer representerar både bästa praxis och etiska riktlinjer för *in vivo*-testning med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Testmetoden är en vägledning för utförandet av test *in vivo*, och utgör en sammanfattning av de faktorer som bör beaktas innan ett sådant test övervägs. Inom ramen för strategin för stegvis testning används *weight-of-the-evidence*-analyser för utvärderingen av existerande data om olika testämnens egenskaper med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Samtidigt fås tillgång till en stegvis metod för generering av relevanta data om ämnen för vilka det krävs ytterligare testning eller för ämnen som ännu inte har testats. Enligt strategin utför man först validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-tester, och därefter görs testning enligt testmetod B.4 (hudirritation/hudkorrosion) under specifika omständigheter (3) (4).

BESKRIVNING AV DEN STEGVISA TESTNINGSSTRATEGIN

Innan testning utförs som en del av förfarandet enligt strategin för stegvis testning (se figuren), bör all tillgänglig information utvärderas i syfte att fastställa behovet av *in vivo*-test på ögonen. Trots att signifikant information kan fås genom utvärdering av enskilda parametrar (till exempel extrema pH-värden), bör den tillgängliga informationen utvärderas som en helhet. Alla relevanta data om det berörda ämnets verkningar och strukturellt närbesläktade ämnen bör utvärderas när man fattar ett beslut grundat på en *weight-of-the-evidence*-analys, och en motivering för beslutet bör anges. Huvudvikten bör läggas vid existerande data om ämnet (både i fråga om människor och djur). Därefter följer resultatet av testning *in vitro* eller *ex vivo*. Testning *in vivo* av korrosiva ämnen bör undvikas alltid när det är möjligt. Till de faktorer som bör beaktas inom ramen för testningsstrategin hör följande:

▼B

Utvärdering av existerande data rörande människor och djur (steg 1). Existerande data rörande människor, till exempel kliniska undersökningar eller undersökningar inom arbetslivet och fallstudier och/eller data från undersökningar med avseende på ögon bör beaktas först, eftersom de ger tillgång till information som direkt hör samman med verkningarna på ögonen. Därefter bör tillgängliga data från human- och/eller djurstudier rörande hudkorrosion/hudirritation utvärderas. Ämnen som veterligen har förmåga att framkalla korrosion eller allvarlig irritation i ögat bör inte tillföras i djurögon. Samma gäller för ämnen som har korrosiva eller irriterande egenskaper för huden, eftersom sådana ämnen kan anses vara korrosiva och/eller irriterande även för ögonen. Om resultaten från tidigare utförda okulära undersökningar visar att ett ämne inte är korrosivt eller irriterande, bör det inte heller testas på ögonen *in vivo*.

Analys av strukturaktivitetssamband (SAR) (steg 2). I mån av tillgänglighet bör resultaten från testning av strukturellt närbesläktade ämnen beaktas. Om det finns tillgång till data rörande människa och/eller djur för strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, och dessa data är tillräckliga för att indikera att dessa ämnen har förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation, kan man anta att testämnet kommer att framkalla samma respons. I sådana fall behöver ämnet eventuellt inte testas. Negativa data från undersökningar med strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen utgör inte, inom ramen för strategin för stegvis testning, tillräckliga bevis på att ett ämne skulle sakna korrosiva eller irriterande egenskaper. Validerade och godkända metoder som bygger på strukturellt aktivitetssamband bör användas för att identifiera förmågan att framkalla korrosion och irritation på huden och ögonen.

Fysikalkemiska egenskaper och kemisk reaktivitet (steg 3). Ämnen med extrema pH-värden, till exempel ≤2,0 eller ≥11,5 kan ha kraftiga lokala verkningar. Om ett extremt pH-värde används som grund för att konstatera att ett ämne är korrosivt eller irriterande för ögonen, behöver eventuellt också ämnets syra/bas-reserv (buffertkapacitet) beaktas (5) (6). Om buffertkapaciteten tyder på att ämnet eventuellt inte är korrosivt för ögonen, bör ytterligare testning utföras för att bekräfta detta. Härvid bör man helst använda validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-tester (se steg 5 och 6).

Beaktande av annan existerande information (steg 4). På detta steg bör man beakta all tillgänglig information om systemisk toxicitet när ett ämne tillförs via huden. Även testämnets akuta toxicitet för huden bör beaktas. Om testämnet har konstaterats vara mycket toxiskt när det tillförs via huden, behöver det eventuellt inte testas på ögonen. Även om det inte nödvändigt finns ett förhållande mellan akut toxicitet för huden och förmåga att framkalla ögonirritation/ögonkorrosion, kan man anta att ett ämne som har hög toxicitet vid tillförsel via huden, även har hög toxicitet när ämnet tillförs i ögonen. Sådana data kan även beaktas mellan steg 2 och steg 3.

Resultat från in vitro- *eller* ex vivo-*test (steg 5 och 6).* Ämnen som har visat sig framkalla korrosion eller allvarlig irritation i ett *in vitro*- eller *ex vivo*-test (7) (8) som har validerats och godkänts specifikt för utvärdering av korrosion eller irritation på huden eller ögonen, behöver inte testas på djur. Man kan anta att sådana ämnen framkallar liknande allvarliga verkningar *in vivo*. Om det inte finns tillgång till resultat från validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-test, ska man hoppa över stegen 5 och 6 och fortsätta förfarandet direkt från steg 7.

Utvärdering in vivo *av ämnets irriterande eller korrosiva egenskaper för huden (steg 7).* Om det på grundval av data från de undersökningar som uppräknas ovan inte finns tillräckliga bevis för en avgörande *weight-of-the-evidence*-analys av ett ämnes förmåga att framkalla ögonirritation/ögonkorrosion, bör förmågan att framkalla hudirritation/hudkorrosion *in vivo* utvärderas först, med användning av testmetod B.4 (4) och dess bilaga (9). Om ämnet veterligen framkallar korrosion eller allvarlig hudirritation, bör det betraktas som ett korrosivt ögonirriterande ämne, utom om det finns någon annan information som stöd för en alternativ slutsats. Då behöver ögontestning *in vivo* inte utföras. Om ämnet inte är korrosivt eller allvarligt irriterande för huden, bör ögontest *in vivo* utföras.

▼B

In vivo-test på kanin (steg 8 och 9): *In vivo*-ögontest ska börja med ett inledande test på ett enskilt djur. Om resultatet av ett sådant test tyder på att ämnet framkallar korrosion eller allvarlig irritation i ögat, bör ingen ytterligare testning utföras. Om testresultatet tyder på att ämnet inte framkallar korrosion eller allvarlig irritation, utförs ett bekräftande test med ytterligare två djur.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1996), OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, Solna, Sverige, den 22–24 januari 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).
2. OECD (1998), Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, november 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).
3. A.P. Worth och J.H. Fentem (1999), A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies, ATLA, 27, 161–177.
4. Testmetod B.4. Akut toxicitet: Hudirritation/hudkorrosion.
5. Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19–26.
6. Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.
7. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. och Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.
8. Testmetod B.40 Hudkorrosion.
9. Bilaga till testmetod B.4: En strategi för stegvis testning med avseende på hudirritation och hudkorrosion.

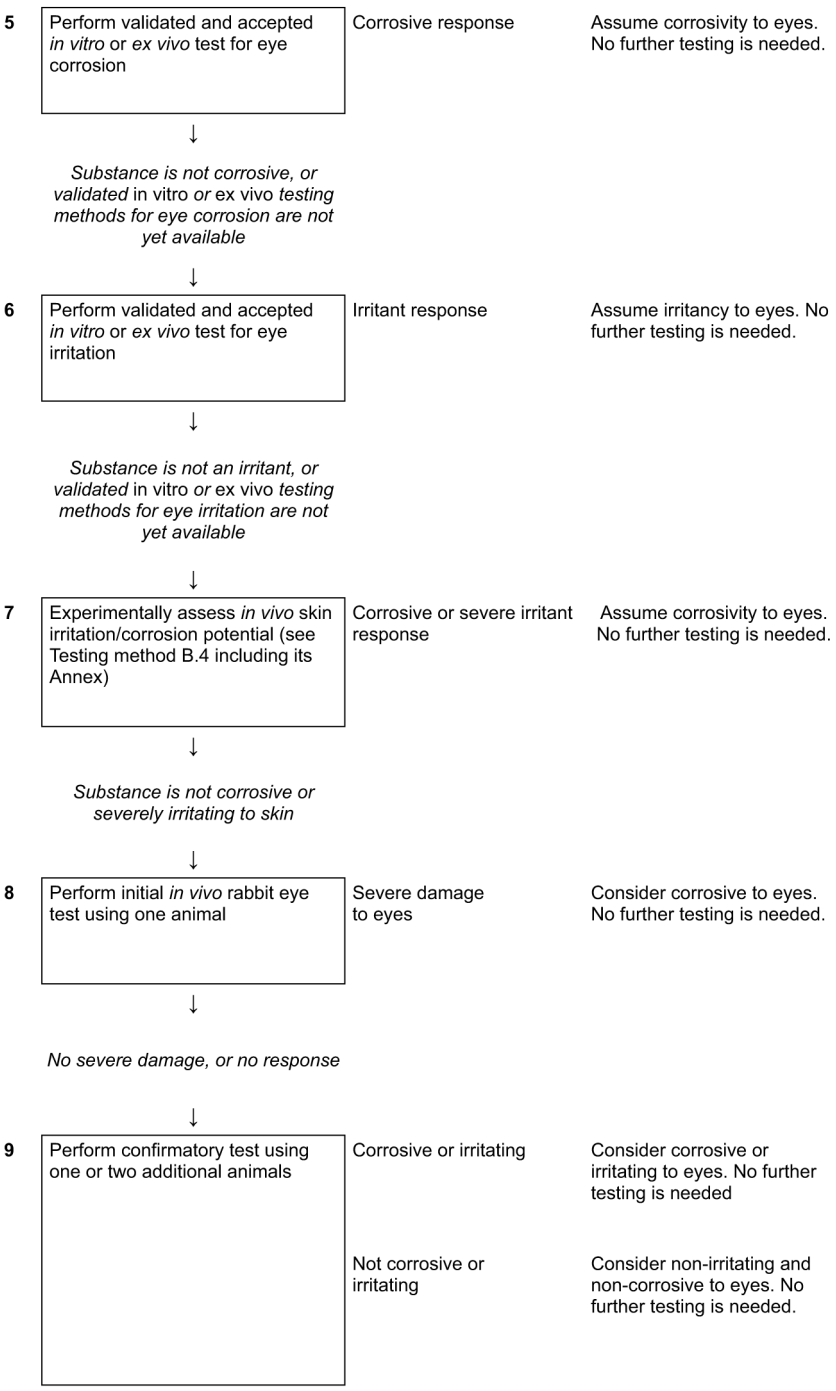
▼B

Schema

TESTNINGS- OCH UTVÄRDERINGSSTRATEGI FÖR ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION

	Aktivitet	Fynd	Slutsats
1.	Existerande human- eller djurdata som påvisar verkningar på ögonen.	Allvarlig skada på ögonen.	Apikal end point, bör anses vara korrosivt för ögonen. Ingen testning behövs.
		Irriterande för ögonen.	Apikal end point, bör anses vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
		Ej korrosivt eller irriterande för ögonen.	Apikal end point, bör anses vara icke-korrosivt och icke-irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
	Existerande human- eller djurdata som påvisar korrosiva verkningar på huden.	Korrosivt för huden.	Bör antas vara korrosivt för ögonen. Ingen testning behövs.
	Existerande human- eller djurdata som påvisar allvarlig irritation på huden.	Framkallar allvarlig korrosion på huden.	Bör antas vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
	↓		
	Ingen information tillgänglig, eller den tillgänglig information är inte avgörande.		
	↓		
2.	Undersök strukturaktivitetssamband för ögonkorrosion/ögonirritation.	Allvarlig skada på ögonen kan förutspås.	Bör antas vara korrosivt för ögonen. Ingen testning behövs.
		Irritation på ögonen kan förutspås.	Bör antas vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
	Undersök strukturaktivitetssamband för hudkorrosion.	Korrosivitet för huden kan förutspås.	Bör antas vara korrosivt för ögonen. Ingen testning behövs.
	↓		
	Inga verkningar kan förutspås eller det som kan förutspås är inte avgörande eller är negativt.		
	↓		
3.	Mätning av pH (buffertkapacitet, om relevant).	pH ≤ 2 eller ≥ 11,5 (med hög buffertkapacitet, om relevant).	Bör antas vara korrosivt för ögonen. Ingen testning behövs.
	↓		
	2< pH < 11,5 eller pH ≤ 2,0 eller ≥ 11,5 med låg buffertkapacitet, om relevant.		
	↓		
4.	Utvärdera systemisk toxicitet vid tillförsel via huden.	Mycket toxisk vid koncentrationer som skulle används vid test på ögonen.	Ämnet är för toxiskt för att testas. Ingen testning behövs.
	↓		
	Sådan information är inte tillgänglig eller ämnet har inte hög toxicitet.		
	↓		

▼B


5
Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for eye corrosion
Corrosive response
Assume corrosivity to eyes. No further testing is needed.
Substance is not corrosive, or validated in vitro *or* ex vivo *testing methods for eye corrosion are not yet available*
6
Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for eye irritation
Irritant response
Assume irritancy to eyes. No further testing is needed.
Substance is not an irritant, or validated in vitro *or* ex vivo *testing methods for eye irritation are not yet available*
7
Experimentally assess *in vivo* skin irritation/corrosion potential (see Testing method B.4 including its Annex)
Corrosive or severe irritant response
Assume corrosivity to eyes. No further testing is needed.
Substance is not corrosive or severely irritating to skin
8
Perform initial *in vivo* rabbit eye test using one animal
Severe damage to eyes
Consider corrosive to eyes. No further testing is needed.
No severe damage, or no response
9
Perform confirmatory test using one or two additional animals
Corrosive or irritating
Consider corrosive or irritating to eyes. No further testing is needed
Not corrosive or irritating
Consider non-irritating and non-corrosive to eyes. No further testing is needed.

▼B

B.6 **HUDSENSIBILISERING**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Kommentarer:

Testers noggrannhet och förmåga att spåra sådana ämnen som kan orsaka hudallergi hos människan anses betydelsefulla i ett klassificeringssystem för toxicitet som avser folkhälsan.

Det finns ingen enstaka testmetod som på ett lämpligt sätt kan identifiera samtliga de ämnen som kan vara sensibiliserande och som är relevant för alla ämnen.

Faktorer som ett ämnes fysikaliska egenskaper, inbegripet dess förmåga att penetrera huden, ska beaktas vid valet av test.

Två typer av test på marsvin har utvecklats: Ett test av adjuvanstyp i vilket man åstadkommer ett allergiskt tillstånd genom att upplösa eller suspendera (blanda) testsubstansen i Freunds Complete Adjuvant (FCA), och test av icke-adjuvanstyp.

Adjuvanstester är sannolikt mer precisa vad gäller att förutsäga ämnets eventuella kapacitet att orsaka hudsensibilisering hos människan än metoder där inte Freunds Complete Adjuvant används och de är därför att föredra.

Maximeringstest på marsvin (GPMT) används ofta som adjuvanstest. Trots att flera andra metoder kan användas för att upptäcka ett ämnes potentiella förmåga att orsaka hudsensibilisering anses maximeringsförsöket på marsvin vara den bästa metoden.

Icke-adjuvanstester (av vilka Buehler-testet föredras) med många kemiska klasser anses mindre känsliga.

I vissa fall anses det finnas goda skäl att välja Buehler-testet, som innebär lokal applicering i stället för den intradermala injektion som används i GPMT. Då Buehler-testet används ska detta vara vetenskapligt välmotiverat.

Här beskrivs GPMT och Buehler-testet. Andra metoder får användas, förutsatt att de är väldokumenterade och vetenskapligt motiverade.

Om en erkänd kontrollundersökning ger positiva resultat, kan testämnet betecknas som potentiellt sensibiliserande, och det behöver inte vara nödvändigt att genomföra ytterligare test på marsvin. Om en sådan kontrollundersökning dock ger negativt resultat ska ett test på marsvin genomföras enligt det förfarande som beskrivs i denna testmetod.

Se även Allmän inledning, del B.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Hudsensibilisering (allergisk kontaktdermatit): En immunologiskt utlöst kutan reaktion på ett ämne. Hos människan kan reaktionerna kännetecknas av klåda, hudrodnad, ödem, blemmor och blåsor eller en kombination av dessa. Andra arter kan reagera annorlunda så att endast hudrodnad och ödem observeras.

Induktionsexponering: En försöksexponering av ett försöksobjekt för en testsubstans i syfte att inducera hypersensibilitet.

Induktionsperiod: En period på minst en vecka som följer efter induktionsexponering då hypersensibilitet kan utvecklas.

Provokationsexponering: En försöksexponering av ett tidigare behandlat objekt för att testa ämnet efter en induktionsperiod i syfte att bestämma om objektet reagerar med hypersensibilitet.

1.3 REFERENSÄMNEN

Den tillämpade försöksmetodens noggrannhet och tillförlitlighet bör utvärderas var sjätte månad genom användning av ämnen som är kända för att ha milda till moderata hudsensibiliseringsegenskaper.

I ett korrekt utfört test bör en reaktion på minst 30 % i adjuvanstest och minst 15 % i icke-adjuvanstest förväntas för milda/moderata sensibiliserande ämnen.

Följande ämnen är att föredra:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-namn	Vanliga namn
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldehyd	α-hexylcinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzotiasol-2-tiol (merkapto benzotiasol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	norkain

Då det är motiverat på grund av vissa omständigheter får andra kontrollämnen som uppfyller ovan angivna kriterier användas.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Försöksdjuren exponeras inledningsvis för testsubstansen genom intradermala injektioner och/eller epidermal applicering (induktionsexponering). Efter en paus på 10–14 dagar (induktionsperiod) under vilken en immunreaktion kan utvecklas exponeras djuren för en provokationsdos. Omfattningen och graden av hudens reaktion på provokationsexponeringen hos försöksdjuren jämförs med den som uppträder hos kontrollgruppens djur som under induktionsexponeringen får skenbehandling och därefter utsätts för provokationsexponering.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODERNA

Om det anses nödvändigt att avlägsna testsubstansen görs det med vatten eller en lämplig lösning utan att befintlig reaktion eller hudens tillstånd ändras.

▼B

1.5.1 *Maximeringstest på marsvin (GPMT)*

1.5.1.1 Förberedelser

Friska unga vuxna albinomarsvin acklimatiseras till laboratoriemiljö under minst fem dagar före försöket. Före försöket väljs djuren ut slumpvis och fördelas i behandlingsgrupper. Pälsen avlägsnas genom klippning, rakning eller eventuellt kemiskt, beroende på vilken testmetod som används. Försiktighet ska iakttas för att inte skada huden. Djuren vägs innan försöket påbörjas och då det avslutas.

1.5.1.2 Försöksförhållanden

1.5.1.2.1 Försöksdjur

Vanliga stammar av albinomarsvin används.

1.5.1.2.2 Antal och kön

Hannar och/eller honor kan användas. Om honor används ska de inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Minst 10 djur används i behandlingsgruppen och minst 5 djur i kontrollgruppen. Om färre än 20 testdjur och 10 kontrolldjur har använts och det inte är möjligt att konstatera att testsubstansen är hudsensibiliserande, rekommenderas starkt tester med ytterligare djur upp till totalt 20 testdjur och 10 kontrolldjur.

1.5.1.2.3 Dosnivåer

Den testsubstanskoncentration som används vid varje induktionsexponering ska tolereras väl av hela organismen och vara den högsta nivå som orsakar mild till måttlig hudirritation. Den koncentration som används vid provokationsexponering ska vara den högsta icke-irriterande dosen. Om nödvändigt, kan de lämpliga koncentrationerna fastställas med hjälp av en pilotundersökning med två eller tre djur. För detta ändamål bör användningen av FCA-behandlade djur beaktas.

1.5.1.3 Förfarande

1.5.1.3.1 Induktion

Dag 0-behandlingsgrupp

Tre par intradermala injektioner på 0,1 ml ges i skuldertrakten, där pälsen avlägsnats, så att varje par injektioner görs på var sida om mittlinjen.

Injektion l: en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Injektion 2: Testsubstansen i lämplig vehikel i vald koncentration.

Injektion 3: Testsubstansen i vald koncentration i en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

I injektion 3 löses de vattenlösliga ämnena i vattenfasen innan de blandas med FCA. Fettlösliga eller olösliga ämnen suspenderas (blandas) i FCA innan de blandas med vattenfasen. Testsubstansens slutliga koncentration ska vara densamma som den i injektion 2.

▼B

Injektionerna 1 och 2 ges med ett kort intervall och närmast huvudet medan injektion 3 ges i testområdets nedersta del.

Dag 0-kontrollgrupp

Tre par intradermala injektioner på 0,1 ml ges i samma område som på djuren i behandlingsgruppen.

Injektion l: en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Injektion 2: Outspädd vehikel.

Injektion 3: En 50 % blandning av vehikeln i en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Dag 5–7-behandlings- och kontrollgrupp

Om ämnet inte är hudirriterande behandlas testområdet, efter klippning eller rakning, ungefär 24 timmar före lokal applicering med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaselin i syfte att orsaka lokal irritation.

Dag 6–8-behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas på nytt från testområdet. Testsubstansen i lämplig vehikel fördelas på ett filterpapper (2 × 4 cm), appliceras på testområdet och hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 48 timmar. Valet av vehikel ska vara välmotiverat. Fasta ämnen pulveriseras och införlivas i en lämplig vehikel. Vätskor kan om det är lämpligt appliceras outspädda.

Dag 6–8-kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas på nytt från testområdet. Vehikeln appliceras på liknande sätt på testområdet och hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 48 timmar.

1.5.1.3.2 Provokation

Dag 20–22-behandlings- och kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från behandlings- och kontrolldjurens flanker. En kompress eller kammare innehållande testsubstansen appliceras på djurens ena flank och, om relevant, en kompress eller kammare innehållande enbart vehikel på den andra flanken. Kompresserna hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 24 timmar.

1.5.1.3.3 Observation och gradering: Behandlings- och kontrollgrupp

— Cirka 21 timmar efter det att kompressen avlägsnats rengörs det provocerade området och klipps eller rakas och vid behov avlägsnas pälsen med hårborttagningsmedel.

— Cirka tre timmar senare (ungefär 48 timmar från det att provokationsexponeringen påbörjats) observeras hudreaktionen och noteras i enlighet med graderingen i tillägget.

— Cirka 24 timmar efter föregående observation görs en andra observation (72 timmar) och resultaten noteras.

Blindläsning av test- och kontrolldjur rekommenderas.

Om det är nödvändigt för att klargöra resultaten från den första provokationen bör en andra provokation (dvs. en omprovokation) övervägas en vecka efter den första, i tillämpliga fall med en ny kontrollgrupp. En omprovokation får också göras på den ursprungliga kontrollgruppen.

▼B

Alla hudreaktioner och ovanliga resultat, inbegripet systematiska reaktioner, som orsakas av induktions- och provokationsförfarandena bör observeras och noteras i enlighet med graderingsskalan enligt Magnusson/Kligman (se tillägget), övriga förfaranden t.ex. histopatologisk undersökning eller mätning av hudvecks tjocklek, bör utföras för att klargöra tveksamma reaktioner.

1.5.2 *Buehler-test*

1.5.2.1 F ö r b e r e d e l s e r

Friska unga vuxna albinomarsvins acklimatiseras till laboratoriemiljön under minst fem dagar före försöket. Före försöket väljs djuren ut slumpvis och fördelas i behandlingsgrupper. Pälsen avlägsnas genom klippning, rakning eller eventuellt kemiskt, beroende på den testmetod som används. Försiktighet ska iakttas för att inte skada huden. Djuren vägs innan försöket påbörjas och då det avslutas.

1.5.2.2 F ö r s ö k s f ö r h å l l a n d e n

1.5.2.2.1 Försöksdjur

Vanliga laboratoriestammar av albinomarsvin används.

1.5.2.2.2 Antal och kön

Hannar och/eller honor kan användas. Om honor används ska de inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Minst 20 djur används i behandlingsgruppen och minst 10 djur i kontrollgruppen.

1.5.2.2.3 Dosnivåer

Testsubstansens koncentration anpassas till den högsta nivå som djuren har tolererat väl i varje induktionsstadium och ska vara den högsta nivå som orsakar mild till uthärdlig hudirritation. Den koncentration som används vid provokationsexponering ska vara den högsta icke-irriterade dosen. Om nödvändigt, kan de lämpliga koncentrationerna fastställas med hjälp av en pilotundersökning med två eller tre djur.

I fråga om vattenlösliga testmaterial är det lämpligt att använda vatten eller en icke-irriterande lösning av anjon-ytaktiva ämnen som vehikel. I fråga om övriga testmaterial är 80 % etanol/vatten att föredra för induktion och aceton för provokation.

1.5.2.3 F ö r f a r a n d e

1.5.2.3.1 Induktion

Dag 0-behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas från ena flanken (klipps).

Testkompressystemet dränks in med testsubstansen i lämplig vehikel (valet av vehikel ska vara välmotiverat; om lämpligt får testsubstanser i vätskeform appliceras outspädda). Testkompressystemet appliceras på testområdet och hålls i kontakt med huden med ocklusivkompress eller -kammare och lämpligt förband under sex timmar.

▼B

Testkompressystemet ska vara ocklusivt. En bomullskompress är lämplig och kan vara fyrkantig eller rund och cirka 4–6 cm^2. Fasthållning medelst lämpligt förband är lämpligt för att säkerställa ocklusion. Om omslag används kan ytterligare exponering krävas.

Dag 0-kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från ena flanken (klipps). Endast vehikeln appliceras på liknande sätt som för behandlingsgruppen. Testkompressystemet hålls i kontakt med huden genom ocklusivkompress eller -kammare och lämpligt förband under sex timmar. Om det kan visas att en simulerad kontrollgrupp inte krävs kan en oexponerad kontrollgrupp användas.

Dag 6–8- och 13–15-behandlings- och kontrollgrupp

Samma applicering som dag 0 utförs på samma testområde (vid behov efter avlägsnande av päls) på samma flank dag 6–8 och åter dag 13–15.

1.5.2.3.2 Provokation

Dag 27–29- behandlings- och kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från den obehandlade flanken på behandlings- och kontrolldjuren (klippning). En ocklusivkompress eller -kammare innehållande lämplig mängd testsubstans appliceras vid maximal icke-irriterande koncentration, på den bakre obehandlade flanken på behandlings- och kontrolldjuren.

I relevanta fall appliceras också en ocklusivkompress eller -kammare på den främre obehandlade flanken på både behandlings- och kontrolldjur. Kompresserna eller kamrarna hålls i kontakt med huden genom lämpligt förband under sex timmar.

1.5.2.3.3 Observation och gradering

— Cirka 21 timmar efter det att kompressen tagits bort avlägsnas pälsen från provokationsområdet.

— Cirka tre timmar senare (ungefär 30 timmar efter det att provokationskompressen applicerades) observeras hudreaktionerna och noteras i enlighet med graderingen i tillägget.

— Cirka 24 timmar efter 30-timmarsobservationen (ungefär 54 timmar efter det att provokationskompressen applicerades) observeras hudreaktionerna på nytt och noteras.

Blindläsning av test och kontrolldjur rekommenderas.

Om det är nödvändigt för att klargöra resultaten från den första provokationen bör en andra provokation (dvs. en förnyad provokation) övervägas en vecka efter den första, i tillämpliga fall med en ny kontrollgrupp. En förnyad provokation får också göras på den ursprungliga kontrollgruppen.

▼B

Alla hudreaktioner och ovanliga resultat, inbegripet systemiska reaktioner, som följer av induktions- och provokationsförfarandena bör observeras och noteras i enlighet med graderingsskalan enligt Magnusson/Kligman (se tillägget), övriga förfaranden, t.ex. histopatologisk undersökning eller mätning av hudvecks tjocklek, får utföras för att klargöra tveksamma reaktioner.

2. **DATA (GPMT och Buehler-test)**

Uppgifterna bör sammanfattas i tabellform som i fråga om varje djur visar hudreaktioner vid varje observation.

3. **RAPPORTERING (GPMT och Buehler-test)**

Om ett screeningsförsök utförs före marsvinsförsöket ska en beskrivning av eller hänvisning till försöket (t.ex. Local Lymph Node Essay (LLNA), Mouse Ear Swelling Test (MEST), inbegripet uppgifter om förfarandet, lämnas tillsammans med de resultat som erhållits genom försöket och referensämnena.

Försöksrapport (GPMT och Buehler-test)

Försöksrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur:

— Art/stam för använda marsvin.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Härkomst, miljöbetingelser, foder etc.

— Djurens individuella vikt vid försökets inledning.

Försöksförhållanden:

— Metod för förberedelse av kompressområde.

— Uppgift om använt kompressmaterial och kompressmetod.

— Resultat av förundersökning med slutsatser om de induktions- och provokationskoncentrationer som ska användas i försöket.

— Uppgift om förberedelse av testsubstans, applicering och borttagning.

— Motivering för val av vehikel.

— Vehikel- och testsubstanskoncentrationer som används vid induktions- och provokationsexponering och den totala mängd ämne som appliceras vid induktion och provokation.

Resultat:

— En sammanfattning av resultaten av den senaste kontrollen av känslighet och tillförlitlighet (se 1.3), inbegripet uppgift om ämne, koncentration och använd vehikel.

▼B

— Resultatet för varje djur inklusive graderingssystem.

— Redogörelse för arten och graden av observerade effekter.

— Eventuella histopatologiska resultat.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

Denna metod motsvarar OECD TG 406.

▼B

Tillägg

TABELL

Graderingsskala enligt Magnusson/Kligman för utvärdering av reaktioner på provokationskompresstest

0 = ingen synbar förändring

1 = lätt eller måttlig hudrodnad

2 = måttlig till stark hudrodnad

3 = intensiv hudrodnad och svullnad

▼M4

B.7 28-DAGARS TOXICITETSSTUDIE MED UPPREPAD ORAL DOSERING PÅ GNAGARE

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 407 (2008). Den ursprungliga testriktlinjen 407 antogs 19.81.1995 antogs en reviderad version för att erhålla ytterligare information från djuret som används i studien, i synnerhet om neurotoxicitet och immunotoxicitet.

2. 1998 inledde OECD en högprioriterad verksamhet för att se över befintliga testriktlinjer och utveckla nya riktlinjer för undersökning och testning av potentiellt endokrinstörande ämnen (8). Ett inslag i verksamheten var att uppdatera befintlig OECD-riktlinje för ”28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare” (TG407) med parametrar lämpliga för att upptäcka endokrin aktivitet för testkemikalier. Denna procedur genomgick ett omfattande internationellt program för att testa relevansen och tillämpbarheten av de kompletterande parametrarna, utförandet av dessa parametrar för kemikalier med (anti) östrogen-, (anti) androgen- och (anti) köldkörtelaktivitet och reproducerbarhet inom och mellan laboratorier samt de nya parametrarnas interferens med de som krävdes i den tidigare TG 407. Den stora mängden data som därvid erhölls har sammanställts och utvärderats i detalj i en omfattande OECD-rapport (9). Den här uppdaterade testmetoden B.7 (som är likvärdig med TG 407) är resultatet av de erfarenheter och resultat som uppnåddes under det internationella testprogrammet. Med den här testmetoden kan vissa endokrina indirekta verkningar sättas i samband med andra toxikologiska verkningar.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

3. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxiska egenskaperna hos en kemikalie kan bestämningen av toxicitet med upprepad oral dosering genomföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits genom testning av akut toxicitet. Avsikten med den här testmetoden är att undersöka effekterna på ett mycket brett spektrum av potentiella måltavlor för toxicitet. Den ger information om eventuella hälsorisker som kan uppstå vid upprepad exponering under en relativt begränsad tidsperiod, inklusive effekterna på nervsystemet, immunsystemet och det endokrina systemet. Vad beträffar dessa speciella endpoints, bör den identifiera kemikalier med neurotoxisk verkan, vilket kan motivera mer ingående undersökningar av denna aspekt, samt kemikalier som påverkar sköldkörtelns fysiologi. Den kan också tillhandahålla data om kemikalier som påverkar de manliga och/eller kvinnliga könsorganen hos unga vuxna djur samt ge indikationer på immunologiska effekter.

4. Resultaten från denna testmetod B.7 bör användas för faroidentifiering och riskbedömning. Resultaten som erhölls genom de endokrinrelaterade parametrarna bör sättas i samband med ”OECD:s ramverk för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier” (11). Metoden innefattar den grundläggande toxicitetsstudien med upprepad dosering som kan användas för kemikalier för vilka en 90-dagarsstudie inte är motiverad (t.ex. när produktionsvolymen inte överskrider vissa gränser) eller som en inledning till en långtidsstudie. Varaktigheten för exponeringen bör vara 28 dagar.

▼M4

5. Det internationella programmet som genomfördes om validering av parametrar lämpliga för upptäckt av en testkemikalies eventuella endokrina aktivitet visade att kvaliteten på datan som erhölls genom denna testmetod B.7 beror mycket på testlaboratoriets erfarenheter. Detta hänför sig särskilt till histopatologisk bestämning av cykliska förändringar i de kvinnliga fortplantningsorganen och viktbestämning av de små hormonberoende organen som är svåra att dissekera. Vägledning för histopatologi har utvecklats (19). Den finns på OECD:s offentliga webbplats om riktlinjer för testning. Den är avsedd för att hjälpa patologer i deras undersökningar och bidra till att öka analysens känslighet. En mängd olika parametrar befanns vara indikativa för endokrinrelaterad toxicitet och har införlivats i testmetoden. Parametrar för vilka det fanns tillräckliga data tillgängliga för att visa nyttan eller vilka visade svaga bevis i valideringsprogrammet för deras förmåga att detektera endokrinstörande ämnen föreslås som valfria endpoints (se tillägg 2).

6. På grundval av datan som genereras i valideringsprocessen, måste det framhållas att känsligheten hos denna analys inte är tillräcklig för att identifiera alla ämnen med (anti) androgena eller (anti) östrogena verkningssätt (9). Testmetoden genomförs inte i ett livsskede som är mest känslig för endokrina störningar. Dock har testmetoden under valideringsprocessen identifierat ämnen som svagt eller starkt påverkar sköldkörtelns funktion, och starka eller måttliga endokrina aktiva ämnen som verkar genom östrogena eller androgena receptorer, men som i de flesta fall misslyckades med att identifiera endokrina aktiva ämnen som svagt påverkar östrogena eller androgena receptorer. Därför kan den inte beskrivas som en screeninganalys av endokrin aktivitet.

7. Följaktligen kan avsaknaden av verkningar relaterade till dessa verkningsmekanismer inte tas som bevis på bristen av verkningar på det endokrina systemet. Beträffande indirekta endokrina verkningar bör därför inte ämnets karakterisering baseras enbart på resultaten från denna testmetod, men bör användas i en sammanvägd bedömning som omfattar alla befintliga data om en kemikalie för att karakterisera eventuell endokrin aktivitet. Av denna anledning bör regulatoriskt beslutsfattande om endokrin aktivitet (ämneskarakterisering) vara en bred strategi, inte enbart beroende av resultaten från tillämpningen av denna testmetod.

8. Det är erkänt att alla djurbaserade förfaranden kommer att överensstämma med lokala normer för djurvård; beskrivningarna av vård och behandling som anges nedan är miniminormer för prestanda som kommer att ersättas av strängare lokala bestämmelser. Ytterligare vägledning om human behandling av djur finns i OECD (14).

9. Definitioner som används finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Testkemikalien tillförs oralt dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, en dosnivå per grupp för en period på 28 dagar. Under administreringsperioden observeras djuren varje dag noggrant för tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras. En 28-dagarsstudie ger information om effekterna av upprepad oral exponering och kan indikera behovet

▼M4

av ytterligare långtidsstudier. Den kan också ge information om valet av koncentrationer för långtidsstudier. Datan som härrör från användningen av testmetoden ska göra det möjligt att karakterisera teskemikaliens toxicitet som en indikation på förhållandet dos-respons och bestämningen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

11. Rekommenderad gnagare är råtta, även om andra gnagare kan användas. En utförlig motivering ska ges om de parametrar som anges i denna testmetod B.7 undersöks i andra gnagare. Även om det är biologiskt sannolikt att andra arter bör svara på gifter på liknande sätt som råttan, kan användningen av mindre arter resultera i ökad variabilitet på grund av tekniska utmaningar att dissekera mindre organ. I det internationella valideringsprogrammet för att detektera endokrinstörande ämnen, var råttan den enda art som användes. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. Doseringen bör inledas snarast möjligt efter avvänjningen, och under alla förhållanden innan djuren är nio veckor gamla. Vid inledningen av studien bör viktskillnaden hos de använda djuren vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för varje kön. När en upprepad oral dos utförs som inledning till en långtidsstudie, är det att föredra att djur från samma stam och ursprung används för båda studierna.

Inhysning och utfodring

12. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, bör målet vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med ljusperioden 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod. Djuren bör vara inrymda i små grupper av samma kön. Djuren kan inhysas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Vid grupplacering i bur bör inte fler än fem djur inhysas per bur.

13. Fodret bör regelbundet analyseras beträffande föroreningar. Ett prov av fodret bör sparas tills rapporten är slutförd.

Förberedelse av djuren

14. Friska unga vuxna djur väljs slumpvis ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Därefter identifieras djuren individuellt och får acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före behandlingsstudien.

Beredning av doser

15. Testkemikalien tillförs genom sondmatning eller via fodret eller dricksvattnet. Metoden för oral tillförsel är beroende av syftet med studien och de fysikaliska/kemiska/toxikologisk-kinetiska egenskaperna hos testkemikalien.

▼M4

16. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/suspension i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För vehiklar annat än vatten måste de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

17. Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) bör användas för varje doseringsnivå. Om interimistisk avlivning planeras bör antalet djur ökas med det antal som man planerar att avliva innan studien slutförs. Man bör överväga en extra satellitgrupp på tio djur (fem per kön) i kontroll- och i toppdosgruppen för observation beträffande reversibilitet, persistens eller fördröjda toxiska verkningar under minst 14 dagar efter behandlingen.

Dosering

18. I allmänhet bör minst tre testgrupper och en kontrollgrupp användas, men ett toleranstest kan utföras om man efter utvärderingen av andra data inte förväntar sig några verkningar efter en dos på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga kan en pilotstudie (djur av samma stam och ursprung) utföras för att underlätta bestämningen av de doser som ska användas. Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som testgruppen. Om en vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används.

19. Nivåerna på doserna bör väljas med hänsyn till eventuell toxicitetsdata och (toxikologisk-) kinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller liknande kemikalier. Den högsta nivån på dosen bör väljas i syfte att inducera toxiska verkningar, men inte leda till döden eller orsaka svåra lidanden. Därefter bör en fallande nivå på doserna väljas i syfte att påvisa en dosrelaterad respons och ingen påvisbar skadlig effekt vid den lägsta dosnivån (NOAEL). Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna, och att lägga till en fjärde testgrupp är att föredra framför att använda mycket stora intervall (t.ex. mer än faktor 10) mellan doseringarna.

20. Om allmän toxicitet observeras (t.ex. minskad kroppsvikt, verkningar på lever, hjärta eller njurar) eller andra förändringar som har observerats som kanske inte är toxiska reaktioner (t.ex. nedsatt födointag, leverförstoring), ska observerade effekter på immunförsvaret, neurologiska eller endokrint känsliga endpoints bör tolkas med försiktighet.

Toleranstest

21. Om ett test vid en dosnivå på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag eller, vid tillförsel via foder eller dricksvatten, en motsvarande procentandel i fodret eller dricksvattnet (baserad på fastställd kroppsvikt) genom användning av de förfaranden som beskrivs för denna studie, inte ger några observerbara toxiska verkningar och om ingen toxicitet förväntas på grundval av data från strukturellt närbesläktade kemikalier är det inte nödvändigt att genomföra en fullständig studie med tre doseringsnivåer. Toleranstestet tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

▼M4

Administrering av doser

22. Djuren doseras dagligen med testkemikalier, 7 dagar per vecka under en period av 28 dagar. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt utom i de fall när vattenlösningar används, då kan 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. Med undantag för irriterande eller frätande kemikalier, som normalt kommer att visa stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer.

23. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (PPM) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas; valet måste anges. När en kemikalie tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tidpunkt varje dag, och justeras vid behov för att upprätthålla en konstant dosnivå i förhållande till djurets kroppsvikt. Om en upprepad doseringsstudie används som inledning till en långtidsstudie ska ett liknande foder användas i båda studierna.

Observationer

24. Observationsperioden ska vara 28 dagar. Djuren i en satellitgrupp där uppföljande observationer planeras, ska hållas i minst 14 dagar utan behandling för att fördröjda eller kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska effekter ska kunna upptäckas.

25. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er) med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djurens hälsotillstånd bör registreras. Minst två gånger dagligen bör djuren observeras beträffande morbiditet och mortalitet.

26. En gång före den första exponeringen (för att möjliggöra individuella jämförelser), och därefter minst en gång per vecka, ska ingående kliniska observationer göras av samtliga djur. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats och helst vid samma tidpunkt varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att testbetingelsernas variationer är minimala, och att observationerna utförs av någon som inte känner till behandlingen. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) ska också registreras (2).

27. Under fjärde exponeringsveckan bör bedömningar göras av sensoriska reaktioner på stimuli av olika slag (2) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (3) (4) (5), bedömning av greppstyrka (6) och motorisk aktivitet (7). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till användas.

▼M4

28. Funktionella observationer som görs under fjärde exponeringsveckan kan utelämnas om studien utförs som inledning till en subkronisk studie (90-dagars). I så fall bör de funktionella observationerna tas med i denna uppföljningsstudie. Å andra sidan kan tillgången på data om funktionella observationer från studien med upprepad dosering öka möjligheten att välja dosnivåer för en efterföljande subkronisk studie.

29. I undantagsfall kan funktionella observationer utlämnas för grupper som annars skulle uppvisa tecken på toxicitet i sådan utsträckning att det väsentligen skulle påverka funktionstestets prestanda.

30. Vid obduktion kan östruscykeln för alla honor bestämmas (valfritt) genom ett vaginalt utstrykprov. Dessa observationer ger information beträffande östruscykelns stadium vid tiden för avlivandet och hjälper till med den histologiska utvärderingen av östrogenkänsliga vävnader (se vägledning om histopatologi (19)).

Kroppsvikt och foder-/vattenkonsumtion

31. Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Mätning av foderkonsumtion bör göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan.

Hematologi

32. Följande hematologiska undersökningar bör göras i slutet av testperioden: hematokrit, hemoglobin koncentration, erytrocyträkning, retikulocyter, total och differential räkning av leukocyter, trombocyter och en mätning av blodets koaguleringstid/-potential. Andra bestämningar som bör utföras, om testkemikalien eller dess förmodade metaboliteter har eller misstänkas ha oxiderande egenskaper, inkluderar methemoglobinkoncentration och Heinz-kroppar.

33. Blodprover bör tas från ett angivet ställe strax före eller som ett led i förfarandet för avlivning av djuren, och förvaras under lämpliga förhållanden. Djuren bör fasta över natten före avlivandet ([1]).

Klinisk biokemi

34. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka betydande toxiska effekter på vävnader, särskilt påverkan på lever och njurar, bör utföras på blodprov tagna på samtliga djur strax före, eller som ett led i, avlivningsproceduren (bortsett från de döende och/eller de som avlivats före studiens upphörande). Undersökningar av plasma eller serum ska omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar effekter på leverceller (såsom alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfatas, γ-glutamyltranspeptidas och glutamatdehydrogenas), samt gallsyror. Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller annat ursprung) och bilirubin kan under vissa omständigheter ge användbar information.

35. Eventuellt kan också följande urinanalyser utföras under studiens sista vecka med klockad uppsamling av urinvolym: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod/blodceller.

([1]) För en rad olika mätningar i serum och plasma, särskilt för glukos, är nattlig fasta att föredra. Huvudorsaken till denna preferens är att den ökade variabilitet som oundvikligen följer av utebliven fasta skulle tendera att maskera subtilare effekter och försvåra tolkningen. Å andra sidan kan dock den nattliga fastan inkräkta på djurens allmänna metabolism och kan, särskilt under foderstudier, störa den dagliga exponeringen för testkemikalien. Om nattlig fasta används ska klinisk biokemisk bestämning utföras efter utförandet av funktionella observationer under vecka 4 i studien.

▼M4

36. Dessutom bör man överväga studier för att undersöka plasma- eller serummarkörer för allmänna vävnadsskador. Andra bestämningar som bör utföras, om kända egenskaper hos testkemikalien kan, eller misstänks, påverka relaterade metaboliska profiler, inkluderar kalcium, fosfat, triglycerider, specifika hormoner och kolinesteras. Dessa bör identifieras för kemikalier i vissa klasser, eller från fall till fall.

37. Även om man i den internationella utvärderingen av endokrinrelaterade endpoints inte kunde påvisa en klar fördel för bestämning av sköldkörtelhormoner (T3, T4) och TSH, kan det vara till hjälp att bevara plasma- eller serumprover för att mäta T3, T4 och TSH (valfritt), om det finns indikation på påverkan av hypofys-sköldkörtelaxeln. För att lagra proverna kan de frysas vid – 20 °. Följande faktorer kan påverka variationen och de absoluta koncentrationerna för hormonbestämningarna:

— Tidpunkt för avlivningen beroende på hormonkoncentrationernas dygnsvariation.

— Avlivningsmetod för att undvika onödig stress hos djuren som kan påverka hormonkoncentrationerna.

— Testsatser för hormonbestämningar som kan skilja sig åt genom sina standardkurvor.

En slutgiltig identifiering av sköldkörtelaktiva kemikalier är mer tillförlitlig genom histopatologisk analys snarare än hormonnivåer.

38. Plasmaprover särskilt avsedda för hormonbestämning bör tas vid en jämförbar tid på dagen. Det rekommenderas att man bör överväga om bestämningar av T3, T4 och TSH utlöstes på grund av förändringar av sköldkörtelns histopatologi. De numeriska värden som erhölls vid analys av hormonkoncentrationer skiljer sig åt mellan de olika analyssatser som finns i handeln. Därför är det kanske inte möjligt att tillhandahålla prestandakriterier baserade på enhetliga historiska data. Alternativt bör laboratorierna sträva efter att hålla variationskoefficienterna under 25 för T3 och T4, och under 35 för TSH. Alla koncentrationer ska anges i ng/ml.

39. Om historiska basdata är otillräckliga bör hänsyn tas till hematologiska och kliniska biokemiska variabler innan doseringen påbörjas eller företrädesvis för en uppsättning djur som inte ingår i försöksgrupperna.

PATOLOGI

Obduktion

40. Samtliga djur i studien bör underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever, njurar, binjurar, testiklar, bitestiklar, prostata + sädesblåsor med koagulerade körtlar i sin helhet, bräss, mjälte, hjärna och hjärta från samtliga djur (med undantag av de döende och/eller de som har avlivats före studiens upphörande) ska putsas från angränsande vävnad vid behov, och deras våtvikt ska bestämmas så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Försiktighet måste iakttas vid putsning av prostatakomplexet för att undvika punktion av de vätskefyllda blåsorna. Alternativt kan sädesblåsor och prostata trimmas och vägas efter fixering.

▼M4

41. Dessutom skulle två andra vävnader eventuellt kunna vägas så snart som möjligt efter dissektionen, för att undvika uttorkning: parade äggstockar (våtvikt) och livmodern, inklusive livmoderhalsen (vägledning om borttagning och beredning av livmodervävnad för viktmätning finns i OECD:s TG 440 (18)).

42. Sköldkörtelns vikt (valfritt) kan bestämmas efter fixering. Putsning ska också göras väldigt försiktigt, och först efter fixeringen för att undvika vävnadsskador. Vävnadsskador kan äventyra den histopatologiska analysen.

43. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (se punkt 47): Alla större skador, hjärna (representativa områden omfattande cerebrum, cerebellum och pons), ryggmärg, ögon, mage, tunn- och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, bräss, sköldkörtel, luftstrupe och lungor (konserverade genom uppumpning med fixermedel och därefter nedsänkning), könskörtlar (testiklar och äggstockar), accessoriska könsorgan (uterus och cervix, epididymes, prostata + sädesblåsor med koaguleringskörtlar), vagina, urinblåsa, lymfkörtlar (vid sidan av den mest proximala dräneringsnoden bör en annan lymfnod tas i enlighet med laboratoriets erfarenheter (15)), perifer nerv (ischias eller tibia) helst nära muskeln, skelettmuskel och ben med benmärg (sektion eller, alternativt, ett nymonterat benmärgsaspirat). Det rekommenderas att testiklarna fixeras genom nedsänkning i Bouins fixativ eller modifierat Davidsons fixativ (16) (17). Tunica albuginea måste försiktigt och ytligt punkteras med en nål på organets båda poler för en snabb inträngning av fixativet. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras.

44. Följande vävnader kan ge värdefulla tecken på endokrinrelaterade effekter: Könskörtlar (äggstockar och testiklar), accessoriska könsorgan (uterus inklusive cervix, epididymis, sädesblåsor med koaguleringskörtlar, dorsolaterala och ventrala prostata), vagina, hypofys, manliga bröstkörtlar, sköldkörtel och binjurar). Förändringar i manliga bröstkörtlar är inte tillräckligt väl dokumenterade, men denna parameter kan vara väldigt känslig för ämnen med östrogen verkan. Observation av organ/vävnader som inte nämns i avsnitt 43 är valfria (se tillägg 2).

45. Vägledning om histopatologi (19) omfattar detaljerad information om dissektion, fixering, sektionering och histopatologi av endokrina vävnader.

46. I det internationella testprogrammet erhölls vissa belägg för att subtila endokrina verkningar av kemikalier med en låg potens för att påverka könshormonhomeostas, kan identifieras genom störning av östruscykelns synkronisering i olika vävnader, och inte så mycket genom franka histopatologiska förändringar i kvinnliga könsorgan. Även om inga direkta bevis erhölls för sådana effekter, rekommenderas att bevis för eventuell asynkroni i östruscykeln ska tas med i beräkningen vid tolkningen av äggstockarnas histopatologi (follikulära, thecala och granulosa celler), uterus, cervix och vagina. Om utvärderat kan det skede av cykeln som bestämts genom vaginala utstryk också ingå i denna jämförelse.

▼M4

Histopatologi

47. En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från samtliga djur i kontroll- och högdosgrupperna. Dessa undersökningar bör utsträckas till djur i alla andra doseringsgrupper, om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen.

48. Alla större skador ska undersökas.

49. Om en satellitgrupp används bör en histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka effekter har visats i de behandlade grupperna.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

50. Individuella data ska lämnas. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller eutanasin, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador, deras svårighetsgrad och procentandelen djur som uppvisar varje typ av skada.

51. Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid jämförelser av effekten längs ett dosintervall bör man undvika användningen av multipla t-tester. Statistiska metoder ska väljas vid utformningen av studien.

52. Som kvalitetskontroll föreslås att historiska kontrolldata samlas in för numeriska data, och med dem beräknas variationskoefficienter, särskilt för de parametrar som kopplas till endokrinstörande upptäckt. Dessa data kan sedan användas för jämförelseändamål när aktuella studier utvärderas.

Testrapport

53. Testrapporten måste innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som används.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

— Motivering för val av art, om inte råtta.

Försöksbetingelser:

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.

▼**M4**

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Omvandling från fodrets/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag), i förekommande fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Valfria endpoints som undersöktes

— Lista över valfria endpoints som undersöktes.

Resultat:

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderkonsumtion och vattenkonsumtion, i förekommande fall.

— Uppgifter om toxiska reaktioner efter kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är reversibla eller ej).

— Bedömning av sensorisk aktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet.

— Blodundersökningar med relevanta basvärden.

— Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.

— Uppgifter om kroppsvikt vid avlivning och organvikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av samtliga histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata, i förekommande fall.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

▼M4

Tillägg 1

DEFINITIONER

Androgenicitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) i en däggdjursorganism.

Antiandrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) i en däggdjursorganism.

Anti-östrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt östrogent hormon (t.ex. 17ß-östradiol) i en däggdjursorganism.

Antityreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt sköldkörtelhormon (t.ex. T_3) i en däggdjursorganism.

Dosering är en allmän term som omfattar dos, dess frekvens och doseringens varaktighet.

Dos är den mängd testkemikalie som administreras. Dosen uttrycks som testkemikaliens vikt per enhet kroppsvikt av försöksdjur per dag (t.ex. mg/kg kroppsvikt/dag), eller som en konstant kostkoncentration.

Uppenbar toxicitet är en allmän term som beskriver tydliga tecken på toxicitet efter tillförsel av testkemikalien. Dessa bör vara tillräckliga för en riskbedömning och bör vara sådana att en ökning av den tillförda dosen kan förväntas resultera i utvecklingen av allvarliga toxicitetssymptom och sannolikt leda till mortalitet.

NOAEL är förkortningen för nivån där ingen skadlig effekt observeras. Detta är den högsta dosnivå där inga behandlingsrelaterade fynd observerats på grund av behandling.

Östrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt östrogent hormon (t.ex. 17ß-östradiol) i en däggdjursorganism.

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tyreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt sköldkörtelhormon (t.ex. T_3) i en däggdjursorganism.

Validering är en vetenskaplig process utformad för att karakterisera de operativa kraven och begränsningarna hos en testmetod och visa dess tillförlitlighet och relevans för ett visst ändamål.

▼M4

Tillägg 2

Endpoints rekommenderade för upptäckt av endokrinstörande ämnen (EDS) i denna B.7-testmetod

Obligatoriska endpoints	Valfria endpoints
Vikt	
— Testiklar — Epididymis — Binjurar — Prostata + sädesblåsor med koagulerande körtlar	— Äggstockar — Uterus, inklusive cervix — Sköldkörtel
Histopatologi	
— Könskörtlar: — Testiklar och — Äggstockar — Accessoriska könsorgan: — Epididymis, — Prostata + sädesblåsa med koagulerande körtlar — Uterus, inklusive cervix — Binjure — Sköldkörtel — Vagina	— Vaginala utstryk — Manliga bröstkörtlar — Hypofys
Hormonmätningar	
	— Cirkulerande T3- och T4-nivåer — Cirkulerande TSH-nivåer

LITTERATUR

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

▼M4

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. I: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52–85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8 SUBAKUT INHALATIONSTOXICITET: 28-DAGARS STUDIE

SAMMANFATTNING

Denna reviderade B.8-testmetod har utformats för att fullständigt karakterisera testkemikaliens inhalationstoxicitet vid upprepade exponeringar under en begränsad tidsperiod (28 dagar), och för att tillhandahålla data för kvantitativa riskbedömningar. Grupper om minst 5 hangnagare och 5 hongnagare exponeras 6 timmar per dag under 28 dagar för a) testkemikalien vid tre eller fler koncentrationsnivåer, b) filtrerad luft (negativ kontroll, och/eller c) vehikeln (vehikelkontroll). Djur exponeras i allmänhet 5 dagar per vecka, men exponering 7 dagar per vecka är också tillåten. Hanar och honor testas alltid, men de kan exponeras vid olika koncentrationsnivåer om det är känt att ett kön är mer mottagligt för en viss testkemikalie. Denna metod ger försöksledaren flexibilitet att inkludera satellitgrupper (reversibilitet), lungsköljning (BAL), neurologiska tester och ytterligare klinisk patologi och histopatologiska utvärderingar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet.

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 412 (2009). Den ursprungliga testriktlinjen 412 (TG 412) för subakut inhalation antogs 1981 (1). Den här testmetoden B.8 (som motsvarar den reviderade testriktlinjen 412) har uppdaterats för att återspegla vetenskapen och möta nuvarande och framtida lagstiftningsbehov.

2. Den här testmetoden medger karakterisering av negativa effekter efter upprepad daglig exponering genom inhalation av en testkemikalie under 28 dagar. Uppgifterna som kommer från en 28-dagars substudie av akut inhalationstoxicitet kan användas för kvantitativa riskbedömningar (om den inte följs av en 90-dagars studie av subkronisk inhalationstoxicitet (kapitel B.29 i denna bilaga)). Uppgifterna kan också ge information om valet av koncentrationer för långtidsstudier såsom 90-dagarsstudien av subkronisk inhalationstoxicitet. Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av nanomaterial. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet 39 (2).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

3. All tillgänglig information om testkemikalien bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiens kvalitet och minimera djuranvändningen. Information som underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer kan inkludera identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester, förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier och data från testning av akut inhalationstoxicitet. Om neurotoxicitet förväntas eller observeras under studiens gång, kan försöksledaren välja att inkludera lämpliga utvärderingar såsom en funktionell samlingsstudie (FOB) och mätning av motorisk aktivitet. Även om tidpunkter för exponeringar i förhållande till specifika undersökningar kan vara kritiska, bör resultaten från dessa extra aktiviteter inte störa studiens grundläggande utformning.

▼M4

4. Utspädning av korrosiva eller irriterande testkemikalier kan testas vid koncentrationer som kommer att ge den önskade graden av toxicitet (se GD 39 (2)). När djur utsätts för dessa material bör målkoncentrationerna vara tillräckligt låga för att inte orsaka avsevärd smärta och lidande, men ändå tillräckliga för att utsträcka koncentration-respons-kurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppnås. Dessa koncentrationer bör väljas från fall till fall, företrädesvis baserade på en adekvat utformad undersökning av spännvidden som ger information om den kritiska endpointen, eventuellt tröskelvärde för irritation och tiden för de första tecknen (se punkterna 11–13). Motivering för valet av koncentration ska anges.

5. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt. Döende djur betraktas på samma sätt som de som dör under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecken på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

6. I testet bör friska unga vuxna gnagare användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta. Motivering ska ges om annan art används.

Förberedelse av djuren

7. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På dagen för randomiseringen bör djuren vara unga vuxna 7 till 9 veckor gamla. Kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet. Djuren väljs ut slumpvis och märks för individuell identifikation, och får därefter acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten.

Djurhållning

8. Djuren bör identifieras individuellt, om möjligt med subkutana transpondrar för att underlätta observationer och undvika förvirring. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

▼M4

Inhalationskammare

9. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och ändamålet med testet. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala ”volymen” försöksdjur inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringens deras principer och särskilda för- och nackdelar behandlas i GD 39 (2).

TOXICITETSSTUDIER

Koncentrationsgränser

10. Till skillnad från akuta studier finns det inga fastställda koncentrationsgränser i 28-dagarsstudier av subakut inhalationstoxicitet. För den högsta testade koncentrationen bör man beakta: 1) högsta möjliga koncentration, 2) värsta tänkbara fall av mänsklig exponering, 3) behovet av att ge en tillräcklig syretillförsel och/eller 4) djurskyddsskäl. I avsaknad av databaserade gränsvärden får de akuta gränsvärdena i förordning (EG) nr 1272/2008 (13) användas (dvs. upp till en högsta koncentration av 5 mg/l för aerosoler, 20 mg/l för ångor och 20 000 ppm för gaser), se GD 39 (2). Motivering ska ges om det är nödvändigt att överskrida dessa gränsvärden vid testning av gaser eller mycket flyktiga testkemikalier (t.ex. köldmedier). Koncentrationsgränsen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

Spännviddsstudie

11. Innan huvudstudien påbörjas kan det vara nödvändigt att genomföra en spännviddsstudie. En spännviddsstudie är mer omfattande än en inledande studie eftersom den inte är begränsad till valet av koncentration. Kunskap från en spännviddsstudie kan leda till en lyckad huvudstudie. En spännviddsstudie kan till exempel ge teknisk information om analysmetoder, partikeldimensionering, upptäckt av toxiska mekanismer, klinisk patologi- och histopatologidata, och en uppskattning av vad som kan vara NOAEL- och MTC-koncentrationer i en huvudstudie. Försöksledaren kan välja att använda en spännviddsstudie för att identifiera tröskelvärdet för irritation i luftvägarna (t.ex. med histopatologi i luftvägarna, lungfunktionstest eller lungsköljning), den övre koncentration som tolereras utan att djuren utsätts för onödig stress och parametrarna som bäst kännetecknar en testkemikalies toxicitet.

12. En spännviddsstudie kan bestå av en eller flera koncentrationsnivåer. Inte fler än tre hanar och tre honor ska exponeras vid varje koncentrationsnivå. En spännviddsstudie ska pågå under minst 5 dagar och vanligtvis inte mer än i 14 dagar. Motiveringen för valet av koncentrationer till huvudstudien ska ges i undersökningsrapporten. Syftet med huvudstudien är att påvisa ett koncentration-respons-förhållande baserat på vad som förväntas vara den mest känsliga endpointen. Den låga koncentrationen bör helst vara en koncentration utan en påvisbar skadlig effekt medan den höga koncentrationen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

▼M4

13. Vid valet av koncentrationsnivåer för spännviddsstudien bör all tillgänglig information beaktas, inklusive struktur-aktivitetsförhållanden samt data för liknande kemikalier (se punkt 3). En spännviddsstudie kan verifiera/motbevisa vad som anses vara de endpoints som är mest mekanistiskt baserade, t.ex. kolinesterasinhibition av organiska fosforföreningar, methemoglobinbildning av erytrocytotoxiska agens, sköldkörtelhormoner (T_3, T_4) för tyreotoxiska ämnen, protein, LDH eller neutrofiler i bronkialsköljning för ofarliga svårlösliga partiklar eller lungretande aerosoler.

Huvudstudie

14. Huvudstudien för subakut toxicitet består i allmänhet av tre koncentrationsnivåer och även samtidiga negativa (luft) och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 17). Alla tillgängliga data bör användas för att underlätta valet av lämpliga exponeringsnivåer, inklusive resultaten från de systematiska toxicitetsstudierna, metabolism och kinetik (särskild vikt bör läggas vid att undvika höga koncentrationsnivåer som mättar kinetiska processer). Varje testgrupp består av minst 10 gnagare (5 hanar och 5 honor) som exponeras för testkemikalien 6 timmar per dag 5 dagar per vecka under en period på 4 veckor (total studielängd 28 dagar). Djuren kan också exponeras 7 dagar per vecka (t.ex. vid testning av läkemedel som inhaleras. Om ett kön är känt för att vara mer mottagligt för en viss testkemikalie kan könen exponeras vid olika koncentrationsnivåer för att optimera koncentrationsresponsen enligt beskrivningen i punkt 15. Om andra gnagare än råttor exponeras enbart nos, får maximala exponeringstider justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en kortare exponeringstid än 6 timmar/dag, eller när det är nödvändigt att utföra en helkroppsexponeringsstudie med lång varaktighet (t.ex. 22 timmar/dag) (se GD 39 (2)). Inget foder ska ges under exponeringsperioden, om den inte överskrider 6 timmar. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

15. Den målkoncentration som valts ska identifiera målorgan(en) och påvisa en tydlig koncentrationsrespons:

— Den höga koncentrationsnivån bör leda till toxiska effekter, men inte orsaka kvardröjande tecken eller dödlighet, vilket kan förhindra en meningsfull utvärdering.

— Den mellanliggande koncentrationsnivån(erna) bör spridas ut för gradering av toxiska effekter mellan den låga och höga koncentrationen.

— Den låga koncentrationsnivån bör frambringa få eller inga belägg för toxicitet.

Satellitstudie (reversibilitet)

16. En satellitstudie (reversibilitet) kan användas för att observera reversibilitet, persistens eller fördröjd toxicitet för en efterbehandlingsperiod av lämplig längd, dock inte mindre än 14 dagar. Satellitgrupper (reversibilitet) består av fem hanar och fem honor som exponeras samtidigt med försöksdjuren i huvudstudien. Satellitstudiegrupper bör exponeras för testkemikalien vid den högsta koncentrationsnivån och det bör finnas samtidiga luft- och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 17).

▼M4

Kontrolldjur

17. Samtidiga negativa (luft-) kontrolldjur bör hanteras på ett sätt som är identiskt med djuren i testgruppen, förutom att de exponeras för filtrerad luft i stället för testkemikalien. När vatten eller annat ämne används för att generera testatmosfären bör en vehikelkontrollgrupp i stället för en negativ (luft-) kontrollgrupp ingå i studien. Vatten bör användas som vehikel närhelst det är möjligt. När vatten används som vehikel bör kontrolldjuren exponeras för luft med samma relativa fuktighet som de exponerade grupperna. Valet av en lämplig vehikel bör grunda sig på en lämpligt utförd förstudie eller historiska data. Om en vehikels toxicitet inte är känd kan försöksledaren välja att använda både en negativ (luft-) kontroll och en vehikelkontroll, men det rekommenderas inte. Om historiska data visar att en vehikel inte är toxisk finns det inget behov av en negativ (luft-) kontrollgrupp och då bör endast en vehikelkontroll användas. Om en förstudie av en testkemikalie som beretts i en vehikel inte visar någon toxicitet, framgår det att vehikeln inte är toxisk vid den testade koncentrationen och att denna vehikelkontroll bör användas.

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

18. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas. För att minska partikelstorleken kan partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer. Mer vägledning finns i GD 39 (2).

Partikelstorleksfördelning

19. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 3 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (4). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard, bör en sakkunnig bedömning ges om detta inte kan uppnås. Till exempel kan rökpartiklar av metall vara mindre än denna standard, och laddade partiklar och fibrer kan överstiga den.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

20. Testkemikalien ska helst testas utan en vehikel. Om det är nödvändigt att använda en vehikel för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien, bör vatten ges företräde. Närhelst en testkemikalie är upplöst i en vehikel ska dess stabilitet påvisas.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

21. Luftflödet genom exponeringskammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen i realtid av testatmosfärens koncentration (eller temporal stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ger ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta dynamiska inhalationsparametrar. Om koncentrationen övervakas i realtid kan mätfrekvensen för luftflöden minskas till en enda mätning per exponeringsdag.

▼M4

Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare. Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att denna standard inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid. Om mätningar under den första exponeringsdagen visar att dessa gaser har korrekta nivåer behöver inga fler mätningar utföras.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

22. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningszoner, för både enbart nos och helkroppsexponering, bör om möjligt övervakas kontinuerligt och registreras varje timme för varje exponering. Den relativa fuktigheten bör helst upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar), eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: nominell koncentration

23. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom inhalationskammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: faktisk koncentration

24. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliekoncentrationen som samlats in i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller genom icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.

25. En sats av testkemikalien ska användas genom hela studien, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

▼M4

26. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt. En enhet för realtidsövervakning, såsom en aerosolfotometer för aerosoler eller en analysator för totalkolväte för ångor kan användas för att påvisa stabilitet hos exponeringsförhållandena. Faktisk kammarkoncentration bör mätas minst 3 gånger varje exponeringsdag vid varje exponeringsnivå. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, är det acceptabelt med ett prov per exponeringsperiod. Helst ska detta prov sedan samlas in under hela exponeringsperioden. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor, och inte med mer än ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tid för att uppnå kammarjämvikt (t_{95}) bör beräknas och rapporteras. Varaktigheten för en exponering sträcker sig över den tid som testkemikalien genereras. Detta tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå kammarens jämvikt (t_{95}) och sönderfall. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).

27. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning) kan varje fas bete sig olika i en inhalationskammare. Därför ska minst ett indikatorämne väljas (analyt), vanligtvis det huvudsakliga aktiva ämnet i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i totalblandningen rapporteras, inte bara den aktiva ingrediensen eller indikatorämnet (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstorleksfördelning

28. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst en gång i veckan för varje koncentrationsnivå med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare (APS). Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor och det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela studien.

29. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas för alla koncentrationer som testats i ett tidigt skede av försöket, kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av hänsyn till djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att studien måste upprepas.

30. Partikeldimensionering bör utföras för ångor om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas.

IAKTTAGELSER

31. Djuren bör observeras kliniskt före, under och efter exponeringsperioden. Mer frekventa iakttagelser kan indikeras beroende på djurens respons under exponeringen. När iakttagelser av djuren hindras genom användning av fasthållningsrör, dåligt upplysta kroppskammare eller ogenomskinlig atmosfär, bör djuren noga observeras efter exponeringen. Observationer före nästa dags exponering kan utvärdera eventuell reversibilitet eller stegrande toxiska effekter.

▼M4

32. Alla observationer registreras med individuell registrering för varje djur. När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

33. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor, förändringar i andnings- och cirkulationssystemen, förändringar i nervsystemet, samt förändringar i kroppsmotorik och beteendemönster. Uppmärksamhet bör fästas vid iakttagelser av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning. Ytterligare utvärderingar kan inkluderas i studiens protokoll såsom kinetik, biologisk övervakning, lungfunktion, retention av svårlösliga ämnen som ackumuleras i lungvävnad, samt beteendeförändringar.

KROPPSVIKT

34. De enskilda djurens vikt bör registreras strax före den första exponeringen (dag 0), därefter två gånger i veckan (till exempel på fredagar och måndagar för att påvisa återhämtning över ett exponeringsfritt veckoslut eller under ett tidsintervall för bedömning av systematisk toxicitet), och vid tidpunkten för dödsfallet eller avlivningen. Visas inga effekter under de två första veckorna kan kroppsvikterna mätas en gång i veckan för återstoden av studien. Satellitdjur (reversibilitet) (om det används) ska fortsätta vägas varje vecka under hela återhämtningsperioden. Vid studiens upphörande bör samtliga djur vägas strax före avlivningen för en objektiv beräkning av förhållandet organ-kroppsvikt.

FÖDO- OCH VATTENINTAG

35. Födointaget bör mätas varje vecka. Vattenintaget bör också mätas.

KLINISK PATOLOGI

36. Kliniska patologiska bedömningar bör göras av samtliga djur, inklusive kontroll- och satellitdjur (reversibilitet) när de avlivas. Tidsintervallet mellan exponeringens upphörande och insamlingen av blod ska registreras, i synnerhet när rekonstitueringen av endpointen är snabb. Provtagning efter att exponeringen har upphört indikeras för dessa parametrar med ett kort plasmaprov halvtid (t.ex. COHb, CHE och MetHb).

37. Tabell 1 listar de kliniska patologiska parametrar som i allmänhet krävs för alla toxikologiska studier. Urinanalys krävs inte rutinmässigt, men kan utföras när det bedöms lämpligt utifrån förväntad eller observerad toxicitet. Försöksledaren kan välja att bedöma ytterligare parametrar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet (t.ex. kolinesteras, lipider, hormoner, syra/bas-balans, methemoglobin eller Heinz-kroppar, kreatinkinas, myeloid/erytroid-förhållande, troponiner, arteriella blodgaser, laktatdehydrogenas, sorbitoldehydrogenas, glutamatdehydrogenas och gamma-glutamyltranspeptidas).

▼M4

Tabell 1

Standardiserade parametrar för klinisk patologi

Hematologi	
Erytrocytantal	Totalt antal leukocyter
Hematokrit	Differentalt leukocytantal
Hemoglobinkoncentration	Trombocytantal
Medelvärde för korpuskulärt hemoglobin	Koaguleringsförmåga (välj ett alternativ):
Medelvärde för korpuskulär volym	— Protrobintid
Medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration	— Koagulationstid
Retikulocyter	— Partiell tromboplastintid

Klinisk kemi	
Glukos (*)	Alaninaminotransferas
Totalkolesterol	Aspartataminotransferas
Triglycerider	Alkaliskt fosfatas
Blodureakväve	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Totalprotein	Fosfor
Albumin	Klorid
Globulin	

Urinalys (valfritt)	
Utseende (färg och grumlighet)	Totalprotein
Volym	Glukos
Specifik vikt eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Eftersom en lång fasteperiod kan införa partiskhet i glukosmätningar för de behandlade djuren jämfört med kontrolldjuren, bör försöksledaren avgöra om det är lämpligt att djuren fastar. Om man använder en fasteperiod bör den vara avpassad för den art som används, för råtta kan det vara 16 timmar (fastande över natten). Bestämning av fasteglukos kan utföras efter en natts fasta under den sista exponeringsveckan, eller efter en natts fasta innan obduktionen (i det senare fallet tillsammans med alla andra kliniska patologiska parametrar).

38. När det finns bevis på att de nedre luftvägarna (dvs. alveolerna) är den främsta platsen för deponering och lagring, då kan lungsköljning vara det tekniska valet för att kvantitativt analysera hypotesbaserade doseffektparametrar med fokus på alveolit, lunginflammation och fosfolipidos. Detta gör att dosrespons och tidsförloppsförändringar för alveolär skada grundligt kan undersökas. BAL-vätskan kan analyseras för totalt och differentiellt leukocytantal, totalprotein och laktatdehydrogenas. Andra parametrar som kan beaktas är de som tyder på lysosomal skada, fosfolipidos, fibros, och irriterande eller allergisk inflammation som kan innefatta bestämning av pro-inflammatoriska cytokiner/kemokiner. BAL-mätningar kompletterar i allmänhet resultaten från histopatologiska undersökningar, men kan dock inte ersätta dem. Vägledning om hur man utför lungsköljning finns i GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPISK PATOLOGI OCH ORGANVIKTER

39. Samtliga försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl, bör underkastas fullständig blodtömning (om möjligt) och obduceras. Tidsperioden mellan slutfasen av varje djurs exponering och avlivandet av dem ska registreras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur påfunnits, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

40. Tabell 2 visar de organ och vävnader som bör bevaras i ett lämpligt medium under obduktion för histopatologisk undersökning. Bevarandet av organ och vävnader [inom hakparentes] och eventuellt andra organ och vävnader avgörs av försöksledaren. Organen i **fetstil** ska putsas och vägas våta så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Sköldkörteln och bitestiklarna bör endast vägas om det behövs, eftersom trimning av artefakter kan hindra en histopatologisk utvärdering. Vävnader och organ bör fixeras i 10 % buffrad formalin eller annat lämpligt fixativ så snart obduktionen utförts, och inte mindre än 24–48 timmar före trimning beroende på det fixativ som ska användas.

Tabell 2

Organ och vävnader som bevaras vid obduktion

Binjurar	Esofagus
Benmärg (och/eller färskt aspirat)	[Luktbulb]
Hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	Äggstockar
(Ögon [retina, synnerv] och ögonlock)	Sädesblåsor
Hjärta	Ryggmärg (cervikala, mitt på bröstkorgen och ländryggen)
Njurar	**Mjälte**
Larynx (3 nivåer, 1 nivå för att inkludera basen på epiglottis)	Mage
Lever	**Testiklar**
Lungor (alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker)	**Tymus**
Lymfkörtlar från lungans hilarregion, särskilt beträffande svårlösliga partikeltestkemikalier. För mer ingående undersökningar och/eller studier med immunologi i fokus kan ytterligare lymfkörtlar beaktas, t.ex. de från de mediastinala, cervikala/submandibulära och/eller aurikulära regionerna.	Sköldkörtel
	Luftstrupe (minst 2 nivåer inklusive 1 längdsnitt genom carina och 1 tvärsnitt)
	[Urinblåsa]
Nasofaryngeala vävnader (minst 4 nivåer; 1 nivå för att inkludera den nasofaryngeala kanalen och den nasalassocierade lymfvävnaden (NALT)	Uterus
	Alla större skador

▼M4

41. Lungorna bör avlägsnas intakta, vägas och indränkas med lämpligt fixativ vid ett tryck på 20–30 cm vatten för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls (5). Sektioner bör samlas in för alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker, men om lungsköljning utförs ska den osköljda loben sektioneras på tre nivåer (ej seriella sektioner).

42. Minst 4 nivåer av de nasofaryngeala vävnaderna bör undersökas, varav en ska innehålla den nasofaryngeala kanalen, (5, 6, 7, 8, 9) för en adekvat undersökning av den skvamösa, mellanliggande (icke-cilierade respiratoriska), respiratoriska (cilierade respiratoriska) och luktepitelet, samt den dränerade lymfvävnaden (NALT; 10, 11). Tre nivåer av struphuvudet bör undersökas, och en av dessa nivåer bör inkludera struplockets bas (12). Minst två nivåer av luftstrupen bör undersökas, inklusive ett längdsnitt genom förgreningen av carinan för de extrapulmonella bronkerna, samt ett tvärsnitt.

HISTOPATOLOGI

43. En histopatologisk utvärdering av alla organ och vävnader som räknas upp i tabell 2 bör utformas för kontroll- och högkoncentrationsgrupperna och för alla djur som dör eller avlivas under studien. Särskild uppmärksamhet bör ges åt luftvägarna, målorganen och större skador. Organ och vävnader som har skador i högkoncentrationsgruppen bör undersökas i alla grupper. Försöksledaren kan välja att utföra histopatologiska utvärderingar av flera grupper för att påvisa en tydlig koncentrationsrespons. Om en satellitgrupp (reversibilitet) används bör en histopatologisk utvärdering göras av samtliga vävnader och organ där effekter visats i de behandlade grupperna. Om det finns alltför många tidiga dödsfall eller andra problem i högkoncentrationsgruppen som äventyrar datans signifikans, bör nästa lägre koncentration undersökas histopatologiskt. Ett försök bör göras att korrelera större observationer i relation till mikroskopiska fynd.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

44. Individuella data om djurens kroppsvikt, födointag, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvikter och histopatologi ska lämnas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd. Samtliga resultat, kvantitativa och tillfälliga, ska utvärderas genom en lämplig statistisk metod. En allmänt vedertagen statistisk metod kan användas, och statistiska metoderna bör väljas under studiens utformning.

Testrapport

45. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

▼M4

— Art/stam som används och motivering för att använda andra arter än råtta. Källor och historiska data kan ges om de kommer från djur som har exponerats under liknande exponering, inhysning och fastebetingelser.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Detaljerad beskrivning av inhalationskammaren inklusive volym och ett diagram.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfären.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla och system som används för konditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i kammaren (helkropp).

— Testatmosfärens stabilitet.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Behandling av luft som tillförs/extraheras.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Tid tills inhalationskammaren har nått jämvikt (t95).

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grund för valet av målkoncentration i huvudstudien.

▼**M4**

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testkemikalien som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.

— Alla luftkoncentrationer bör redovisas i massenheter (mg/l mg/m^3, etc.) snarare än volymenheter (ppm, ppb, etc.).

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om testkemikalieberedning, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorlekarna hos fasta ämnen eller för att bereda testlösningar.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och för att exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den utrustning som används för att övervaka kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde (dvs. utarbetningen av en kalibreringskurva).

— Uppgifter om den utrustning som används för att samla in prover för bestämning av kammarens koncentration och partikelstorleksfördelning.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som används och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Metod för randomisering av djur till test- och kontrollgrupper.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).

▼M4

— Tabelluppställning av de enskilda djurens vikt.

— Tabelluppställning av födointag.

— Tabelluppställning av kliniska patologiska data.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

— Tabelluppställning av eventuella andra uppmätta parametrar.

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av metoderna som används för att uppfylla kriterierna för denna testmetod t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör behandlas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

— En förklaring bör ges om det fanns behov av att avliva djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

— Målorganet(en) bör identifieras.

— NOAEL och LOAEL bör bestämmas.

LITTERATUR

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. I: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasala diagram: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

(13) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (Text av betydelse för EES), EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼B

B.9 **TOXICITET VID UPPREPAD DOSERING (28 DAGAR, DERMALT)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet appliceras dagligen i graderade doser på huden till flera grupper av försöksdjur, varvid varje grupp ges en bestämd dos i 28 dagar. Under appliceringsperioden observeras djuren dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas och obduceras de överlevande djuren.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

I minst fem dagar före testet ska djuren hållas under testbetingelser med hänsyn till miljö och utfodring. Före testet fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Omedelbart innan testet inleds ska päls klippas bort från försöksdjurens rygg. Om pälsen rakas bort ska detta göras ungefär 24 timmar före testet. Klippning eller rakning behöver vanligtvis upprepas ungefär en gång i veckan. När pälsen klipps eller rakas bort ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Minst 10 % av kroppsytan ska göras klar för applicering av testämnet. Vid fastställande av vilket och hur stort område som ska förberedas ska hänsyn tas till djurets kroppsvikt. Vid test av fasta ämnen, som får pulvriseras om det är lämpligt, ska testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda. Testämnet appliceras dagligen fem till sju dagar i veckan.

1.6.2 **Testbetingelser**

1.6.2.1 *Försöksdjur*

Könsmogna råttor, kaniner eller marsvin får användas. Andra arter kan användas men i så fall ska detta motiveras.

▼B

Vid testets början får vikten hos de aktuella djuren inte avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2 *Antal och kön*

Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) med frisk hud ska användas på varje dosnivå. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av djur under testet ska det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt ska avlivas innan studien slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 10 djur (fem av vardera könet) tillföras den högsta dosnivån i 28 dagar och därefter observeras i 14 dagar efter testet för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska effekter. Även en satellitgrupp bestående av 10 kontrolldjur (fem av vardera könet) ska användas.

1.6.2.3 *Dosnivåer*

Till testet ska användas minst tre dosnivåer samt en kontrollgrupp eller en vehikelkontroll, om vehikel används. Testämnet ska appliceras vid samma tid varje dag och dosnivåerna ska justeras med jämna mellanrum (varje eller varannan vecka) så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Djuren i kontrollgruppen ska behandlas på samma sätt som djuren i behandlingsgruppen, bortsett från att de inte ska tillföras testämnet. Om vehikel används för att underlätta dosering ska kontrollgruppen tillföras vehikeln på samma sätt som behandlingsgrupperna. Vidare ska vehikeln tillföras kontrollgruppen i samma mängd som till de försöksdjur i gruppen som ges den högsta dosnivån. Den högsta dosnivån ska ge toxiska effekter men inga eller få dödsfall. Den lägsta dosnivån ska inte ge några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet ska den lägsta nivån vara högre än denna. Helst ska medeldosen ge minsta möjliga observerbara toxiska effekter. Om fler än en medeldos används ska dosnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. I grupperna som utsätts för låg- och medeldoser och i kontrollgruppen ska antalet dödsfall hållas på en låg nivå för att utvärderingen av resultaten ska vara meningsfylld.

Om appliceringen av testämnet ger allvarlig hudirritation ska koncentrationerna sänkas, vilket kan medföra att andra toxiska effekter minskar eller uteblir på högsta dosnivån. Om huden har skadats allvarligt kan det bli nödvändigt att avsluta det pågående testet och påbörja en ny med lägre koncentrationer.

1.6.2.4 *Gränstest*

Om det vid ett förberedande test fastställs att en dosnivå på 1 000 mg/kg, eller en högre dosnivå om detta motiveras av kunskap om människans möjliga exponering, inte ger några toxiska effekter kan ytterligare test anses vara överflödiga.

1.6.2.5 *Observationsperiod*

Försöksdjuren ska observeras dagligen för tecken på toxicitet. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder ska registreras.

▼B

1.6.3 Förfarande

Djuren ska hållas i var sin bur. Den ideala doseringen är att djuren utsätts för testämnet sju dagar i veckan i 28 dagar. Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning ska observeras i ytterligare 14 dagar utan tillförsel av testämnet så att det kan fastställas om de toxiska effekterna försvinner eller om de håller i sig. Exponeringstiden ska vara minst sex timmar per dag.

Testämnet ska appliceras jämnt över ett område som motsvarar ungefär 10 % av den totala kroppsytan. Med starkt toxiska ämnen kan testområdet vara mindre men så stor del av området som möjligt ska täckas med ett så tunt och jämnt fördelat lager som möjligt.

Under exponeringen ska testämnet hållas i kontakt med huden med en porös kompress och icke hudirriterande tejp. Testområdet ska vidare täckas på lämpligt sätt så att gaskompressen och testämnet hålls på plats och djuren inte kan inta testämnet. För att förhindra intag av testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas men total immobilisering rekommenderas inte. Alternativt kan en ’s-kyddskrage’ användas.

I slutet av exponeringsperioden ska kvarvarande testämne avlägsnas, om så är lämpligt med användning av vatten eller någon annan passande metod att rengöra huden.

Alla djuren ska observeras dagligen och tecken på toxicitet ska registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observationer ska omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Djurens ska vägas varje vecka och vidare rekommenderas att foderförbrukningen mäts per vecka. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testet avlivas och obduceras alla överlevande djur utom djuren i satellitgruppen. Djur som dör under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas och obduceras de överlevande djuren.

I slutet av testet ska alla djur inklusive kontrollgruppen genomgå följande undersökning:

1. Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differential räkning av leukocyter samt mätning av koaguleringsförmågan.

2. Klinisk biokemisk analys av blodet omfattande minst en lever- och njurfunktionsparameter: alanin-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas, GPT), serum-aspartat-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas, GOT), och urinäkväve, äggviteämnen, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein.

Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en adekvat toxikologisk utvärdering är kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glukos efter fasta, lipidanalys, hormoner, syra/basbalansen, metahemoglobin och kolinesterasaktivitet.

▼B

Ytterligare kliniska biokemiska analyser kan vid behov utföras för att vidare utreda de observerade effekterna.

1.6.4 **Makroskopisk undersökning**

Alla försöksdjur ska genomgå en fullständig makroskopisk undersökning. Lever, njurar, binjurar och testiklar ska vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning. Organ och vävnader, dvs. obehandlad och behandlad hud, lever, njure, mjälte, testiklar, binjurar, hjärta och målorgan (de organ som företer allvarliga skador eller storleksförändringar) ska förvaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning.

1.6.5 **Histopatologisk undersökning**

Histologisk undersökning ska göras av bevarade organ och vävnader från högdosgruppen och kontrollgruppen. Organ och vävnader, hämtade från gruppen som fått den högsta dosnivån, som uppvisar defekter som kan tillskrivas testämnet, ska undersökas i alla grupper som fått lägre dos. Djur i satellitgruppen ska genomgå histologisk undersökning, särskilt de organ och vävnader som har utvisat effekter i de övriga behandlingsgrupperna.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp anges antal djur i början av testet och antal djur som företer varje typ av skada.

Alla observerade resultat ska utvärderas med lämplig statistisk metod. Alla vedertagna statistiska metoder kan användas.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Data om djuren (art, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.).

— Testbetingelser (inklusive slag av bandage: med eller utan ocklusion).

— Dosnivåer (inklusive vehikel, om sådan använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under testet eller överlevnad till slutet av testet.

— Toxiska och andra effekter.

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

▼B

— Kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (E).

▼B

B.10 MUTAGENICITET – TEST *IN VITRO* AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av metoden OECD TG 47 3, Test *In Vitro* av kromosomavvikelser hos däggdjur (1997).

1.1 INLEDNING

Avsikten med testen av kromosomavvikelser *in vitro* är att identifiera ämnen som orsakar strukturella kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller (1) (2) (3). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Majoriteten av de kemiska mutagenerna inducerar avvikelser av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. En ökning av polyploidin kan indikera att ett kemiskt ämne har potential att inducera numeriska avvikelser. Denna metod är dock inte utformad för att mäta numeriska avvikelser och används inte rutinmässigt för det ändamålet. Kromosommutationer och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar och det finns påtagliga bevis för att kromosommutationer och liknande händelser som ger upphov till förändringar i onkogener och tumörsuppressorgener i somatiska celler är inblandade i cancerinduktion hos människa och hos försöksdjur.

Test av kromosomavvikelser *in vitro* kan göras med kulturer av etablerade cellinjer, cellstammar eller primära cellkulturer. De celler som används väljs ut på grundval av tillväxtförmåga vid odling, karyotypens stabilitet, antalet kromosomer, kromosomernas mångfald och den spontana frekvensen av kromosomavvikelser.

Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Detta metaboliska system för aktivering kan inte helt och hållet efterlikna de förhållanden som råder i däggdjuret in *vitro*. Man bör se till att undvika sådana förhållanden som skulle leda till positiva resultat som inte återspeglar den verkliga mutageniciteten och kan ha sin orsak i pH-förändringar, osmolalitet eller hög cytotoxicitet (4) (5).

Detta test används för att söka efter möjliga mutagener och karcinogener hos däggdjur. Många ämnen som är positiva i detta test är karcinogena hos däggdjur, men det finns ingen perfekt korrelation mellan detta test och karcinogenicitet. Korrelationen är beroende på den kemiska klassen och det finns allt starkare bevis för att det finns karcinogener som inte detekteras med detta test, eftersom det ser ut som om de verkar genom andra mekanismer än direkta DNA-skador.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

avvikelser av kromatidtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt i form av brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

avvikelser av kromosomtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt som brott, eller brott och återförening, hos båda kromatiderna pä samma ställe.

▼B

endoreduplikation: en process där kärnan efter den S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden hos en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

mitotiskt index: den andel celler som är i metafas delat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av tillväxt hos den populationen.

numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

polyploidi: en multipel av det haploida antalet kromosomer (n) som skiljer sig från det diploida antalet (dvs. 3n, 4n och så vidare).

strukturell avvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafasstadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Cellodlingar exponeras för testsubstansen både med och utan metabolisk aktivering. Vid förutbestämda intervall, efter det att cellodlingen har exponerats för testsubstansen, utförs behandling med ett ämne som stoppar celldelningen i metafas (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Därefter skördas cellerna och färgas in, varpå närvaro av kromosomavvikelser i metafascellerna analyseras mikroskopiskt.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Celler*

Ett antal olika cellinjer, stammar eller primära cellkulturer, inklusive humanceller, kan användas (t.ex. fibroblaster från kinesisk hamster, perifera blodlymfocyter från människor eller andra däggdjur).

1.4.1.2 *Typ av medium och kultur*

Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, CO_2-koncentration, temperatur och luftfuktighet) bör väljas för odlingarna. Etablerade cellinjer och stammar bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på stabilitet hos det modala kromosomantalet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma. Om kontaminering har skett bör de inte användas. Cellernas normala cellcykeltid och de odlingsförhållanden som används bör vara kända.

1.4.1.3 *Förberedelse av kulturer*

Etablerade cellinjer och stammar: celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att kulturerna inte kommer att växa samman innan det är dags att skörda, och inkuberas vid 37 °C.

▼B

Lymfocyter: helblod, behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin} eller separerade lymfocyter som erhållits från friska individer, tillsätts till odlingsmediet, vilket innehåller en mitogen substans (t.ex. fytohemaglutinin), varpå inkubering sker vid 37 ºC.

1.4.1.4 *Metabolisk aktivering*

Celler bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt metaboliskt system för aktivering. Det mest använda systemet är en kofaktorstödd post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) eller en blandning av fenobarbiton och β-naftoflavon (10) (11) (12).

Den postmitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området 1 till 10 % v/v i det slutliga testmediet. Tillståndet hos ett system för metabolisk aktivering kan bero på den klass av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den post-mitokondriella fraktionen.

Ett antal vidareutvecklingar, inklusive skapandet av genetiskt modifierade cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer, kan erbjuda en potential för endogen aktivering. Valet av de cellinjer som ska användas bör vara vetenskapligt underbyggt (t.ex. genom relevansen av cytokrom P450 isoenzym för metabolismen hos testsubstansen).

1.4.1.5 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpligt lösningsmedel eller vehikel och spädas ut om detta är lämpligt före det att cellerna behandlas. Flytande testsubstanser kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut innan behandlingen startas. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata påvisar att lagring är acceptabelt.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenlig med överlevnaden för cellerna samt S9-aktiviteten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas data som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar i första hand bör övervägas närhelst det är möjligt. När substanser som är instabila i vatten testas, bör de organiska lösningsmedel som används vara fria från vatten. Vatten kan avlägsnas genom tillsats av en molekylsikt.

1.4.2.2 *Exponeringskoncentrationer*

Bland de kriterier som ska övervägas när den högsta koncentrationen ska fastställas är cytotoxicitet, löslighet i testsystemet och förändringar i pH eller osmolalitet.

Cytotoxicitet bör fastställas, såväl med som utan metabolisk aktivering i huvudexperiment, med hjälp av en lämplig indikation på cellernas integritet och tillväxt, såsom graden av sammanväxning, viabilitetsräkning av cellerna, eller ett mitotiskt index. Det kan vara lämpligt att fastställa cytotoxicitet och löslighet i ett förberedande experiment.

▼B

Minst tre analyserbara koncentrationer bör användas. Där cytotoxicitet uppträder bör dessa koncentrationer täcka in ett område som sträcker sig från maximal toxicitet ner till liten eller ingen toxicitet. Detta innebär normalt att koncentrationerna bör separeras av minst en faktor mellan 2 och 10. Vid tiden för skörd av cellerna bör den högsta koncentrationen visa en signifikant reduktion i graden av konfluens, cellräkning eller mitotiskt index (alla större än 50 %). Det mitotiska indexet är endast ett indirekt mått på cytotoxiska/cytosta-tiska effekter och är beroende av tiden efter behandlingen. Det mitotiska indexet är dock acceptabelt för suspensionskulturer där andra toxicitetsmätningar kan vara besvärliga och opraktiska. Information om kinetiken för cellcykler, såsom medelgenerationstid (AGT), kan användas som extra information. AGT är dock ett övergripande medelvärde som inte alltid avslöjar existensen av försenade subpopulationer, och även små ökningar av medelgenerationstiden kan associeras med en mycket påtaglig senareläggning av tiden för optimalt utbyte av avvikelser.

För substanser som är relativt icke-cytotoxiska bör den maximala testkoncentrationen vara 5 μl/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M, beroende på vilket av dessa värden som är det lägsta.

För relativt olösliga substanser, som inte är toxiska vid koncentrationer som är lägre än koncentrationen där olöslighet inträder, bör den högsta använda dosen vara en koncentration som ligger över löslighetsgränsen i det avslutande odlingsmediet mot slutet av behandlingsperioden. I vissa fall (t.ex. när toxicitet endast uppträder vid koncentrationer som är högre än den lägsta olösliga koncentrationen) är det lämpligt att testa vid mer än en koncentration med synlig fällning. Det kan vara lämpligt att fastställa lösligheten vid början och slutet av behandlingen, eftersom lösligheten kan ändras under det att exponeringen i testsystemet pågår, beroende på närvaro av celler, S9, serum, etc. Löslighet kan detekteras med blotta ögat. Fällningen torde inte störa bestämningen.

1.4.2.3 *Negativa och positiva kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje experiment. När metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollkemikalien vara av en sådan typ att aktivering krävs för att ge ett mutagent svar.

Positiva kontroller bör utnyttja en känd klastogen vid exponeringsnivåer som förväntas ge en reproducerbar och detekterbar ökning jämfört med bakgrunden och som demonstrerar känsligheten hos testsystemet.

Positiva kontrollkoncentrationer bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Betingelser för metabolisk aktivering	Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Frånvaro av exogen metabolit Aktivering	Metylmetansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7

▼B

Betingelser för metabolisk aktivering	Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
	Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Närvaro av exogen metabolit Aktivering	Bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5
	Cyklofosfamid Cyklofosfamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Andra lämpliga positiva kontrollsubstanser kan användas. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av lösningsmedel eller enbart en vehikel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas var gång som odlingen skördas. Dessutom bör obehandlade kontroller också användas om det inte finns historiska kontrolldata som påvisar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

1.4.3 **Förfarande**

1.4.3.1 *Behandling med en testsubstans*

Prolifererande celler behandlas med testsubstansen i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering. Behandling av lymfocyter bör inledas när cirka 48 timmar gått efter den mitogena stimuleringen.

1.4.3.2 Två kulturer bör normalt användas för varje koncentration, och rekommenderas varmt för negativa kontrollkulturer eller kontrollkulturer för lösningsmedel. Där minimala variationer mellan två kulturer kan påvisas (13) (14) ur historiska data, kan det vara acceptabelt att en enda kultur används för varje koncentration.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med hjälp av lämpliga metoder, t.ex. test i slutna odlingskärl (15) (16).

1.4.3.3 *Tid för skörd av odlingen*

I det första experimentet bör cellerna exponeras för testsubstansen, både med och utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (12). Om detta protokoll ger negativa resultat både med och utan aktivering, bör ytterligare ett experiment utan aktivering utföras, med kontinuerlig behandling fram till dess att provtagning sker vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcyklens längd. Vissa kemikalier kan vara enklare att detektera vid behandlings-/provtagningstider som är längre är 1,5 cykellängder. Negativa resultat med metabolisk aktivering måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta negativa resultat bör detta cmotiveras.

▼B

1.4.3.4 *Kromosomberedning*

Cellkulturer behandlas vanligtvis med Colcemid® eller colchicin under 1–3 timmar innan skördning sker. Varje cellkultur skördas och behandlas separat för preparationen av kromosomer. Kromosomberedning innefattar hypoton behandling av cellerna, fixering och infärgning.

1.4.3.5 *Analys*

Alla utstryksglas, inklusive de med positiva och negativa kontroller, bör kodas upp oberoende av varandra innan den mikroskopiska analysen utförs. Eftersom fixeringen ofta ger upphov till brott på en del av de celler som är i metafas, med åtföljande förlust av kromosomer, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromerantal som är ekvivalent med det modala antalet ± 2 för alla celltyper. Åtminstone 200 väl spridda metafaser bör förekomma per koncentration och kontroll, med lika fördelning mellan dubbelproven, om det är tillämpligt. Detta antal kan reduceras när ett stort antal avvikelser observeras.

Även om syftet med testet är att detektera strukturella kromosomavvikelser, är det viktigt att notera polyploidi och endoreduplikation när dessa händelser observeras.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Den experimentella enheten utgörs av cellen, och därför bör den procentandel av cellerna som uppvisar strukturella kromosomavvikelser utvärderas. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för experimentella kulturer samt kontrollkulturer. Luckor i DNA-strängen noteras separat och rapporteras men inkluderas inte generellt i den totala frekvensen för avvikelser.

Samtidiga mätningar av cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollkulturer i huvudexperimenten avseende avvikelser bör även samlas in.

Individuella data för kulturen bör tas fram. Dessutom bör alla data sammanställas i form av en tabell.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en reproducerbar ökning av antalet celler med kromosomavvikelser. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärderingen av testresultaten (3) (13). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

▼B

En ökning av antalet polyploida celler kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera mitotiska processer och att inducera numeriska kromosomavvikelser. En ökning av antalet celler med endoreduplicerade kromosomer kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera cellcykelns förlopp (17) (18).

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier bedöms såsom icke-mutagen i detta system.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många experiment som utförs.

Positiva resultat från testet av kromosomavvikelser *in vitro* indikerar att testsubstansen inducerar strukturella kromosomavvikelser hos odlade somatiska däggdjursceller. Negativa resultat indikerar att testsubstansen inte inducerar kromosomavvikelser hos odlade somatiska däggdjursceller under de betingelser som rådde under testet.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

— Motivering av valet av vehikel.

— Testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

Celler:

— Cellernas typ och ursprung.

— Den använda celltypens karyotypegenskaper och lämplighet.

— Frånvaro av mykoplasma, om detta är tillämpligt.

— Information om cellcykelns längd.

— Bloddonatorernas kön, helblod eller separerade lymfocyter, använd mitogen substans

— Antal passager, om detta är tillämpligt.

— Metoder för underhåll av cellkulturen, om detta är tillämpligt.

— Det normala antalet kromosomer.

Försöksbetingelser:

— Identitet hos det ämne som stoppar celldelningen i metafasen, dess koncentration och cellexponeringens varaktighet.

— Grund för val av koncentrationer och antalet kulturer som ingår, t.ex. data för cytotoxicitet och begränsningar i löslighet, om detta finns tillgängligt.

— Mediets sammansättning, CO_2-koncentration, om detta är tillämpligt.

▼B

— Testsubstansens koncentration.

— Den tillsatta vehikelns och testsubstansens volym.

— Inkubationstemperatur.

— Inkubationstid.

— Behandlingens varaktighet.

— Celldensitet vid inokulering, om detta är tillämpligt.

— Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier.

— Positiva och negativa kontroller.

— Metoder för preparation av utstryksglas.

— Kriterier för bedömning av avvikelser.

— Antal metafaser som analyserats.

— Metoder för toxicitetsmätningarna.

— Kriterier för när studierna ska anses vara positiva, negativa eller osäkra.

Resultat:

— Tecken på toxicitet, t.ex. grad av sammanväxning, cellcykeldata, cellräkningar, mitotiskt index.

— Tecken på utfällning.

— Data om behandlingsmcediets pH och osmolalitet, om detta har uppmätts.

— Definition av avvikelser, inklusive luckor i DNA-strängen.

— Antalet celler med kromosomavvikelser och typ av sådana avvikelser, angivna separat för varje behandlad kultur samt kontrollkultur.

— Förändringar i ploiditet, om detta observerats.

— Dos/respons-förhållande, där det är möjligt.

— Statistiska analyser, om sådana finns.

— Samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata.

— Historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med variationer, medelvärden och standardavvikelser.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Melhods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, s. 1–29.

2. Ishidate, M. Jr. och Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, s. 427–432.

▼B

3. Galloway, S. M, Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brown, B., Cannon, C, Bloom, A. D., Nakamura, K, Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, M. A, Anderson, G. och Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl.10), s. 1–175.

4. Scott, D., Galloway, S. M, Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. och Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, s. 147–204.

5. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. och Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, s. 297–305.

6. Arnes, B. N., McCann, J. och Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, s. 347–364.

7. Maron, D. M. och Arnes, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, s. 173–215.

8. Natarajan. A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. och de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro,* I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation* Res., 37, s. 83–90.

9. Matsuoka, A., Hayashi, M. och Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66, s. 277–290.

10. Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. och Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, s. 175–177.

11. Matsushima, T., Sawamura, M, Hara, K. och Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. och Philpot, R. M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

12. Galloway, S. M., Aardema. M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P, Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312, s. 241–261.

13. Richardson, C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. och Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

14. Soper, K. A. och Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. Mutation Res., 312, s. 139–149.

15. Krahn, D. F, Barsky, F. C. och McCooey, K. T. (1982), CHO/ HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds). Genotoxic Effects oj Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91–103.

▼B

16. Zamora, P. O., Beson, J. M., Li, A. P. och Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels of Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, s. 795–801.

17. Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, s. 403–413.

18. Huang, Y., Change, C. och Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, s. 1362–1364.

▼B

B.11 MUTAGENICITET – TEST *IN VIVO* AV KROMOSOMAVVIKELSER I BENMÄRG HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av OECD TG 475, Test av kromosomavvikelser i benmärg hos däggdjur (Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Testet *in vivo* avseende kromosomavvikelser hos däggdjur används för att detektera strukturella kromosomavvikelser inducerade av testsubstansen i benmärgsceller hos djur, vanligen hos gnagare (1) (2) (3) (4). Strukturella kromosomavvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. En ökning av polyploidin kan indikera att en kemikalie har potential att inducera numeriska avvikelser. För huvuddelen av de kemiska mutagenerna utgörs de inducerade avvikelserna av kromatidtypen, men även avvikelser av kromosomtyp kan förekomma. Kromosommutationer och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människa och det finns omfattande bevis för att kromosommutationer och liknande händelser som ger upphov till förändringar i onkogener samt att tumörsuppressorgener är inblandade i cancer hos människa och i experimentella system.

Gnagare används rutinmässigt i detta test. Benmärg är målvävnaden i detta test, eftersom det är en mycket kärlrik vävnad som innehåller en cellpopulation med en snabb cellcykel, och där cellerna enkelt kan isoleras och bearbetas. Andra arter och målvävnader används inte med denna metod.

Detta test av kromosomavvikelser är särskilt relevant för att fastställa mutagena risker, eftersom det medger överväganden av faktorer *in vivo* för metabolism, farmakokinetik och processer för DNA-reparationer, även om dessa faktorer kan variera mellan olika arter och vävnader. Ett test *in vivo* är även användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt, med detektion genom tester *in vitro*.

Om det finns bevis för att testsubstansen, eller en reaktiv metabolit, inte kommer att nå målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

avvikelser av kromatidtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt i form av brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

avvikelser av kromosomtyp: en strukturell kromosomskada, uttryckt som brott, eller brott och återförening, hos båda kromatiderna på samma ställe.

endoreduplikation: en process där kärnan efter den S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden hos en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

▼B

polyploidi: en multipel av det haploida antalet kromosomer (n) som skiljer sig från det diploida antalet (dvs. 3n, 4n.).

strukturell avvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafasstadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Djur exponeras för testsubstansen genom en lämplig metod för exponering och de avlivas på lämpliga tider efter behandlingen. Innan de avlivas behandlas djuren med ett ämne som gör att celler stannar upp i metafas (t.ex. colchicin eller Colcemid®). Kromosomberedningar görs sedan från benmärgscellerna och färgas in, varpå celler i metafas analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 Förberedelser

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Vanligen används råttor, möss och kinesiska hamstrar, även om vilket lämpligt däggdjur som helst kan utnyttjas. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna djur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen ska påbörjas, är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga ± 20 % av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren ska ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar.

1.4.1.4 *Beredning av doser*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas, om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

1.4.2 Försöksbetingelser

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Därhelst det är möjligt rekommenderas att man i första hand överväger att använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

▼B

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå för varje kön i varje test. Förutom behandling med testsubstansen, bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör ge strukturella avvikelser *in vivo* vid exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden. Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men att identiteten hos kodade utstryksglas inte omedelbart avslöjas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagning endast sker vid ett enstaka tillfälle. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier kan dessutom övervägas när dessa finns tillgängliga. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyklofosfamid Cyklofosfamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade enbart med lösningsmedel eller vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens hos celler med kromosomavvikelser hos djuren kan erhållas från historiska kontrolldata. Om enstaka provtagning används för negativa kontroller, är den lämpligast tiden det första provtagningstillfället. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas om det inte finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Försöksdjurens antal och kön**

Varje behandlad grupp samt kontrollgruppen måste bestå av minst 5 analyserbara djur av varje kön. Det räcker med att testa enbart det ena könet, om det vid tiden för undersökningens genomförande finns data tillgängliga från undersökningar av samma art och där man har använt sig av samma exponeringssätt, så att det går att visa att det inte finns några substantiella skillnader i toxicitet mellan könen. I de fall där exponering för kemikalier hos människa kan vara könsspecifik, vilket t.ex. kan vara fallet för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

1.5.2 **Behandlingsschema**

Testsubstanser administreras med fördel som en enstaka behandling. Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, två behandlingar under samma dag med högst några timmars intervall, för att underlätta administrering av en stor volym. Andra doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade.

▼B

Prover bör tas vid två separata tillfällen efter behandling under en dag. Det första provtagningstillfället för gnagare ligger på 1,5 gånger den normala cellcykelns längd (den senare är normalt 12–18 timmar) efter behandling. Eftersom den tid som går åt för upptag och metabolism av testsubstansen, likväl som dess effekt på cellcykelns kinetik, kan påverka den optimala tiden för detektion av kromosomavvikelser, så rekommenderas att provtagningen senareläggs till 24 timmar efter det första provtagningstillfället. Om doseringsscheman på mer än en dag används, bör man använda en provtagningstid på 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter den slutliga behandlingen.

Innan djuren avlivas bör de injiceras intraperitonealt med en lämplig dos av ett ämne som stoppar celldelningen i metafas (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Prov på försöksdjur bör därefter tas vid lämpliga intervall. För möss är detta intervall ca 3–4 timmar; för kinesiska hamstrar ligger intervallet på ca 4–5 timmar. Celler skördas från benmärgen och analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

1.5.3 **Dosnivåer**

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (5). Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett område som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör. Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas från fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i benmärgen (t.ex. mer än 50 % reduktion av mitotiskt index).

1.5.4 **”Limit-test”**

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. För undersökningar med en längre varaktighet ligger gränsdosen på 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag vid behandlingar upp till 14 dagar, och 1 000 mg/kg/kroppsvikt/dag för behandlingar som varar längre än 14 dagar. Förväntad exponering av människor kan utgöra en indikation på behovet av att använda en högre dosnivå i ett ’limit-test’.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra vägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är högre än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

▼B

1.5.6 **Kromosomberedning**

Omedelbart efter avlivningen tas benmärgen ut, tillsätts hypoton lösning och fixeras. Cellerna sprids sedan ut på utstryksglas och färgas in.

1.5.7 **Analys**

Det mitotiska indexet bör fastställas om ett mått på cytotoxicitet hos minst 1 000 celler per djur för alla behandlade försöksdjur (inklusive positiva kontroller) och obehandlade försöksdjur för negativ kontroll.

Minst 100 celler bör analyseras för varje försöksdjur. Detta antal kan reduceras när ett stort antal avvikelser observeras. Alla utstryksglas, inklusive de för positiva och negativa kontroller, bör kodas oberoende av varandra innan de analyseras i mikroskop. Eftersom beredningen av utstryksglas ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafas med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromererantal som är lika med antalet 2n ± 2.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data för försöksdjuren bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av djuret. För varje försöksdjur bör antalet celler som påträffas, antalet avvikelser per cell och procentandelen celler med strukturella kromosomavvikelser utvärderas. Antalet och frekvensen av olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor i DNA-strängen noteras separat och rapporteras men inkluderas inte generellt i den totala frekvensen av avvikelser. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data från båda könen kombineras för statistisk analys.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning i det relativa antalet celler med kromosomavvikelser eller en tydlig ökning av antalet celler som uppvisar avvikelser i en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultatet (6). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En ökning av polyploidin kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inducera numeriska kromosomavvikelser. En ökning av endoreduplikationen kan utgöra en indikation på att testsubstansen har potential att inhibera cellcykelns förlopp (7) (8).

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

▼B

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många experiment som utförs.

Positiva resultat från testet av kromosomavvikelser *in vitro,* indikerar att en substans inducerar kromosomavvikelser i benmärgen hos de arter som testades. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under dessa försöksbetingelser, inte inducerar kromosomavvikelser i benmärgen hos de arter som testades.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter når ut till det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

— Motivering av valet av vehikel.

— Testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

Försöksdjur:

— Art/stam som används.

— Försöksdjurens antal, ålder och kön.

— Källa, förhållanden vid förvaring, diet, etc.

— Individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp.

Försöksbetingelser:

— Positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel).

— Data från en undersökning av lämpligt intervall, om en sådan har utförts.

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om beredningen av testsubstansen.

— Uppgifter om administreringen av testsubstansen.

— Grund för administreringens tillförselväg.

— Metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämpbart.

— Omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg/kroppsvikt/dag), om detta är tillämpbart.

— Uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet.

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

▼B

— Identiteten hos substanser som stoppar cellcykeln i metafas, deras koncentration och behandlingens varaktighet.

— Metoder för preparation av utstryksglas.

— Kriterier för hur avvikelser påvisas.

— Antalet celler som analyserats per försöksdjur.

— Kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga.

Resultat:

— Tecken på toxicitet.

— Mitotiskt index.

— Typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur.

— Det totala antalet avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.

— Antal celler med avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.

— Förändringar i ploiditet, om några sådana har observerats.

— Dos/responsförhållande, där så är möjligt.

— Statistiska analyser, om några sådana förekommer.

— Samtidiga negativa kontrolldata.

— Historiska negativa kontrolldata med områden, medelvärden och standardavvikelser.

— Samtidiga positiva kontrolldata.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Adler, I. D. (1984), Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt och J. M. Parry (eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., s. 275–306.

2. Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. K. och Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189. s. 157–165.

3. Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. och Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D. J. Kirkland (ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

4. Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H. Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Simada, H., Sutou, S. och Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, s. 305–312.

5. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker. G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. och Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, s. 313–319.

▼B

6. Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. och Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Comntittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part. III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

7. Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, s. 403–413.

8. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, s. 1362–1364.

▼B

B.12 MUTAGENICITET – TEST AV MIKROKÄRNOR *IN VIVO* I ERYTROCYTER HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 474, Test av mikrokämor i erytrocyter hos däggdjur (Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test [1997]).

1.1 INLEDNING

Testet av mikrokärnor *in vivo* hos däggdjur används för detektion av sådana skador på kromosomer eller på den mitotiska apparaten hos erytroblaster som induceras av testsubstansen, genom analys av erytrocyter från provtagning på benmärg och/eller perifert blod från djurceller, vanligtvis gnagare.

Avsikten med testet av mikrokärnor är att identifiera substanser som orsakar cytogen skada, vilket resulterar i bildning av mikrokärnor som innehåller isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

När en erytroblast från benmärg utvecklas till en polykromatisk erytrocyt stöts huvudkärnan ut. Varje mikrokärna som har bildats kan bli kvar i den annars kärnfria cytoplasman. Visualisering av mikrokärnor underlättas i dessa celler eftersom de saknar en huvudkärna. En ökning av frekvensen av polykromatiska erytrocyter med mikrokärnor hos behandlade försöksdjur utgör en indikation på inducerade kromosomskador.

Benmärg från gnagare används rutinmässigt i detta test eftersom polykromatiska erytrocyter produceras i sådan vävnad. Mätningen av omogna (polykromatiska) erytrocyter med mikrokärnor i perifert blod är lika acceptabelt hos alla arter där oförmågan hos mjälten att avlägsna erytrocyter med mikrokärnor har kunnat påvisas, eller som har uppvisat en adekvat sensitivitet för att detektera ämnen som orsakar strukturella eller numeriska kromosomavvikelser. Mikrokärnor kan särskiljas genom ett antal olika kriterier. Dessa innefattar identifiering av närvaron eller frånvaron av en kinetochor eller av centromer-DNA i mikrokärnor. Frekvensen av omogna (polykromatiska) erytrocyter med mikrokärnor utgör den huvudsakliga slutpunkten. Antalet mogna (normokromatiska) erytrocyter i perifert blod som innehåller mikrokärnor bland ett givet antal mogna erytrocyter kan även användas som slutpunkt på undersökningen, när försöksdjur behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller längre.

Detta test av mikrokärnor *in vivo* på däggdjur är särskilt relevant för att fastställa mutagena risker, eftersom det möjliggör överväganden av faktorer för *in vivo* metabolism, farmakokinetik och processer för DNA-reparationer, även om sådana faktorer kan variera mellan olika arter, vävnader och genetiska slutpunkter. Ett test *in vivo* är även användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt, med detektion i ett *in vitro*-system.

Om det finns bevis för att testsubstansen eller en reaktiv metabolit inte kommer att nå målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, del B.

▼B

1.2 DEFINITIONER

centromer (Kinetochor): delar av en kromosom till vilka spindelfibrer är fästa under celldelning, vilket ger upphov till en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

mikrokärnor: små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna, och som produceras under mitosens telofas (meios) från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

normokromatisk erytrocyt: mogna erytrocyter som saknar ribosomer och som kan särskiljas från omogna polykromatiska erytrocyter genom infärgning som är selektiv för ribosomer.

pofykromalisk erytrocyt: omogen erytrocyt, i ett intermediärt utvecklingsstadium, vilken fortfarande innehåller ribosomer och därför kan särskiljas från mogna, normokromatiska erytrocyter genom infärgning som är selektiv för ribosomer.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjur bör exponeras för testsubstansen på ett lämpligt sätt. Om benmärg används, bör försöksdjuren avlivas vid lämpliga tider efter behandling, varvid benmärg extraheras, preparationer görs och färgas in (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). När perifert blod används, samlas blodet upp vid lämpliga tidpunkter efter behandling och utstryckspreparationer görs, vilka sedan färgas in (4) (8) (9) (10). Vid undersökningar med perifert blod, bör det gå så kort tid som möjligt mellan den sista exponeringen och skörden av cellerna. Preparationerna analyseras med avseende på närvaron av mikrokärnor.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Råttor, möss och kinesiska hamstrar används vanligen, även om vilket lämpligt däggdjur som helst kan användas. Vid användning av perifert blod rekommenderas möss. Det är emellertid även möjligt att använda andra däggdjursarter, förutsatt att det är en art där mjälten inte avlägsnar erytrocyter med mikrokärnor eller en art som har uppvisat en adekvat känslighet när det gäller att detektera ämnen som kan orsaka strukturella eller numeriska kromosomavvikelser. Vanligt använda laboratoriestammar av unga, friska försöksdjur bör komma i fråga. Vid undersökningens början bör viktskillnaden mellan försöksdjuren vara minimal och inte överskrida + 20 % av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50-60 %.

▼B

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren ska ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar.

1.4.1.4 *Beredning av doser*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Det rekommenderas att, därhelst det är möjligt, man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå för varje test. Förutom behandling med testsubstansen, bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör ge mikrokärnor *in vivo* vid de exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden. Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga, men att identiteten hos kodade utstryksglas inte omedelbart avslöjas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagning endast sker vid ett enstaka tillfälle. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier kan dessutom övervägas när dessa finns tillgängliga. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-etyl-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyklofosfoamid Cyklofosfoamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

▼B

Negativa kontroller, behandlade enbart med lösningsmedel eller vehiklar, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens hos celler med kromosomavvikelser hos djuren kan erhållas ur historiska kontrolldata. Om enstaka provtagningar används för negativa kontroller, är den lämpligaste tiden det första provtagningstillfället. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas om det inte finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

Om perifert blod används, kan även ett prov taget innan behandlingen påbörjas vara acceptabelt som en samtidig negativ kontroll, men endast för de korta perifera undersökningarna av blod (t.ex. 1–3 behandling(ar)) när resulterande data ligger inom det förväntade området för den historiska kontrollen.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Försöksdjurens antal och kön**

Varje behandlad grupp samt kontrollgruppen måste bestå av minst 5 analyserbara djur av varje kön. Det räcker med att testa enbart det ena könet, om det vid tiden för undersökningens genomförande finns data tillgängliga från undersökningar av samma art och där man har använt sig av samma exponeringssätt, så att det går att visa att det inte finns några substantiella skillnader i toxicitet mellan könen. I de fall där exponering för kemikalier hos människa kan vara könsspecifik, vilket t.ex. kan vara fallet för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

1.5.2 **Behandlingsschema**

Inget standardiserat behandlingsschema (t.ex en, två eller flera behandlingar med 24 timmars intervall) kan rekommenderas. Proverna från utökade doseringsscheman är acceptabla så länge som en positiv effekt har demonstrerats för denna typ av undersökning eller, för en negativ undersökning, så länge som toxicitet har påvisats eller gränsvärdesdosen har använts, och doseringen fortsatte tills det var dags för provtagning. Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, dvs. två behandlingar under en och samma dag med högst några timmars intervall, för att på så sätt underlätta administrering av stora volymer med material.

Testet kan utföras på två sätt

a) Försöksdjur behandlas en gång med testsubstansen. Prover på benmärg tas ut minst två gånger, med början tidigast 24 timmar och senast 48 timmar efter behandling, och med lämpliga intervall mellan proven. Om prover tas tidigare än 24 timmar efter behandling bör detta motiveras. Prover på perifert blod tas ut minst två gånger, med början tidigast 36 timmar efter behandling, och i lämpliga intervall efter det första provet, men inte senare än efter 11 timmar. När ett positivt svar identifieras vid ett provtagningstillfälle, så är ytterligare provtagning inte nödvändig.

▼B

b) Om två eller flera dagliga behandlingar utförs (t.ex. två eller flera behandlingar med 24 timmars intervall), bör prover tas ut en gång mellan 18 och 24 timmar efter den slutliga behandlingen av benmärgen och en gång mellan 36 och 48 timmar efter den slutliga behandlingen av det perifera blodet (12).

Prover kan dessutom tas vid andra tidpunkter när detta är lämpligt.

1.5.3 **Dosnivåer**

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (13). Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett område som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör. Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icketoxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas från fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i benmärgen (t.ex. en reduktion av andelen omogna erytrocyter jämfört med det totala antalet erytrocyter i benmärgen eller i perifert blod).

1.5.4 **”Limit-test”**

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. För undersökningar med en längre varaktighet ligger gränsdosen på 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag vid behandlingar upp till 14 dagar, och på 1 000 mg/kg/kroppsvikt/dag för behandlingar som varar längre än 14 dagar. Förväntad exponering av människor kan utgöra en indikation på behovet av att använda en högre dosnivå i ett ”limit-test”.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är högre än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

▼B

1.5.6 **Beredning av benmärg/blod**

Benmärgsceller erhålls vanligen från lårbenet eller skenbenet omedelbart efter det att djuret avlivats. Normalt avlägsnas cellerna från lårbenet eller skenbenet, prepareras och färgas in med hjälp av etablerade metoder. Perifert blod erhålls från svansvenen eller någon annan lämplig blodåder. Blodceller färgas omedelbart in supravitalt (8) (9) (10) eller så görs utstrykspreparationer vilka sedan färgas in. Användningen av ett DNA-specifikt färgämne (t.ex. akridinorange (14) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) kan eliminera några av de artefakter som ar associerade med användning av ett färgämne som inte är DNA-specifikt. Denna fördel utesluter inte användningen av konventionella färgämnen (t.ex. Giemsa). Ytterligare system (t.ex. cellulosakolonner för att avlägsna celler med kärnor (16)) kan även användas, förutsatt att dessa system har visat sig fungera på ett adekvat sätt vid preparation av mikrokärnor i laboratoriet.

1.5.7 **Analys**

Andelen omogna erytrocyter bland det totala antalet erytrocyter (omogna + mogna) bestäms för varje djur genom att totalt räkna minst 200 erytrocyter för benmärg och 1 000 erytrocyter för perifert blod (17). Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör ges en oberoende kodning innan analys i mikroskop utförs. Minst 2 000 omogna erytrocyter per djur undersöks med avseende på förekomst av omogna erytrocyter med mikrokärnor. Ytterligare information kan erhållas genom att söka efter mogna erytrocyter med mikrokärnor. Vid analys av utstryksglas bör antalet omogna erytrocyter jämfört med det totala antalet erytrocyter inte vara mindre än 20 % av kontrollvärdet. När djur behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller mer kan även minst 2 000 mogna erytrocyter per djur undersökas med avseende på förekomst av mikrokärnor. System för automatiserad analys (bildanalys och flödescytometri av cellsuspensioner) är acceptabla alternativ till manuell utvärdering om lämplig verifiering och validering sker.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data från försöksdjur bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av försöksdjuret. Antalet omogna erytrocyter som påträffas, antalet omogna erytrocyter med mikrokärnor, och antalet omogna bland det totala antalet erytrocyter bör listas separat för varje djur som analyseras. När försöksdjur behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller mer, bör data över mogna erytrocyter också presenteras, om dessa har samlats in. Andelen omogna erytrocyter bland det totala antalet erytrocyter och, om det anses tilllämpligt, procentandelen av erytrocyter med mikrokärnor, bör anges för varje försöksdjur. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data från båda könen kombineras för statistisk analys.

▼B

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av antalet celler med mikrokärnor eller en tydlig ökning av antalet celler med mikrokärnor hos en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (18) (19). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger experimentet upprepas.

Positiva resultat i testet av mikrokärnor tyder på att substansen inducerar mikrokärnor som är ett resultat av en kromosomal skada eller skada på den mitotiska apparaten i erytroblasterna hos den art som testas. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under dessa försöksbetingelser, inte ger upphov till mikrokärnor i de omogna erytrocyterna hos den art som testas.

Sannolikheten för att testsubstansen eller någon av dess metaboliter ska nå ut i det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering för valet av vehikel

— testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

— art/stam som används

— försöksdjurens antal, ålder och kön

— källa, förhållanden vid förvaring, diet, etc.

— individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

— positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel)

— data från en undersökning av spännvidden, om en sådan har utförts

▼B

— grund för valet av dosnivå

— uppgifter om beredningen av testsubstansen

— uppgifter om administreringen av testsubstansen

— grund för det sätt administreringen sker på

— metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tillämpbart

— omvandling av koncentrationen för testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg/kroppsvikt/dag), om detta är tillämpbart

— fodrets och vattnets kvalitet

— detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman

— metoder för preparation av utstryksglas

— metoder för mätningar av toxicitet

— kriterier för bestämning av omogna erytrocyter med mikrokärnor

— antalet analyserade celler per djur

— kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

— tecken på toxicitet

— andelen omogna erytrocyter av det totala antalet erytrocyter

— antalet omogna erytrocyter med mikrokärnor, angett separat för varje djur

— medelvärde ± standardavvikelse för omogna erytrocyter med mikrokärnor per grupp

— dos/responsförhållande, närhelst detta är möjligt

— statistiska analyser och metoder som används

— samtidiga och historiska negativa kontrolldata

— samtidiga positiva kontrolldata

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation *Res.,* 18, s. 187–190.

2. Schmid, W. (1975), The micronucleus Test, Mutation Res., 31, s. 9–15.

3. Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res. 123. s. 61–118.

4. Mavourmin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C, Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, s. 29–80.

▼B

5. MacGregor, J. T., Schlegel, R. Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: 'Developments in Science and Practice of Toxicology', ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, s. 555–558.

6. MacGregor,). T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C, Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. Mutation Res., 189: s. 103–112.

7. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Selby, M. E. (1990), the *In vivo* Erythrocyte Micronuc- leus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14, s. 513–522.

8. Hayashi, M., Morita, T., Kodarna, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. Mutation *Res.,* 245, s. 245–249.

9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus Test Wirth Morse Perip heral Blood Erythrocytes by Acridine Orange supravital Staining: The Summary Report of the 5th Col laborative Study by CSGMT/ JEMMS. MMS. *Mutation Res.* 278, s. 83–98.

10. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, s. 153–159.

11. Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In vivo* Rodent Eryth rocyte Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, s. 293–304.

12. Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis,* 10, s. 313–319.

13. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doc, J., Esdaile, D.]., Gatehouse, D. G., Hodson- Walker, G., Morton, D. B.. Kirkland. D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, s. 313–319.

14. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Stai ning to the micronucleus Test. Mutation Res. 120, s. 241–247.

15. MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, s. 269–275.

16. Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res. 213, s. 91–104.

17. Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res*., 347, s. 97–99.

▼B

18. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D. J. Kirkland (ed) *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity testing.* Report, *Part I, revised.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Sydney, s. 115–141.

19. Loveli, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D. J. Kirkland (cd) *Statistical Evaluation oj Mutagenicity Test Dala. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼B

B.13/14 **MUTAGENICITET – TEST AV ÅTERMUTATION HOS BAKTERIER**

1. **METOD**

Denna metod är en kopia av OECD TG 471, Omvänt bakteriellt mutationstest (Bakterial Reserve Mutation Test (1997)).

1.1 INLEDNING

1 detta test av återmutation hos bakterier används aminosyraberoende stammar av *Salmonelle typhimurium* och *Escherichia coli* för att detektera punktmutationer, vilka innefattar substitution, addition eller deletion av ett eller några DNA-baspar (1) (2) (3). Testet bygger på principen att man detekterar mutationer som gör att redan existerande mutationer i teststammarna går tillbaka varvid den funktionella förmågan hos bakterierna att syntetisera en essentiell aminosyra återställs. De återmuterade bakterierna detekteras på grundval av sin förmåga att växa i frånvaro av den aminosyra som krävs hos den ursprungliga teststammen.

Punktmutationer är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor och mycket tyder på att punktmutationer i onkogener och suppressorgener för tumörer i somatiska celler är inblandade i bildning av tumörer hos människor och försöksdjur. Testet av återmutation hos bakterier är snabbt, billigt och relativt enkelt att utföra. Många av testarterna har ett flertal egenskaper som gör dem mera känsliga för detektion av mutationer inklusive responsiva DNA-sekvenser vid reversionssäten, ökad cellerpermeabilitet för stora molekyler och eliminering av reparationssystem för DNA eller förstärkning av felbenägna reparationsprocesser för DNA. Specificiteten hos teststammarna kan erbjuda en del nyttig information om de typer av mutationer som induceras av genotoxiska ämnen. En mycket stor databas med resultat för ett stort antal olika strukturer finns tillgänglig för tester av återmutation hos bakterier och väletablerade metoder har utvecklats för testning av kemikaler med olika fysisk-kemiska egenskaper, inklusive flyktiga ämnen.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

ett test av *återmutation* hos antingen *Salmonella* typhimurium eller *Escherichia coli* detekterar mutation i en aminosyraberoende stam (histidin respektive tryptofan), vilket ger en stam som är oberoende av en extern tillförsel av aminosyror.

mutagener som ger basparsubstitutioner är ämnen som orsakar en basförändring i DNA. I ett test av återmutation kan denna förändring uppträda vid sätet för den ursprungliga mutationen eller på ett andra säte i det bakteriella genomet.

mutagener som ger förskjutningar (frameshift) är ämnen som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA, vilket då ger en ändrad avläsningsordning i RNA.

▼B

1.3 INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Testet av återmutation hos bakterier utnyttjar prokaryota celler, vilka skiljer sig från däggdjursceller med avseende på sådana faktorer som upptag, metabolism, kromosomstruktur och processer för DNA-reparation. Tester som utförs in vitro kräver i allmänhet att det finns en yttre källa för metabolisk aktivering. Hos system för metabolisk aktivering in *vitro* kan inte förhållandena för däggdjur *in vivo* efterliknas helt och hållet. Testet ger därför ingen direkt information om den mutagena och den karcinogena potensen hos en substans i däggdjur.

Testet av återmutation hos bakterier används vanligen som en inledande undersökning av genotoxisk aktivitet och, i synnerhet, av aktivitet som inducerar punktmutationer. En omfattande databas har demonstrerat att många kemikalier som ger positiva resultat i detta test även uppvisar mutagen aktivitet i andra tester. Det finns exempel på mutagena ämnen som inte kan detekteras med hjälp av detta test. Skälen till dessa tillkortakommanden kan tillskrivas den specifika naturen hos den detekterade slutpunkten, skillnader i metabolisk aktivering, eller skillnader i biotillgänglighet. Å andra sidan kan faktorer som höjer känsligheten hos testet leda till en överskattning av den mutagena aktiviteten.

Testet av återmutation hos bakterier kan visa sig olämpligt för utvärdering av vissa klasser av kemikalier såsom starkt baktericida ämnen (t.ex. vissa antibiotika) och de som anses (eller är kända för att) interferera specifikt med systemet för cellreplikation hos däggdjur (t.ex. vissa inhibitorer av topoisomeras och vissa nukleosidanaloger). 1 sådana fall kan mutationstester på däggdjur vara mera lämpliga.

Även om många ämnen som ger positiva resultat i detta test är karcinogena för däggdjur, är korrelationen inte absolut. Den är beroende på kemisk klass och det finns karcinogener som inte kan detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som saknas i bakterieceller.

1.4 TESTMETODENS PRINCIP

Suspensioner med bakterieceller exponeras för testsubstansen i närvaro och i frånvaro av ett exogent system för metabolisk aktivering. 1 plattinkorporeringsmetoden blandas dessa suspensioner med en toppskiktsagar varpå plattor omedelbart görs på minimalmedium. I preinkubationsmetoden inkuberas behandlingsblandningen och sedan blandas denna med en toppskiktsagar innan plattor görs på minimalmedium. I båda metoderna räknas återmuterade kolonier efter två eller tre dagars inkubering och jämförs med antalet spontant återmuterade kolonier på kontrollplattor med lösningsmedel.

Ett flertal procedurer för att utföra testet av återmutation hos bakterier har beskrivits. Bland de som vanligtvis används ingår plattinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), preinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktue-ringsmetoden (9) (10) och suspensionsmetoden (11). Modifikationer för testning av gaser eller ångor har tidigare beskrivits (12).

▼B

De procedurer som beskrivs i metoden hänför sig primärt till plattinkorporerings- och preinkubationsmetoder. Inga av dem är acceptabla för att genomföra experiment både med och utan metabolisk aktivering. Vissa substanser kan detekteras mer effektivt med hjälp av preinkubationsmetoden. Dessa substanser tillhör kemiska klasser som innefattar korta kedjor med alifatiska nitrosaminer, tvåvärda metaller, aldehyder, azofärger och diazoföreningar, pyrolizidinalkoloider, allylföreningar och nitroföreningar (3). Det är även känt att vissa klasser av mutanter inte alltid detekteras med hjälp av standardprocedurer såsom plattinkorporeringsmetoden eller preinkubationsmetoden. Dessa bör uppfattas som ’speciella fall’ och det rekommenderas varmt att alternativa procedurer används för detektionen av dem. De följande ’speciella fallen’ bör identifieras (tillsammans med exempel på procedurer som kan användas för detektionen av dem): azofärger och diazoföreningar (3) (5) (6) (13), gaser och flyktiga kemikaler (12) (14) (15) (16) samt glykosider (17) (18). En avvikelse från standardproceduren måste vara vetenskapligt motiverad.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Förberedelser**

1.5.1.1 *Bakterier*

Nya kulturer med bakterier bör få växa till sig fram till den sena exponentiella eller tidiga stationära tillväxtfasen (ungefär 10^9 celler per ml). Kulturer som befinner sig i sen stationär fas bör inte användas. Det är viktigt att de kulturer som används i experimentet har en hög tider med livsdugliga bakterier. Titern kan fås fram antingen ur tillväxtkurvor från historiska kontrolldata, eller ur varje försök genom att bestämma antalet livsdugliga celler med hjälp av ett utstrykningsexperiment.

Den rekommenderade inkubationstemparaturen är 37 °C.

Minst fem bakteriestammar bör användas. Dessa bör inkludera fyra av *S. typhimurium* (TA 1535; Ta 1537 eller TA97a eller TA97; TA9S; och TA100) som har visat sig vara tillförlitliga och ge en reproducerbar respons i olika laboratorier. Dessa fyra stammar av *S*, *typhimurium* har GC-baspar vid det primära återmutationsstället och det är känt att de inte kan detektera vissa oxiderande mutagener, tvärbindande ämnen och hydraziner. Sådana substanser kan detekteras med hjälp av E. *coli* WP2-stammar eller *S.* typhimurium TA 102 (19) som har ett AT-baspar vid det primära återmutationsstället. Den rekommenderade kombinationen av stammar är därför:

— S. *lyphimurium* TA 1535,

— *S. typhimurium* TA1537 eller TA97 eller TA97a,

— 5. *typhimuriurn* TA98,

— *S. typhimurium* TA100, och

— *E. coli* WP2 uvrA, eller C. *coli* WP2 uvrA (pKM101), eller S. *typhimurium* TA102.

Fär att kunna detektera tvärbindande mutagener kan det vara lämpligt att inkludera TA102 eller att också använda en DNA-reparationsduglig stam av *E. coli* (t.ex. *E.coli* WP2 eller E. coli WP2 (pKM101)).

▼B

Etablerade procedurer för beredning av baskulturer, markörverifiering och lagring bör användas. Behovet av aminosyror för tillväxten bör påvisas för varje frusen preparation av baskulturer (histidin för stammar av *S. typhimurium* och tryptofan för stammar av *E. coli)*. Andra fenotypiska karakteristika bör kontrolleras på liknande sätt, nämligen närvaron eller frånvaron av R-faktorplasmider där detta är lämpligt (dvs. ampicillin-resi-stens i stammarna TA98, TA100 och TA97a eller TA97, WP2 uvrA och WP2 uvrA (pKM101) och ampicillin + tetracyklinreststens i stammen TA102); närvaron av karakteristiska mutationer (dvs. rfa-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för kristallviolett och uvrA-mutation i *E. coli* eller uvrB-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för ultraviolett ljus) (2) (3). Stammarna bör även ge spontant återmuterande platträkningar av kolonier inom de frekvensområden som kan förväntas från laboratoriets historiska kontrolldata och helst inom det område som rapporteras i litteraturen.

1.5.1.2 *Medium*

Använd en lämplig minimalagar (t.ex. innehållande Vogel-Bonner minimalmedium E och glukos) och ett agartoppskikt som innehåller histindin och biotin eller tryptofan, så att några stycken celldelningar ska kunna ske (1) (2) (9).

1.5.1.3 *Melabolisk aktivering*

Bakterier bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det vanligaste systemet som används är en post-mitokondriell fraktion där en kofaktor tillsatts (S9) vilken beretts ur lever från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (1) (2) eller en kombination av fenobarbiton och β-naftoflavon (18) (20) (21). Den post-mitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området från 5 till 30 % v/v i S9-blandningen. Valet av och betingelserna hos ett system för metabolisk aktivering kan bero på den klass av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen. För azofärger och diazoämnen, kan användning av ett reduktivt system för metabolisk aktivering vara lämpligare (6) (13).

1.5.1.4 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om detta är lämpligt, före det att bakterierna behandlas. Flytande testsubstanser kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut före behandling. Nygjorda beredningar bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Lösningsmedel/vehiklar bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenliga med bakteriernas överlevnad samt S9-aktivitet (22). Om man använder andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Därhelst det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

▼B

1.5.2 **Försöksbetingelser**

1.5.2.1 *Teststammar (se 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Exponeringskoncentration*

Cytotoxiciteteri och lösligheten i den slutliga behandlingsblandningen är några av de kriterier som man måste ta hänsyn till vid bestämningen av den högsta mängd av testsubstansen som ska användas.

Det kan vara bra att bestämma toxicitet och löslighet i ett förberedande experiment. Cytotoxicitet kan detekteras genom en minskning av antalet återmuterande kolonier, en uttunning eller minskning av bakgrundstillväxten, eller graden av överlevnad hos de behandlade kulturerna. Cytotoxiciteten hos en substans kan ändras i närvaro av system för metabolisk aktivering. Olöslighet bör fastställas som en utfällning i den slutliga blandningen, under de verkliga försöksbetingelserna och ska vara synlig för blotta ögat.

Den maximala rekommenderade testkoncentrationen för lösliga icke-cytotoxiska substanser är 5 mg/platta eller 5 µl/platta. För icke-cytotoxiska substanser som inte är lösliga vid 5 mg/platta eller 5 µl/platta, bör en eller flera av de koncentrationer som testas vara olösliga i den slutliga behandlingsblandningen. Testsubstanser som är cytotoxiska redan under 5 mg/platta eller 5 µl/platta bör testas upp till en cytotoxisk koncentration. Fällningen torde inte störa bestämningen.

Minst fem olika analyserbara koncentrationer av testsubstansen bör användas, med ungefär halva log-intervall (dvs. $\sqrt{10}$) mellan testpunkterna för ett inledande experiment. Mindre intervall kan vara lämpliga när ett koncentrationssvar håller på att undersökas. Testning över en koncentration på 5 mg/platta eller 5 µl/platta kan övervägas vid utvärdering av substanser som innehåller avsevärda mängder av potentiellt mutagena föroreningar.

1.5.2.3 *Negativa och positiva kontroller*

Samtidiga stamspecifika positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje försök. Positiva kontrollkoncentrationer som visar på det effektiva utfallet för varje försök bör väljas.

För försök där ett system för metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollreferenssubstansen väljas på basis av de typer av bakteriestammar som används.

De följande substanserna utgör exempel på lämpliga positiva kontroller för försök med metabolisk aktivering:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
9,10-dimetylantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetylbensantracen	57-97-6	200-359-5
bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5
2-aminoantracen	613-13-8	210-330-9

▼B

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	

Höljande substans är en lämplig positiv kontroll for den reduktiva metaboliska aktiveringsmetoden:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
kongorött	573-58-0	209-358-4

2-aminoantracen bör inte användas som den enda indikatorn på effektiviteten hos S9-blandningen. Om 2-aminoanracen används, bör varje sats av S9 även karakteriseras med en mutagen som kräver metabolisk aktivering med hjälp av mikrosomala enzymer, t.ex. bens[a]pyren, dimetylbensantracen.

Följande substanser utgör exempel på sortspecifika positiva kontroller för försök som utförs utan exogena system för metabolisk aktivering:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer	Stam
Natriumazid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 och TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA 15 37, TA 97 och TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 och TA 97a
Kumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA och TA 102
N-etyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA (pKM101)
4-nitroquinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA (pKM101)
Furylfuramid (AF2)	3688-53-7		plasmidinnehållande stammar

Andra lämpliga positiva kontrollreferenssubstanser kan användas. Användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av enbart lösningsmedel eller vehikel, utan testsubstans, och i övrigt hanterade på samma sätt som för de behandlade grupperna, bör inkluderas. Obehandlade kontroller bör dessutom även användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga farliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

▼B

1.5.3 **Förfarande**

Vid plattinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), utan metabolisk aktivering, blandas vanligen 0,05 ml eller 0,1 ml av testlösningarna, 0,1 ml av färsk bakteriekultur (innehållande ungefär 10^8 livsdugliga celler) och 0,5 ml av steril buffert med 2,0 ml av toppskiktsagar. För ett försök med metabolisk aktivering blandas vanligen 0,5 ml av en metabolisk aktiveringsblandning, vilken innehåller en adekvat mängd postmitokondriell fraktion (i området från 5 till 30 % v/v i den metaboliska aktiveringsblandningen) med toppskiktsagar (2,0 ml), tillsammans med bakterierna och testsubstansen/testlösningen. Innehållet i varje rör blandas och hälls över ytan på en minimalagarplatta. Toppskiktsagarn tillåts att stelna innan inkubering sker.

För förinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6), förinkuberas testsubstansen/testlösningen med teststamman (innehållande ungefär 10^8 livsdugliga celler) och steril buffert eller med system för metabolisk aktivering (0,5 ml), vanligen under 20 minuter eller längre vid 30–37 °C, innan den blandas med toppskiktsagarn och hälls uppå ytan på en minimalagarplatta. Vanligen blandas 0,05 eller 0,1 ml av testsubstansen/testlösningen, 0,1 ml bakterier och 0,5 ml av S9-blandningen eller steril buffert blandat med 2,0 ml av toppskiktsagar. Rören bör luftas under förinkubationen med hjälp av en skakmaskin.

För att möjliggöra en rimlig uppskattning av variationen bör tre plattor användas vid varje dosnivå. Användning av två plattor är acceptabelt när detta är vetenskapligt motiverat. Förlust av en enstaka platta innebär inte nödvändigtvis att ett försök blir ogiltigt.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med lämpliga metoder, såsom i slutna kärl (12) (14) (15) (16).

1.5.4 **Inkubering**

Alla plattor i en given assay bör inkuberas vid 37 °C under 48–72 timmar. Efter inkubationsperioden räknas antalet återmuterande kolonier per plattor.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör presenteras som antalet återmuterande kolonier per platta. Antalet återmuterande kolonier på såväl negativa (lösningsmedelskontroll och obehandlad kontroll, om en sådan används) och positiva kontrollplattor bör även anges. Individuella platträkningar, medelantalet för de återmuterande kolonierna per platta och standardavvikelsen bör uppges för såväl testsubstansen som för positiva och negativa (obehandlade och/eller (lösningsmedels) kontroller).

Der finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta negativa resultat bör detta motiveras. Vid uppföljningsexperiment bör man överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. De försöksparametrar som skulle kunna modifieras innefattar koncentrationsindelningen, metoden för behandling (plattinkorporering eller förinkubation i vätska), och betingelser för metabolisk aktivering.

▼B

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning över hela det testade området och/eller en reproducerbar ökning, vid en eller flera koncentrationer, av antalet återmuterande kolonier per platta för minst en stam, med eller utan ett system för metabolisk aktivering (23). Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (24). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om svaret är positivt

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av återmutation hos bakterier indikerar att substansen inducerar punktmutationer genom bassubstitutioner eller förskjutningar i genomet hos antingen *Salmonella typhimurium* och/eller *Escheri-chia coli.* Negativa resultat indikerar att testsubstansen inte är mutagen hos den testade sorten under dessa försöksbetingelser.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering för valet av lösningsmedel/vehikel

— testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt,

Stammar:

— stammar som används

— antalet celler per kultur

— karakteristika för stammen

Försöksbetingelser:

— mängd av testsubstansen per platta (mg/platta eller µl/platta) med grund för val av dos och antal plattor per koncentration

— använda medier

— typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier

— behandlingsprocedurer

Resultat:

— tecken på toxicitet

— tecken på utfällning

— individuella platträkningar

▼B

— medelantalet återmuterande kolonier per platta och standardavvikelse

— dos/respons-förhållande, där detta är möjligt

— statistiska analyser, om några sådana finns

— samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser

— historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Ames, B. N., McCann,). and Yamasaki E. (1975), Metods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenitic Test. *Mutation Res.,* 31, s. 347–364.

2. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.* 113, s. 173–215.

3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke. E., Kier, L. Matsushima, T. Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation *Res.* 312, s. 217–23 3.

4. Kier, L. D. , Brusick I., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M, Simmon, V. R, dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mam malian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 168, s. 69–240.

5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y. , Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters,* 1, s. 91–96.

6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273–285.

7. Gatehouse, D. G., Rowland, 1. R., Wilcox. P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicily Tests: UKEMS Part I Revised.* ed. D.). Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.

8. Aeschacher, H. U., Wolleb. U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. l:ood Safety,* 8, s. 167–177.

9. Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.,* 38, s. 33–42.

10. Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and Bridges,]. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, cd. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141–161.

▼B

11. Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella lyphimuriurn, Environmental Mutagenesis.* 3, s. 453–465.

12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.,* 307, s. 335–344.

13. Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Muta tion Res.,* 136, s. 33–47.

14. Zeiger, E., Anderson. B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ*. *Mol. Mutagen.,* 19, s. 2–141.

15. Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, *In Progress in Genetic Toxicology,* D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Ams terdam, s. 249–258.

16. Hughes, T.)., Simmons, D. M, Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmenlal Mutagenesis,* 9, s. 421–441.

17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmo nella* typhimurium, *Cancer Res.,* 39, s. 3780–3782.

18. Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Arnes, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci,*. USA, 77, s. 4961–4965.

19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.). and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella* typhimurium TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis,* 5, s. 285–291.

20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: in vitro *Metabolic Activation in* Mutagenesis *Testing,* eds. F. (. de Serres et al. Elsevier, North Holland, s. 85–88.

21. Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 175–177.

22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Arnes, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation *Res.,* 88, s. 343–350.

23. Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation *Res.,* 189, s. 83–91.

▼B

24. Mahon, G. A. T., Green, M. H. L, Middleton, B., Mitchel. I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part* II. *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Dala,* ed. Kirkland, D.]., Cambridge University Press, s. 28–65.

▼B

B. 15 **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 *bis* 1-7 markören som är en missensemutation som huvudsakligen tillbakamuterar vid mutationer i andra loci, och markören *bom* 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.

▼B

Metabolisk aktivering

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiveringssystem.

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, vävnader, 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, 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 ska användas jämsides. Lämpliga positiva kontrollämnen ska användas för varje enskild genetisk endpoint.

Exponeringskoncentration

Minst fem olika koncentrationer av testämnet med passande intervaller mellan koncentrationerna ska användas. För toxiska ämnen ska 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 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 ^{o}C i mörker.

Spontana mutationsfrekvenser

Subkulturer bör användas med spontana mutationsfrekvenser inom allmänt accepterade gränser.

▼B

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. *horn* 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 ska det bekräftas genom ett oberoende test.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och ange antal räknade kolonier, antal mutanter, överlevnadsfrekvens och mutationsfrekvens. Alla resultat ska bekräftas genom ett oberoende test. Utvärderingen av resultaten bör ske på grundval av en lämplig statistisk metod.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORTEN

Testrapporten ska 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 positiva och negativa kontroller.

— Antal räknade kolonier, antal mutanter, Överlevnadsfrekvens och mutationsfrekvens, förhållandet mellan dos och effekt när detta är möjligt, statistisk 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.

▼B

B.16 **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 till 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 *bis* 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.

▼B

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 a v negativa och positiva kontroller

Positiva kontroller, obehandlade kontroller och kontroller med lösningsmedel ska användas jämsides. Lämpliga positiva kontrollämnen ska användas för varje enskild genetisk endpoint.

Exponeringskoncentration

Minst fem olika koncentrationer av testämnet med passande intervaller mellan koncentrationerna ska 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 ska 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 rekombinations frekvenser

Subkulturer bör användas med spontana mutationsfrekvenser inom allmänt accepterade gränser.

▼B

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 ºC 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 ska det bekräftas genom ett oberoende test.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och ange antal räknade kolonier, antal rekombinanter samt rekombinationsfrekvens.

Alla resultat ska bekräftas genom ett oberoende test.

Utvärderingen av resultaten bör ske på grundval av en lämplig statistisk metod.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska 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, statistisk utvärdering av data.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

▼B

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.17 MUTAGENICITET – TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*

1. METOD

Denna metod är en kopia av OECD TG 476, Test av genmutationer hos däggdjursceller in vitro (*In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan användas för att detektera genmutationer som inducerats med hjälp av kemiska substanser. Lämpliga cellinjer innefattar L5178Y muslymfomceller, CHO-, CHO-AS52-och V79-linjerna från kinesiska hamsterceller och TK6 lymfoblastoidceller från människa (1). 1 dessa cellinjer mäter de vanligast använda genetiska slutpunkterna mutation av tymidinkinas (TK) och hypoxanthinguanin fosforibosyltransferas (HPRT), och en transgen av xanthin-guanin fosforibosyltransferas (XPRT). Mutationstesterna TK, HPRT och XPRT detekterar olika spektra av genetiska händelser. Den autosomala lokaliseringen av TK och XPRT kan göra det möjligt att detektera genetiska händelser (t.ex. stora deletioner) som inte detekteras vid HPRT-lokuset på X-kromosomer (2) (3) (4) (5) (6).

I genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan kulturer med etablerade cellinjer eller celltyper användas. De celler som används väljs ut på basis av tillväxtförmåga vid odling och stabilitet med avseende på spontan mutationsfrekvens.

Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Detta system för metabolisk aktivering kan inte fullt ut efterlikna förhållandena in *vivo* hos däggdjur. Försiktighet bör iakttagas så att man undviker förhållanden som skulle kunna leda till resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten. Positiva resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten kan uppkomma från förändringar i pH, osmolalitet eller hög cytotoxicitet (7).

Detta test används för att undersöka möjliga mutagener och karcinogener i däggdjur. Många ämnen som är positiva i detta test är karcinogena i däggdjur. Det föreligger dock ingen perfekt korrelation mellan detta test och karcinogenicitet. Korrelationen är beroende på den kemiska klassen och det finns allt fler bevis för att det finns karcinogener som inte detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar uppträda genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som är frånvarande i bakterieceller (6).

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

framåtmutation: en genmutation från den parentala typen till den mutanta formen, vilket ger upphov till en förändring eller en förlust av den enzymatiska aktiviteten i funktionen hos det protein som bildas.

mulagener som ger basparsubstitutioner: substanser som orsakar substitution av ett eller flera baspar i DNA.

förskjutnings (frameshift)-mutagene: substanser som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA-molekylen.

▼B

fenotypisk expressionslid: en period under vilken celler som nyligen muterat töms på oförändrade genprodukter. *mutantfrekvens:* antalet mutanta celler som observerats, delat med antalet livskraftiga celler.

relativ total tillväxt: ökningen av antalet celler över tiden jämfört med en kontrollpopulation av celler, beräknat som produkten av suspensionstillväxten i förhållande till den negativa kontrollen, gånger kloningseffektiviteten i förhållande till den negativa kontrollen.

relativ suspensionstillväxt: ökning av cellantalet delat med expressionsperioden i relation till den negativa kontrollen.

viabilitel: kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna vid tiden för utstryk på platta, under selektiva betingelser efter expressionsperioden.

överlevnad: kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna när utstryk på platta sker vid behandlingsperiodens slut.

Överlevnaden uttrycks vanligen i förhållande till överlevnaden hos kontrollens cellpopulation.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Celler som lider brist pä tymidinkinas (TK), beroende på mutationen $TK^{\pm}$ —> $TK^{+/-}$, är resistenta mot de cytotoxiska effekterna av pyrimidinanalogen trifluortymidin (TFT). Celler med väl fungerande tymidinkinas är känsliga för TFT, eftersom TFT ger upphov till inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celldelning. Mutanta celler kan således utvecklas i närvaro av TFT, medan däremot normala celler, som innehåller tymidinkinas, inte klarar detta. Celler som lider brist på HPRT eller XPRT kan på liknande sätt väljas ut genom resistens mot 6-tioguanin (TG) eller 8-azaguanin (AG). Egenskaperna hos testsubstansen bör noggrant gås igenom om en basanalog eller ett ämne som är relaterat till det selektiva ämnet testas i något av testerna för genmutationer i däggdjursceller. Exempelvis bör varje misstänkt selektiv toxicitet hos testsubstansen mot mutanta och icke-mutanta celler undersökas. Det sätt som det selekterande systemet/ämnet fungerar på, måste således bekräftas när man testar kemikalier som är strukturellt relaterade med det selektiva ämnet (8).

Celler i suspension eller kulturer i form av ett enkelskikt exponeras för testsubstansen, både med och utan metabolisk aktivering, under en lämplig tidsperiod och subkultiveras för att bestämma cytotoxiciteten och för att tillåta fenotypisk expression innan mutantvalet sker (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxiciteten bestäms i vanliga fall genom att mäta den relativa kloningseffektiviteten (överlevnad) eller den relativa totala tillväxten för kulturerna efter behandlingsperioden. De behandlade kulturerna bibehålls i ett tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje selekterat lokus och celltyp, för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer. Mutationsfrekvensen bestäms genom att inockulera ett känt antal celler i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutanta celler, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas cellerna. Mutationsfrekvensen erhålls från antalet mutanta kolonier i selektivt medium och antalet kolonier i icke-selektivt medium.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Celler*

Det finns ett antal olika celltyper som kan användas i detta test, inklusive subkloner från L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 eller TK6-celler. De celltyper som används i detta test bör ha en demonstrerad känslighet mot kemiska mutagener, en hög kloningseffektivitet och en stabil spontan mutationsfrekvens. Cellerna bör kontrolleras med avseende på kontaminering från mykoplasma och bör inte användas om kontaminering skett.

Testet bör utformas på ett sådant sätt att det har en förutbestämd känslighet och styrka. Antalet celler, kulturer och koncentrationer av testsubstansen som används bör reflektera dessa definierade parametrar (14). Det minsta antalet livskraftiga celler som överlever behandlingen och används vid varje stadium av testet bör baseras på den spontana mutationsfrekvensen. En generell regel är att använda ett cellantal som är minst tio gånger det inverterade värdet av den spontana mutationsfrekvensen. Det rekommenderas dock att minst 10^6 celler används. Adekvata historiska data för det cellsystem som används bör vara tillgängliga för att kontrollera att testet ger reproducerbara resultat.

1.4.1.2 *Betingelser för media och kulturer*

Lämpliga kulturmedia och inkubationsbetingelser (odlingskärl, temperatur, CO_2-koncentration och luftfuktighet) bör användas. Mediet bör väljas ut i enighet med de selektiva system och celltyper som används i testet. Det är särskilt viktigt att betingelserna för kulturerna väljs på ett sådant sätt att man säkrar en optimal celltillväxt under expressionsperioden och en förmåga till bildning av kolonier för både mutanta och icke-mutanta celler.

1.4.1.3 *Förberedelse av kulturer*

Celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium och inkuberas vid 37 °C. Innan de används i detta test kan kulturerna behöva tvättas rena från redan existerande mutanta celler.

1.4.1.4 *Metabolisk aktivering*

Celler bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det system som vanligen används är en postmitokondriell fraktion som tillsatts en kofaktor (S9), beredd ur levern från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) eller en kombination av fenobarbiton och β-naftoflavon (19) (20).

Den postmitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området 1–10 % v/v i det slutliga testmediet. Valet av och betingelserna för ett system för metabolisk aktivering kan vara beroende av klassen av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen.

▼B

Ett antal vidareutvecklingar, inklusive konstruktion av genetiskt modifierade cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer, kan ge en potential för endogen aktivering. Valet av de cellinjer som används bör vara vetenskapligt motiverat (t.ex. genom relevansen av cytokrom P450 isoenzym för metabolismen av testsubstansen).

1.4.1.5 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut innan cellerna behandlas, om detta är lämpligt. Flytande testsubstanser kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut innan behandlingen startas. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata tyder på att lagring kan accepteras.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenlig med överlevnaden för cellerna samt S9-aktiviteten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas data som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar i första hand bör övervägas närhelst det är möjligt. När substanser som är instabila i vatten testas, bör de organiska lösningsmedel som används vara fria från vatten. Vatten kan avlägsnas genom tillsats av en molekylsikt.

1.4.2.2 *Exponeringskoncentrationer*

Bland de kriterier som ska övervägas när den högsta koncentrationen ska fastställas är cytotoxicitet, löslighet i testsystemet och förändringar i pH eller osmolalitet.

Cytotoxicitet bör fastställas såväl med som utan metabolisk aktivering i huvudexperimentet med hjälp av lämplig indikation på cellernas integritet och tillväxt, såsom relativ kloningseffektivitet (överlevnad) eller relativ total tillväxt. Det kan vara lämpligt att fastställa cytotoxicitet och löslighet i ett förberedande experiment.

Minst fyra analyserbara koncentrationer bör användas. Där cytotoxicitet uppträder bör dessa koncentrationer täcka in ett område som sträcker sig från maximal toxicitet ner till liten eller ingen toxicitet. Detta innebär normalt att koncentrationsnivåerna bör separeras av minst en faktor mellan 2 och \10. Om den maximala koncentrationen är baserad på cytotoxicitet bör detta då resultera i ungefär 10–20 % (men inte mindre än 10 %) relativ överlevnad (relativ kloningseffektivitet) eller relativ total tillväxt. För relativt icke-cytotoxiska substanser, bör den maximala testkoncentrationen vara 5 mg/ml, 5 µl/ml eller 0,01 M, beroende på vilket som är det lägsta.

▼B

Relativt olösliga substanser bör testas upp till eller över sin löslighetsgräns under odlingsbetingelserna för kulturen. Bevis för olöslighet bör bestämmas i det slutliga behandlingsmediet för vilket cellerna exponeras. Det kan vara lämpligt att fastställa lösligheten vid behandlingens början och slutpunkt, eftersom lösligheten kan förändras under exponeringsförloppet i testsystemet beroende på närvaron av celler, S9, serum, etc. Olöslighet kan detekteras med hjälp av blotta ögat. Fällningen torde inte störa bestämningen.

1.4.2.3 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje experiment. När metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollkemikalien vara av sådant slag att den kräver aktivering för att ge ett mutagent svar.

I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Betingelser för metabolisk akti-vering	Lokus	Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Frånvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (små och stora kolonier)	Metylmetansulfonat	66-27-3	200-62 5-0
	XPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Närvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	3-Metylkolantren	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimetylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetylbensantraccn	57-97-6	200-359-5
	TK (små och stora kolonier)	Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
		Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
		Bcns[a]pyrcn	50-32-8	200-028-5
		3-Metylkolantren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimetylamin (för höga nivåer av S-9)	62-75-9	200-549-8
		Bens[*a*]pyren	50-32-8	200-028-5

Andra lämpliga referenssubstanser för positiv kontroll kan användas, t.ex. om ett laboratorium har en historisk databas med 5-brom-2'-deoxiuridin [CAS-nummer 59-14-3, ElNECS-nummer 200-415-9] skulle även denna referenssubstans kunna användas. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

▼B

Negativa kontroller, bestående av enbart ett lösningsmedel eller en vehikel i behandlingsmediet och behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna bör inkluderas. Dessutom bör även obehandlade kontroller användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

1.4.3 **Förfarande**

1.4.3.1 *Behandling med testsubstansen*

Prolifererande celler bör exponeras för testsubstansen både med och utan metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är 3–6 timmar effektivt). Exponeringstiden kan utsträckas över en eller flera cellcykler.

Antingen en eller två behandlade kulturer kan användas vid varje koncentration som testas. När enstaka kulturer används, bör antalet koncentrationer ökas så att ett adekvat antal kulturer säkerställs för analys (t.ex. minst åtta analyserbara koncentrationer). Två negativa (lösningsmedels-) kontrollkulturer bör användas.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med hjälp av lämpliga metoder, såsom slutna odlingskärl (21) (22).

1.4.3.2 *Mätning av överlevnad, viabilitet och mutantfrekvens*

Mot slutet av exponeringsperioden tvättas cellerna och odlas för att bestämma överlevnad och för att medge att den mutanta fenotypen uttrycks. Mätning av cytotoxicitet, genom en bestämning av den relativa kloningseffektiviteten (överlevnad) eller relativa totala tillväxten för kulturerna, initieras normalt efter behandlingsperioden.

Varje lokus har definierade krav på minimitid, så att närmast optimal fenotypisk expression av nyligen inducerade mutanter medges (HPRT och XPRT kräver minst 6–8 dagar och TK minst två dagar). Celler odlas ofta i ett medium med och utan selektiva ämnen för att såväl antalet mutanter som kloningens effektivitet ska kunna bestämmas. Mätningen av viabiliteten (används för att beräkna mutantfrekvensen) initieras vid slutet av expressionstiden genom utstryk på platta i ett icke-selektivt medium.

Om testsubstansen är positiv i testet L5178Y TK+/-, bör storleksmätning av kolonierna utföras på åtminstone en av testkulturerna (den högsta positiva koncentrationen) och på de negativa och positiva kontrollerna. Om testsubstansen är negativ i testet L5178Y TK+/-, bör storleksmätning av kolonierna utföras på de negativa och positiva kontrollerna. I undersökningar där TK6TK+/- används, kan storleksmätning av kolonierna utföras även där.

▼B

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör inkludera en bestämning av cytotoxicitet och viabilitet, räkning av kolonier och mutantfrekvenser för de behandlade kulturerna och kontrollkulturerna. Om testet L5178Y TK+/- ger ett positivt svar, påvisas kolonier utifrån kriterier för små och stora kolonier för åtminstone en koncentration av testsubstansen (högsta positiva koncentrationen) och för de negativa och positiva kontrollerna. Den molekylära och cytogenetiska naturen hos både stora och små mutanta kolonier har undersökts mycket ingående (23) (24). I testet TK+/-påvisas kolonier utifrån kriterier för normal tillväxt (stora) och långsam tillväxt (små) av kolonier (25). Mutanta celler som har utsatts för den mest omfattande genetiska skadan uppvisar förlängda dubbleringstider och bildar därför små kolonier. Denna skada sträcker sig typiskt i en skala från förlust av hela genen till karyotypiskt synliga kromosomavvikelser. Induktion av mutanter som ger små kolonier har associerats med kemikalier som inducerar omfattande kromosomavvikelser (26). Mutanta celler som är mindre allvarligt påverkade växer med hastigheter liknande de som parentala celler uppvisar och bildar stora kolonier.

Överlevnad (relativa kloningseffektiviteter) eller relativ total tillväxt bör anges. Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet mutanta celler per antalet celler som överlever.

Individuella data för kulturerna bör anges. Alla data bör dessutom sammanfattas i tabellform.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta ett negativt resultat bör detta motiveras. Vid tvetydiga eller negativa resultat bör man vid uppföljningsexperiment överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. Försöksparametrar som kan behöva modifieras inkluderar koncentrationsstegen och villkoren för metabolisk aktivering.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATET

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en reproducerbar ökning i mutationsfrekvensen. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultatet. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

▼B

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av genmutationen *in vitro* hos däggdjursceller indikerar att testsubstansen inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används. Ett positivt koncentrationssvar som är reproducerbart är mycket meningsfullt. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering för valet av vehikel/lösningsmedel

— testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Celler:

— cellernas typ och källa

— antalet cellkulturer

— antalet cellpassager, om detta är tillämpligt

— metoder för bibehållande av cellkulturen, om detta är tillämpligt

— frånvaro av mykoplasma

Försöksbetingelser:

— grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive t.ex. data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar, om dessa finns att tillgå

— mediernas sammansättning, CO_2-koncentration

— testsubstansens koncentration

— den tillsatta vehikelns och testsubstansens volym

— inkubationstemperatur

— inkubationstid

— behandlingens varaktighet

— celldensitet under behandlingen

— typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier

— positiva och negativa kontroller

▼B

— expressionsperiodens varaktighet (inklusive antalet celler som inokulerats, samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt)

— selektiva ämnen

— kriterier för när tester ska anses som positiva, negativa eller tvetydiga

— metoder som används för att räkna antalet livskraftiga och muterade celler

— definition av kolonier vars storlek och typ ska beaktas (inklusive kriterier för ”små” och ”stora” kolonier, där detta är tillämpligt)

Resultat:

— tecken på toxicitet

— tecken pä utfällning

— data för pH och osmolalitet under det att exponering för testsubstansen sker, om sådana data har upp mätts

— koloniernas storlek (i de fall de räknats) för åtminstone negativa och positiva kontroller

— laboratoriets möjligheter att detektera mutanter som ger små kolonier med L5178Y TK+/–systemet, där detta är tillämpligt

— dos/respons-förhållande, där detta är möjligt

— statistiska analyser, om sådana finns

— samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata

— historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden och stan dardavvikelser

— mutationsfrekvens

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Moore, M. M., DeMarini, D. M. DeSerres, F. J. and Tindal, K. R. (eds.) (1987), *Banbury* Report *28; Mam-malian Cell Mutagenesis,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

2. Chu, E. H. Y. and Malling H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In* Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, s. 1306–1312.

3. Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.,* 94, s. 467–485.

4. Moore, M. M.. Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quanti tation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis,* s. 394–403.

▼B

5. Aaron, C. S., and Stankowski, Jr. L. F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of the Six Drug Candidates, *Mutation Res.,* 223, s. 121–128.

6. Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.,* 312, s. 235–239.

7. Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991) Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 25 7. s. 147–204.

8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, s. 225–251.

9. Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, Mutation Res,, 196, s. 17–36.

10. Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C, Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.,* 189, s. 135–141.

11. Liber, H. L, Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.,* 216, s. 9–17.

12. Stankowski, L. F. Jr., Tindal,, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate and 1CR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*. 160, s. 133–147.

13. Turner, N. T., Balton, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L51 78Y/$TK^{+/-}$ – $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B.J. et all (eds.) *Handbook oj Mutagenicity Test Procedures,* Else-vier Science Publishers, New York, s. 239–268.

14. Arlett, C. F.. Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, s. 66–101.

15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome- Activated Dimethyllnitrosamine, *Mutation Res.,* 46, s. 365–373.

16. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, s. 347–364.

▼B

17. Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.,* 59, s. 61–108.

18. Maron, D. M. and Arnes, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutuation Res..* 113, s. 173–215.

19. Elliott, E. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis* 7, s. 175–177.

20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polycholrinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in:In *Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

21. Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L, Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* New York, Plenum, s. 91–103.

22. Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Gollagen Gels tor Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis,* 5, s. 795–801.

23. Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier. J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87, s. 51–55.

24. Moore, M. M., Clive, D. Hozier, J. C, Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluoronthymidine, Resistant (TFT) Mutants of L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 151, s. 161–174.

25. Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.,* 229, s. 89–102.

26. Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- – 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis,* 5, s. 609–614.

▼B

B.18 **DNA-SKADA OCH DNA-REPARAT1ON – 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.

▼B

Användning av negativa och positiva kontroller

Positiva och negativa (obehandlade och/eller vehikel) kontroller ska 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 rnetabolisk 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 ska 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 ska användas. Etablerade cellinjer ska 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.

▼B

Exponering av kulturerna för tes t ämnet

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 ämnena, 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 ska 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.

▼B

Alla resultat ska 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. Distributionen av inkorporeringen kan beskrivas genom användning av medel dpm/μg DNA med tillhörande standardavvikelse.

Utvärderingen av resultaten ska grundas på en lämplig statistisk metod.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska 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.

▼B

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.19 **TEST AVSEENDE SYSTERK ROMATIDBYTEN *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 ska 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) ska 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.

▼B

— 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 negativa och positiva kontroller

Som positiv 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.

Exponerings koncentration

Minst tre koncentrationer av testämnet med passande intervaller mellan koncentrationerna ska 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 for 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 kulturerna 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 heparinerat blod och inkuberas vid 37 °C.

▼B

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 till 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 ska 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 statistiska metoder.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska 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 (data 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.

▼B

B.20 **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 meterozy-gotiskt hondjurs avkomma. I SLRL-testet utnyttjas detta förhållande med hjälp av speciellt märkta och arrangerade kromosomer.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

S t a m m a r

Handjur av väldefinierade vildtypstammar och hondjur från Muller-5-stammen kan användas. Lämpligt märkta hondjur från andra stammar och multipelt inverterade X-kromosomer kan också användas.

T e s t ä m n e

Testämnet upplöses i vatten. Ämnen som är ouppl̈osliga 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.

▼B

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 ska 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 ska utföras. Om det finns data från tidigare laboratorieförsök är det dock inte nödvändigt att utföra sidlöpande kontroll.

Exponeringskoncentration

Tre koncentrationsnivåer ska 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 varannan 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 ska 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.

▼B

Utvärderingen av en könsbunden recessiv letal test ska grundas på lämpliga statistiska metoder. Kluster av generationer med recessiva letala gener som stammar från ett enda handjur ska registreras och utvärderas på grundval av en lämpligt statistisk metod.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska 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.

▼B

B.21 **CELLTRANSFORMATIONSTEST PÅ DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO***

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITION

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Kulturer av däggdjursceller kan användas för upptäckt av fenotypiska förändringar *in vitro* som inducerats av kemiska förbindelser i samband med maligna transformationer *in vivo.* De mest använda celltyperna är C3H10TlVi, 3T3, SHE, Fischer-råtta, och testerna bygger på förändringar i cellmorfologin, fokusbildning eller egenskapen att kunna växa i mjuk agar. Det finns också mindre vanligt använda stammar som används för undersökning av andra fysiologiska eller morfologiska förändringar i celler till följd av exponering för cancerogena kemiska förbindelser. Inga direkta verkningsmekanismförbindelser mellan cancer och de genetiska endpoints som används i dessa tester *in vitro* finns beskrivna. Några av testsystemen kan användas för upptäckt av tumörpromotorer. Den cytotoxiska effekten kan bestämmas genom mätning av testämnets verkan på kolonibildande (kloniseringseffektiviteten) eller kulturernas växtfrekvens. Syftet med mätningen av den cytotoxiska effekten är att konstatera om exponering för testämnet är toxikologiskt relevant, men kan inte användas för beräkning av transformationsfrekvensen i alla tester, eftersom vissa kräver lång inkubationstid och/eller överföring till nya plattor.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

C e l l e r

En rad olika cellinjer eller primärlinjer kan användas beroende på vilken transformationstest som görs. Försöksledaren måste säkerställa att använda celler genomgår relevanta fenotypiska förändringar efter exponering för kända cancerogener, och försöksledarens eget laboratorium måste ha bevisat och dokumenterat det använda testets validitet och trovärdighet.

M e d i u m

Medium och försöksbetingelser som är lämpliga för transformationstest ska användas.

▼B

Testämne

Testämnet tillsätts i ett kulturmedium eller upplöses eller suspenderas i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras. Koncentrationen av vehikeln bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft eller växtegenskaper.

Metabolisk aktivering

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiveringssystem. Om celltyper med endogen metabolisk aktivering används bör det vara bevisat att aktiveringsform och -hastighet är lämpligt för den kemiska klass som testas.

Testbetingelser

Användning a v negativa och positiva kontroller

Som positiva kontroll används vid varje enskilt försök både en direkt verkande kemisk förbindelse och en förbindelse som kräver metabolisk aktivering. Dessutom företas negativ (vehikel) kontroll.

Följande kemiska förbindelser kan t.ex. användas till positiv kontroll:

— direktverkande förbindelser:

  — etylmetansulfonat,

  — H-propiolacton,

— förbindelser som kräver metabolisk aktivering:

  — 2 -acetylaminofluoren,

  — 4-dimetylaminoazobenzen,

  — 7,12-dimetylbenzanthracen.

Vid behov kan en supplerande positiv kontroll göras med användning av en kemisk förbindelse av samma typ som testämnet.

Exponeringskoncentration

Flera koncentrationer av testämnet ska användas. Dessa koncentrationer bör framkalla en koncentrationsrelaterad toxisk verkan. Den högsta koncentrationen bör medföra en låg överlevnadsgrad och överlevnadsgraden vid den lägsta koncentrationen bör vara av samma storlek som vid det negativa kontrollförsöket. Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet. Den högsta koncentrationen av icke-toxiska testämnen, som är fritt lösliga i vatten, fastställs från test till test.

▼B

Testförfarande

Cellerna bör exponeras under för det använda testsystemet passande period. Detta kan inbegripa upprepad dosering åtföljt av en ändring av medium (och vid behov ny metabolisk aktivering) om det är fråga om långvarig exponering. Celler vars endogena metaboliska aktivering är otillräcklig testas både med och utan ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Efter exponeringen tvättas cellerna fria från testämne. Därefter odlas de i syfte att låta den transformerade fenotyp som testet bygger på komma till uttryck och i syfte att bestämma transformationsfrekvensen. Alla resultat ska bekräftas genom ett oberoende test.

2. **DATA**

Data ska ställs upp i tabellform och kan ta sig olika uttryck beroende på använt testsystem. Det kan t.ex. röra sig om räkning av plattor, positiva plattor eller antal transformerade celler. Vid behov anges överlevnadsgraden som en procentdel av överlevnaden i kontrollförsöken, och transformationsfrekvensen uttrycks som antal transformerade celler per överlevande. Utvärderingen av data grundas på lämpliga statistiska metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd celltyp, antal cellkulturer, metoder för bibehållande av cellkulturer.

— Testbetingelser: Testämnekoncentration, använd vehikel, inkubationstid, testets varaktighet och frekvens, celltäthet under exponeringen, använt exogent metaboliskt aktiveringssystem, positiva och negativa kontroller, specifikation av den fenotyp som testet bygger på, använt selektivt system (om sådant har använts), motivering för val av doser.

— Metoder för registrering av livskraftiga och transformerade celler.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.22 DOMINANT LETAL TEST PÅ GNAGARE

1. METOD

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Dominanta letala verkningar leder till att embryot eller fostret dör. När dominanta letala mutationer framkallas genom exponering för en kemisk ämne är det ett tecken på att försöksdjurartens könscellvävnader har skadats. Det råder bred enighet om att dominanta letala gener uppstår till följd av kromosomskador (strukturella och numeriska anomalier). Om exponerade handjurs avkomma dör på det embryonala stadiet kan även detta skyllas på toxiska verkningar.

Normalt exponeras handjur för testämnet och paras med jungfruliga hondjur. Könscellernas olika stadier kan undersökas separat genom att använda på varandra följande parningsperioder. Ökningen av antalet döda implantater per hondjur i den exponerade gruppen i förhållande till antalet döda implantater per hondjur i kontrollgruppen visar den letala verkan efter implantation. Det letala verkan före implantation kan bedömas på grundlag av räkning av corpora lutea eller genom sammanslagning av det totala antalet implantater per hondjur i de exponerade grupperna och kontrollgruppen. Den totala dominanta letala verkan är summan av de letala verkningar före och efter implantation. Beräkningen av den totala dominanta letala verkan grundas på sammanräkning av antalet levande implantater per hondjur i försöksgruppen och antalet levande implantater per hondjur i kontrollgruppen. En minskning av antalet implantater under bestämda tidsperioder kan skyllas på celldöd (av spermacyter och/eller spermatogoner).

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

Testämnet upplöses eller suspenderas i fysiologisk saltlösning. Kemiska förbindelser som inte är lösliga i saltlösning ska lösas eller suspenderas i lämplig vehikel. Den vehikel som används får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter. Nyligen framställda lösningar av testämnet ska användas.

▼B

Försöksbetingelser

Tillförselväg

Testämnet ska vanligen endast tillföras en gång. På grundval av toxikologisk information kan upprepad behandling användas. Vanligtvis tillförs testämnet genom oral intubering eller intraperitoneal injicering. Även andra tillförselvägar kan användas

Försöksdjur

Råttor och möss rekommenderas som försöksdjur. Friska könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Antal och kön

Ett lämpligt antal handjur bör användas, med hänsyn tagen till den spontana variationen i den biologiska egenskap som utvärderas. Beslutet om hur många djur som ska användas bör grundas på den på förhand fastställda känsligheten för upptäckt och betydelsegrad. Vid ett typiskt försök ska det finnas tillräckligt med handjur för att uppnå 30–50 dräktiga hondjur varje parningsperiod.

Användning a v negativa och positiva kontroller

Normalt görs sidlöpande positiva och negativa (vehikel) kontroller för varje försök. Om det finns godtagbara positiva kontrollresultat från nyligen genomförda försök i samma laboratorium kan dock dessa användas i stället för sidlöpande positiv kontroll. Positiva kontrollämnen används i tillräcklig låga doser (t.ex. MMS i. p., 10 mg/kg) för att visa testens känslighet.

Dosnivåer

Normalt används tre olika dosnivåer. Den högsta dosnivån bör orsaka tecken på toxiska verkningar eller minskad fertilitet hos de exponerade djuren. I vissa fall räcker det med en enda hög dosnivå.

Gränstest

Icke-toxiska ämnen testas vid 5 g/kg i en enda dos eller vid upprepad tillförsel av 1 g/kg/dag.

Förfarande

Flera olika doseringsscheman kan användas. Normalt ges hela dosen på en gång men andra behandlingsscheman kan också användas.

Efter behandling paras handjuren med lämpliga intervaller individuellt med 1–2 jungfruliga hondjur. Hondjuren placeras hos handjuren under en period som motsvarar minst en äggcykel, eller tills parning har skett, vilket konstateras genom närvaron av sperma i vaginan eller närvaron av en vaginalpropp.

▼B

Antal parningar efter behandlingen fastställs på grundval av doseringsschemat och bör säkerställa att alla könscellsstadier är representerade efter doseringen.

Hondjuren avlivas under den andra hälften av dräktigheten och innehållet i livmodern undersöks för bestämning av antalet levande och döda implantat. Äggstockarna undersöks för bestämning av antalet corpora lutea.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och ange antal handjur samt antal dräktiga och icke dräktiga hondjur. Resultaten av varje enskild parning, inbegripet identifiering av varje han- och hondjur, ska anges separat. För varje hondjur anges parningsvecka, handjurets dos och antalet levande och döda implantat.

Beräkningen av den totala dominanta letala verkan grundas på jämförelse av antal levande implantat per hondjur hondjur i försöksgruppen och antalet levande implantat per hondjur i kontrollgruppen. Förhållandet mellan döda och levande implantat i försöksgruppen i jämförelse med förhållandet i kontrollgruppen analyseras för bestämning av den letala verkan efter implantation.

Om data registreras som tidiga eller sena dödsfall ska detta framgå av tabellerna. Om en utvärdering av den letala verkan sker före implantation ska denna anges. Den letala verkan före implantation kan beräknas som skillnaden mellan antalet *corpora lutea* och antalet implantater eller som en minskning av det genomsnittliga antalet implantat per livmoder i jämförelse med kontrollparningarna.

Utvärderingen av resultat ska grundas på en lämplig statistisk metod.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, de använda djurens ålder och vikt, antal djur av varje kön i försöks- och kontrollgrupperna.

— Testämne, vehikel, testade dosnivåer och motivering för val av doser, negativa och positiva kontroller.

— Tillförselväg och dosens varaktighet.

— Parningsschema.

— Metod för bestämning av om parning skett.

— Tidpunkt för avlivning.

— Kriterier för registrering av dominanta letala gener.

— Förhållandet mellan dos och reaktion när detta är möjligt.

▼B

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.23 SPERMATOGONIAL TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 483, Spermatogonial test av kromosomavvikelser hos däggdjur (Mammalian Spermatogonial Chromosomc Aberration Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Ändamålet med testet av spermatogoniala avvikelser *in vivo* hos däggdjur, är att identifiera de substanser som orsakar strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala celler hos däggdjur (1) (2) (3) (4) (5). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Majoriteten av de kemiska mutagenerna inducerar avvikelser av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. Denna metod är inte utformad för att mäta numeriska avvikelser och används inte rutinmässigt för detta ändamål. Kromosommutationer och relaterade händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor.

Detta test mäter kromosomhändelser i spermatogoniala könsceller och förväntas därför utgöra en förutsägelse på induktion av ärftliga mutationer i könsceller.

Gnagare används rutinmässigt i detta test. Detta cytogenetiska test *in vivo* detekterar kromosomavvikelser i spermatogoniala mitoser. Andra målceller omfattas inte av denna metod.

För att detektera avvikelser av kromatidtyp i spermatogoniala celler, bör den första mitotiska celldelningen efter behandlingen undersökas innan dessa skador förloras i de påföljande celldelningarna. Ytterligare information från behandlade spermatogoniala stamceller kan erhållas genom meiotisk kromosomanalys av avvikelser av kromosomtyp vid diakinesmetafas I, när de behandlade cellerna förvandlas till spermatocyter.

Detta *in vivo*-test är utformat för att undersöka om mutagener för somatiska celler även är aktiva i könsceller. Det spermatogoniala testet är dessutom relevant för att fastställa risken för mutagenicitet, eftersom det medger att faktorer för *in vivo* metabolism, farmakokinetik och reparationsprocesser för DNA beaktas.

Ett antal generationer av spermatogonier finns närvarande i testikeln med ett spektrum av känslighet för kemisk behandling. De avvikelser som detekteras representerar alltså ett samlat svar på behandlade spermatogoniala cellpopulationer, där de mera talrika differentierade spermatogoniala cellerna överväger. Olika generationer av spermatogonier kan där komma i kontakt med det stora kretsloppet. Om detta sker eller ej avgörs av deras position inne i testikeln, beroende på den fysiska och fysiologiska Sertoli-cellbarriären och på blod/testikelbarriären.

Om det finns bevis för att testsubstansen, eller en reaktiv metabolit, inte kommer att nå fram till målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, del B.

▼B

1.2 DEFINITIONER

avvikelse av kromatidtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

avvikelse av kromosomtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott och återförening, på båda kromatiderna på samma ställe.

lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden på en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer från det normala antalet karakteristiskt för det försöksdjur som används.

polyploidi: en multipel av det haploida kromosomantalet (n) som skiljer sig från det diploida (dvs. 3n, 4n osv.).

strukturell avvikelse: en förändring av kromosomstrukturen som är detekterbar med hjälp av en mikroskopisk undersökning av metafasstadiet vid celldelning, observerad i form av deletioner, interna eller externa utbyten.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjur exponeras för testsubstansen genom ett lämpligt exponeringssätt och avlivas sedan vid en lämplig tid efter behandling. Innan avlivningen sker, behandlas försöksdjuren med en substans som gör att celldelningen stannar upp i metafas (t.ex. colchicin eller Colcemid®). Kromosomberedninger görs sedan från könsceller och färgas in, varpå de celler som är i metafas analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Handjur av kinesiska hamstrar och möss används i stor utsträckning. Det är även möjligt att använda hanar från andra lämpliga däggdjursarter. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna djur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen ska påbörjas är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga ± 20 % av medelvikten.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren ska ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar innan undersökningen börjar.

▼B

1.4.1.4 *Beredning av doser*

Festa testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas, om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger att använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa (lösningsmedel/vehikel) kontroller bör inkluderas i varje test. Utom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett sätt om är identiskt med sättet för försöksdjuren i de grupper som behandlas.

Positiva kontroller bör de strukturella kromosomavvikelser *in vivo* i spermatogoniala celler när administrering sker vid exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden.

Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas när sådana finns att tillgå. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nummer	Einecs-nummer
Cyklofosfoamid Cyklofosfoamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomer akrylamid	79-06-1	201-173-7
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade med enbart ett lösningsmedel eller en vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens för celler med kromosomavvikelser mellan försöksdjuren kan påvisas från historiska kontrolldata. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas, om det inte finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

▼B

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Antal försöksdjur**

Varje behandlad grupp och kontrollgrupp måste inkludera minst fem analyserbara hanar.

1.5.2 **Behandlingsschema**

Testsubstanser bör lämpligen administreras en eller två gånger (dvs. som en enstaka behandling eller som två behandlingar). Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, dvs. två behandlingar under samma dag med högst några timmars intervall, för att underlätta administrering av stora volymer. Andra doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade.

I den högsta dosgruppen används två provtagningstider efter behandlingen. Eftersom cellcykelns kinetik kan påverkas av testsubstansen, används en tidig och en sen provtagningstid vid ungefär 24 och 48 timmar efter behandlingen. För andra doser än den högsta dosen bör en provtagningstid vid 24 timmar eller 1,5 cellcyklers längd efter behandlingen användas, om inte andra provtagningstider är kända för att vara lämpligare för detektion av effekter (6).

Dessutom kan andra provtagningstider användas. När det t.ex. gäller fall där kemikalier kan inducera kromosom-”lagging”, eller när de kan ge upphov till S-oberoende effekter, kan tidigare provtagningstider visa sig vara lämpligare (1).

Man måste i varje enskilt fall fastställa om det är lämpligt att använda ett upprepat behandlingsschema. Efter ett upprepat behandlingsschema bör försöksdjuren avlivas 24 timmar (1,5 gånger cellcykelns längd) efter den sista behandlingen. Ytterligare provtagningstider kan användas där så är lämpligt.

Innan avlivningen sker, injiceras försöksdjuren intraperitonealt med en lämplig dos av en substans som stoppar celldelningen i metafas (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Provtagning på försöksdjur sker därefter med lämpliga intervall. För möss ligger detta intervall på ungefär 3–5 timmar och för kinesiska hamstrar ligger intervallet pä ungefär 4–5 timmar.

1.5.3 **Dosnivåer**

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen. Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett intervall som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör.

▼B

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas ifrån fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i den spermatogoniala cellerna (t.ex. en reduktion i kvoten av spermatogoniala mitoser hos de första och andra meiotiska metafaserna; denna reduktion bör inte överskrida 50 %).

1.5.4 **”Limit-test”**

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte per upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i ’limit-testen’.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är större än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom att en justering av koncentrationen sker för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

1.5.6 **Kromosomberedning**

Omedelbart efter avlivning, tas cellsuspensioner ut från en eller båda testiklarna, exponeras för en hypoton lösning och fixeras. Cellerna stryks sedan ut på utstryksglas och färgas in.

1.5.7 **Analys**

För varje försöksdjur bör minst 100 väl spridda metafaser analyseras (dvs. ett minimum på 500 metafaser per grupp). Detta antal skulle kunna reduceras när ett stort antal avvikelser observeras. Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör få en oberoende kodning innan den mikroskopiska analysen utförs. Eftersom fixeringsprocedurerena ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafas, med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påvisas innehålla ett antal centromerer som motsvarar antalet 2 N ± 2.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data från försöksdjur bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av försöksdjuret. För varje individuellt försöksdjur bör antalet celler med strukturella kromosomavvikelser och antalet kromosomavvikelser per cell utvärderas. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor i DNA-strängen registreras separat och rapporteras men inkluderas i allmänhet inte i den totala avvikelse frekvensen.

▼B

Om såväl mitos som meios observeras, bör förhållandet mellan spermatogoniala mitoser och de första och andra meiotiska metafaserna fastställas som ett mått på cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollförsöksdjur vid ett totalt prov pä 100 celler som delar sig per djur för att etablera en möjligt cytotoxisk effekt. Om endast mitos kan observeras, bör mitosindexet bestämmas i minst 1 000 celler för varje försöksdjur.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av det relativa antalet celler med kromosomavvikelser eller en tydlig ökning av antalet celler hos en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (8). Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från *in vivo*-test för spermatogoniala kromosomavvikelser indikerar att testsubstansen inducerar strukturella kromosomavvikelser i könscellerna hos den art som testas. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar kromosomavvikelser i könscellerna på den art som testas.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter når målvävnaden bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering av valet av vehikel

— testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

— art/stam som används

— försöksdjurens antal och ålder

— ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.

— individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

▼B

Försöksbetingelser:

— data från en omfångsundersökning, om en sådan genomförts

— grund för valet av dosnivå

— grund för administrationsvägen

— uppgifter om beredningen av testsubstansen

— uppgifter om administreringen av testsubstansen

— grund för avlivningstiderna

— omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämpbart

— uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet

— detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman

— metoder för mätningar av toxicitet

— identiteten hos substanser som stoppar cellcykeln i metafas, deras koncentration och behandlingens varaktighet

— metoder för preparation av utstryksglas

— kriterier för hur avvikelser påvisas

— antalet celler som analyserats per försöksdjur

— kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

— tecken på toxicitet

— mitotiskt index

— förhållandet mellan spermatogoniala mitosceller och de första och andra meiotiska metafaserna

— typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur

— det totala antalet avvikelser per grupp

— antalet celler med avvikelser per grupp

— dos/respons-förhållande, där så är möjligt

— statistiska analyser, om några sådana förekommer

— samtidiga negativa kontrolldata

— historiska negativa kontrolldata med omfång, medelvärden och standardavvikelser

— samtidiga positiva kontrolldata

— förändringar i ploiditet, om sådana har observerats

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

▼B

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Adler, 1. D., (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, s. 477–484.

2. Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, (ed.) S. Venitt and J. M. Parry, 1RL Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.

3. Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, s. 289–294.

4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res. 52, s. 207–209.

6. Adler, 1. D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F.. Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res. 312, s. 313–318.

7. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson- Walker, G.. Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 313–319.

8. Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In* Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part 111. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼B

B.24 **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 ska 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 ska användas.

F ö r s ö k s d j u r

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.

▼B

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 a v 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 ska 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).

▼B

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 ska 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 kontrollgrupperna.

— 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.

▼B

B.25 **TEST AVSEENDE ÄRFTLIG TRANSLOKATION PÅ MUS**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Vid test av ärftlig translokation hos mus konstateras strukturella och numeriska kromosomförändringar i däggdjursceller uttryckt i förstagenerationens avkomma. De kromosomförändringar som mäts är reciproka translokationer och, när avkomman även omfattar hondjur, förlust av en X-kromosom. Bärare av translokationer och XO-hondjur har nedsatt fertilitet, vilket utnyttjas vid valet av F_1-avkomma för cytogenetisk analys. Vissa typer av translokationer (X-autosome och c-t-typen) orsakar fullständig sterilitet. Translokationer konstateras cytogenetiskt i meiosens diakines-metafas hos handjur, som antingen kan vara av F_1-generationen eller söner till F,-hondjur. XO-hondjur identifieras cytogenetiskt genom att kromosomtalet i benmärgsmitoser endast är 39.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

Testämnet upplöses i isotonisk saltlösning. Ämnen som inte är lösliga i saltlösning ska lösas eller uppslammas i lämplig vehikel. Nyligen framställda lösningar av testämnet ska användas. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter.

Tillförselväg

Vanligen tillförs testämnet genom oral intubering eller intraperitoneal injicering. Även andra tillförselvägar kan användas.

Försöksdjur

Som försöksdjur används mus eftersom det är enklast med hänsyn till uppfödning och cytologisk verifikation. Ingen särskild stam krävs. Om man planerar att testa fertiliteten bör den använda stammens genomsnittliga kullstorlek vara över åtta och relativt konstant.

Friska könsmogna djur används.

▼B

Antal djur

Det antal djur som behövs beror på den spontana translokationsfrekvensen och den induktionsfrekvens som är nödvändig för att uppnå ett positivt resultat.

Normalt görs testet genom undersökning av F_1-handjur. Minst 500 F_1-handjur undersöks per dos. Om även kvinnlig F_1-avkomma används undersöks 300 av varje kön.

Användning av negativa och positiva kontroller

Tilllräckliga kontrolldata från sidlöpande och tidigare, kontrollförsök ska finnas tillgängliga. Om det finns godtagbara positiva kontrollresultat från tidigare försök vid samma laboratorium kan dessa användas istället för en sidlöpande positiv kontroll.

Dosnivåer

En dos testas, normalt den högsta dosen med minimal toxisk verkan, men utan inflytande på reproduktion eller överlevnad. Om förhållandet mellan dos och reaktion ska bestämmas används ytterligare två lägre doser. Icke-toxiska ämnen testas genom användning av så höga doser som möjligt.

Förfarande

Exponering efter parning

Två olika behandlingsscheman kan användas. I det mest använda schemat ges hela dosen på en gång. Testämnet kan också ges 7 dagar i veckan i 35 dagar. Antalet parningar efter exponeringen beror på exponeringsschemat och ska vara tillräckligt stort för att säkerställa att alla exponerade könscellstadier kan undersökas. Efter parningen placeras hondjuren i var sin bur. Vid födseln registreras datumet, kullstorleken och avkommans kön. Alla handjuren bland avkomman avvänjs och hondjuren avlägsnas såvida de inte inbegrips i försöket

Test av heterozygoti efter translokation

En av två möjliga metoder används:

— Fertilitetsundersökning av F_1-generationen med efterföljande verifikation av eventuella translokationsbärare genom cytologisk analys.

— Cytogenetisk analys av alla F_1-handjur utan föregående urval på grundval av fertilitetsundersökningar.

a) Fertilitetsundersökning

Nedsatt fertilitet hos F_1-generationens medlemmar kan konstateras vid observation av kullstorleken och/eller analys av de parade hondjurens livmoderinnehåll.

Kriterier för bestämning av normal och nedsatt fertilitet måste fastställas innan fläcktestet på mus inleds.

▼B

Observation av kullstorlek: De F_1-handjur som ska undersökas placeras i var sin bur tillsammans med hondjur från samma försök eller från bestånden. Från och med den 18:e dagen efter parning iakttas burarna dagligen. Kullstorleken och kön i F_2-generationen registreras vid födseln, varefter kullarna avlägsnas. Om F_1-hondjur testas bevaras de små F_2-kullarna för ytterligare undersökningar. Konstatering av om hondjur är translokationsbärare sker genom cytogenetisk analys av translokation hos någon av deras manliga avkomma. XO-hondjur identifieras genom ändring av förhållandet mellan han- och hondjur i deras avkomma från 1:1 till 1:2. Vid ett sekvensiellt ordnat förfarande elimineras normalt F_1-djur från den vidare undersökningen om storleken av den första F_2-kullen är lika med eller större än ett på förhand fastställt normalvärde. I motsatt fall observeras den andra eller tredje F_2-kullen.

F_1-djur som inte kan klassificeras som normala efter observation av upp till tre F_2-kullar underkastas antingen ytterligare undersökning genom analys av de parade hondjurens livmoderinnehåll eller direkt cytogenetisk analys.

Analys av innehållet i livmodern: Den mindre kullstorleken hos translokationsbärare skylls på att fostren dör på det embryonala stadiet vilket innebär att ett stort antal döda implantat tyder på translokation hos försöksdjuret. De F_1-handjur som ska undersökas paras vart och ett separat med upp till tre hondjur. Vid daglig undersökning mellan kl. 10 och kl. 12 på förmiddagen av förekomsten av vaginalpropp, konstateras om befruktning har skett. Hondjuren avlivas 14–16 dagar senare och antalet levande och döda implantat i livmodern registreras.

b) Cytogenetisk analys

Testpreparat framställs genom lufttorkningsteknik. Translokationsbärarna identifieras på grundval av multivalenta konfigurationer i primärar spermatocyters diakines-metafas I. Om det observeras minst två celler med multivalenta konfigurationer anses det bevisat att försöksdjuret är translokationsbärare.

När inget urval görs på grundval av fertilitetsundersökningar undersöks alla F_1-handjur cytogene-tiskt. Mikroskopisk undersökning görs av minst 25 diakines-metafaser I per handjur. F_1-handjur med små testiklar och defekt meiose innan diakines, samt F_1,-hondjur som förmodas vara XO-bärare, underkastas undersökning av mitotiska metafaser i spermatogoner eller benmärg. Om ovanligt långa och/eller korta kromosomer observeras i tio celler anses det bevisat att det är tal om en translokation som gör handjur sterila (c-typen). Vissa X-automsoma translokationer som gör handjur sterila kan endast identifieras genom bandanalys av mitosekromosomer. Om 39 kromosomer observeras i tio mitoser anses det bevisat att det är tal om ett XO-hondjur.

2. **DATA**

Data ställs upp i tabellform.

Den genomsnittliga kullstorleken och könsfördelningen i föräldragenerationens avkomma vid födseln och vid avvänjning anges för varje parningsperiod.

▼B

För bedömning av F_1-djurens fertilitet anges den genomsnittliga kullstorleken efter de normala parningarna och varje enskild kullstorlek efter parning av F_1-translokationsbärare. Efter analys av livmoderinnehåll anges det genomsnittliga antalet levande och döda implantat efter normala parningar och antalet levande och döda implantat efter varje enskild parning av F_1-translokationsbärare.

Efter cytogenetisk analys av diakines-metafaser I anges antalet multivalenta konfigurationer och det totala antalet undersökta celler för varje enskild translokationsbärare.

Det totala antalet parningar och parningsperiodernas längd anges för sterila F_1-djur. Detaljerade upplysningar lämnas om testikelvikt och cytogenetisk analys.

Den genomsnittliga kullstorleken, F_2-avkommans könsfördelning och resultaten av den cytogenetiska analysen anges för XO-hondjur.

Om eventuella F_1-translokationsbärare väljs ut vid fertilitetsundersökningar ska tabellerna innehålla upplysningar om hur många av de utvalda djuren som senare visade sig vara heterozygota efter translokation.

Data från negativa och positiva kontrollförsök rapporteras på liknande sätt.

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Musstam, djurens ålder, de doserade djurens vikt, antal djur av varje kön i försöks- och kon trollgrupperna i 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.

▼B

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.26 TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET 90 DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ GNAGARE

1. METOD

Denna testmetod för subkronisk oral toxicitet motsvarar OECD TG 408 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper kan bestämningen av subkronisk oral toxicitet med användning av upprepade doser genomföras efter det att man har fått preliminär toxicitetsinformation från test avseende akut toxicitet eller från test med upprepad dosering (28 dagar). Från 90-dagarstestet fås information om eventuella hälsoskador som kan uppstå till följd av upprepad exponering under en lång tidsperiod som täcker mognaden efter avvänjning och uppväxten ända in i vuxenstadiet. Genom testet fås information om de mest betydande toxiska verkningarna, indikation om vilka organ som påverkas och huruvida det finns en risk för ackumulering. Likaså kan man få en uppskattning om en exponeringsnivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras. Denna information kan användas för att välja dosnivåer för test avseende kronisk toxicitet och för att fastställa säkerhetskriterier gällande exponering på människor.

Metoden innebär starkare betoning av neurologiska slutpunkter (endpoints) och ger indikationer om immunologiska och reproduktionstoxiska verkningar. Likaså betonas behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt. Testets syfte är att möjliggöra identifiering av kemikalier som har potential att framkalla sådana neurotoxiska, immunologiska eller reproduktionstoxiska verkningar som kan motivera närmare undersökningar.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (t.ex. mg/kg) eller som en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: Ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

NOAEL: Förkortning för 'no-observed-adverse-effect level' (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Avser den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs oralt dagligen under 90 dagar i stegvis ökande doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp. Under denna period observeras djuren noggrant för att se om de uppvisar några tecken som tyder på att testämnet är toxiskt. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras och vid testets slut avlivas de överlevande djuren och obduceras.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelse av djuren**

För testet används friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön under minst fem dagar och som inte har använts för tidigare test. Försöksdjuren bör karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur tilldelas ett unikt identifieringsnummer.

1.4.2 **Förberedelse av doserna**

Testämnet tillförs via sondmatning, foder eller dricksvatten. Den metod som väljs för oral tillförsel beror på testets syfte och testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vid behov kan testämnet lösas upp eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuella övriga vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet vid tillförselförhållandena bör fastställas.

1.4.3 **Testförhållanden**

1.4.3.1 *Försöksdjur*

Rekommenderat försöksdjur är råtta, även om testet kan utföras med andra gnagare (t.ex. mus). Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Doseringen bör inledas snarast möjligt efter avvänjningen och under alla förhållanden innan djuren är nio veckor gamla. Vid testets början bör variationen i vikt mellan de använda djuren vara minimal och får inte överstiga ± 20 % av vardera könets medelvikt. Om testet utförs som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste djur från samma stam och ursprung användas för båda testen.

1.4.3.2 *Antal och kön*

Minst 20 djur (tio honor och tio hanar) bör användas för varje dosnivå. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som avlivas innan testet har slutförts. Beroende på tidigare kunskaper om kemikalien eller en nära besläktad kemikalie bör man överväga att ta med ytterligare en satellitgrupp på tio djur (fem per kön) för kontrollgruppen och toppdosgruppen. Efter behandlingsperioden observeras satellitgruppen med avseende på reversibla eller kvarstående toxiska verkningar. Längden för denna period fastställs med beaktande av de observerade verkningarna.

▼B

1.4.3.3 *Dosnivåer*

Minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp bör användas, utom om gränstest utförs (se 1.4.3.4). Dosnivåerna kan basera sig på resultaten från test med upprepad dos eller från preliminära test för dosbestämning, och de bör fastställas med beaktande av alla toxikokinetiska data som finns tillgängliga för testämnet eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar utan att orsaka dödsfall eller svårt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad respons kan påvisas, och samtidigt så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) kan observeras vid den lägsta dosnivån. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. en faktor som är större än cirka 6–10).

Kontrollgruppen är en obehandlad grupp, eller en vehikelkontrollgrupp om vehikel används för tillförsel av testämnet. Förutom att djuren i kontrollgruppen inte behandlas med testämnet bör de hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs via fodret och man märker att foderintaget minskar, kan det vara till fördel med en parallellt utfodrad kontrollgrupp för att kunna avgöra huruvida minskningen beror på att testämnet påverkar fodrets smak eller på att det förekommer toxikologiska förändringar i testmodellen.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatsämnen bör beaktas: verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper i den utsträckning dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.4.3.4 *Gränstest (Limit-test)*

Om ett test med en dosnivå om minst 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga toxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Gränstest tillämpas utom när exponering på människor indikerar att en högre dosnivå behövs.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Tillförsel av doser**

Djuren ges dagliga doser av testämnet under 90 dagar. Varje annat doseringsschema, t.ex. dosering fem dagar per vecka, måste motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt utom i fråga om vattenlösningar för vilka 2 ml per 100 g kroppsvikt får användas. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

▼B

För ämnen som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i kvantiteter som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. När ett ämne tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tid varje dag och vid behov justeras dosen så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett 90-dagarstest används som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste samma foder användas i båda testen.

1.5.2 **Observationer**

Observationsperioden bör vara minst 90 dagar. Djur i en satellitgrupp avsedd för fortsatta observationer hålls obehandlade under en lämplig period så att man kan upptäcka kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska verkningar.

Generella kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag och med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Djurens hälsostatus bör registreras. Minst två gånger per dag, i regel i början och slutet av varje dag, undersöks alla djur i syfte att hitta döende eller döda djur.

Noggranna kliniska observationer görs minst en gång av alla djur före den första exponeringen (för att möjliggöra jämförelser på samma objekt) och därefter minst en gång i veckan. Dessa observationer bör göras utanför buren, helst på en ’standardarena’ och vid samma tid på dagen varje gång. Observationerna bör noteras noggrant, helst genom ett poängsystem som testlaboratoriet har definierat exakt. Man bör eftersträva minimala variationer i observationsbetingelserna. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypt beteende (t.ex. överdrivet putsande, eller att djuren springer runt i cirklar) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också noteras (1).

Innan testämnet tillförs och efter avslutat test undersöks djuren oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men åtminstone djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om ögonförändringar upptäcks bör alla djur undersökas.

Mot slutet av exponeringsperioden, och under alla förhållanden inte tidigare än vecka 11, görs en bedömning av den sensoriska reaktionen på stimuli (1) (t.ex. hörsel-, syn- och djupsensoriska stimuli) (2), (3), (4), samt bedömning av greppstyrka (5) och motorisk aktivitet (6). Närmare uppgifter om de förfaranden som kan följas finns i respektive hänvisning. Alternativt kan även andra förfaranden än de som nämns i hänvisningarna användas.

Mot slutet av testet kan funktionsobservationerna utelämnas om det finns uppgifter om motsvarande observationer tillgängliga från övriga test och man inte har kunnat konstatera några funktionsstörningar vid de dagliga kliniska observationerna.

▼B

I undantagsfall kan funktionsobservationerna också utelämnas för grupper vars djur i övrigt uppvisar tecken på toxicitet i en sådan utsträckning att det väsentligt skulle påverka funktionstestet.

1.5.2.1 *Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion*

Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Foder- och vattenkonsumtion bör mätas minst en gång varje vecka. Om testämnet tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan. Mätning av vattenkonsumtionen kan också övervägas för foder- eller sondmatningstest under vilka vattendrickandet kan förändras.

1.5.2.2 *Hematologi och klinisk biokemi*

Blodprov bör tas från ett angivet ställe och förvaras under lämpliga förhållanden. I slutet av testperioden tas blodprov strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet.

Följande hematologiska undersökningar bör göras då testperioden avslutas och varje gång eventuella blodprover tas under testperiodens gång: hematokrit, hemoglobinkoncentration, räkning av röda blodkroppar, total-och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt mätning av koaguleringstid och koaguleringsförmåga.

Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader, särskilt verkningar på lever och njurar, bör utföras på de blodprov som tas från alla djur strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång). På samma sätt som för hematologiska undersökningar kan blodprover för kliniska biokemiska undersökningar tas under testets gång. Det rekommenderas att djuren fastar natten före blodprovstagningen ([1]). Undersökningarna av plasma eller serum bör omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, urinämneskväve, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar verkningar på leverceller (t.ex. alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfatas, gamma-glutamyltranspeptidas och sorbitoldehydrogenas). Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller av annat ursprung) och gallsyror kan under vissa förhållanden ge användbar information.

Eventuellt kan dessutom följande urinanalyser utföras under sista veckan av testet med uppsamling av urin på fasta tider: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod eller blodceller.

Dessutom bör undersökning av serummarkörer av allmänna vävnadsskador övervägas. Ytterligare bestämningar som bör utföras, i det fall att testämnets kända egenskaper kan eller misstänks påverka närbesläktade metaboliska profiler, omfattar kalcium, fosfor, fastevärden av triglycerider, specifika hormoner, metahemoglobin och kolinesteras. Dessa bestämningar behövs för kemikalier inom vissa klasser eller från fall till fall.

([1]) För vissa matningar som görs på serum och plasma, särskilt i fråga om glukos, är fasta över natten att föredra. Den viktigaste orsaken till detta är att resultaten annars oundvikligen uppvisar större variationer, vilket tenderar att maskera svaga verkningar och göra det svårare att tolka resultaten. Å andra sidan kan fasta över natten leda till störningar i djurens allmänna metabolism och särskilt i fråga om exponeringstest störa den dagliga exponeringen för testämnet. Om fasta över natten tillämpas bör de kliniska biokemiska bestämningarna göras efter funktionsobservationerna.

▼B

Överlag krävs en viss flexibilitet i fråga om tillvägagångssätt, beroende på djurart och på de observerade eller förväntade verkningarna av ett givet ämne.

Om historiska basdata är otillräckliga bör man överväga bestämning av hematologiska och kliniska biokemiska variabler innan doseringen påbörjas. I allmänhet rekommenderas inte att dessa uppgifter genereras före behandlingen (7).

1.5.2.3 *Obduktion*

Alla försöksdjur bör genomgå en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull yttre granskning av kroppen, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever, njurar, binjurar, testiklar, bitestiklar, livmoder, äggstockar, bräss, mjälte, hjärna och hjärta från alla djur (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång) putsas från angränsande vävnad och deras våtvikt bestäms så snart möjligt efter dissekering för att undvika uttorkning.

Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade mediet med hänsyn till typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla organ och vävnader med stora skador, hjärnan (representativa regioner inbegripet storhjärna, lillhjärna och hjärnbrygga), ryggrad (på tre nivåer: cervikal, thorakal (mellersta) och lumbal), hypofys, sköldkörtel, bisköldkörtel, bräss, matstrupe, salivkörtlar, magsäck, tunntarm och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, bukspottkörtel, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, luftstrupe och lungor (konserverade genom inflation med fixermedel och därefter immersion), aorta, könskörtlar, livmoder, accessoriska könsorgan, honornas bröstkörtlar, prostata, urinblåsa, gallblåsa (mus), lymfkörtlar (helst en lymfkörtel som omfattar tillförselvägen och en annan långt från tillförselvägen för att täcka systematiska effekter), perifer nerv (ischias- eller tibialnerven), helst nära muskeln, ett snitt av ryggmärgen (alternativt färskt benmärgsaspirat), hud och ögon (om förändringar har observerats under oftalmologiska undersökningar). Kliniska eller övriga fynd kan indikera att ytterligare vävnader behöver undersökas. Dessutom bör man bevara alla organ som på grund av testämnets kända egenskaper förmodas vara målorgan.

1.5.2.4 *Histopatologi*

En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från alla djur i kontroll- och högdosgrupperna. Om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen bör undersökningarna utsträckas till djuren i alla övriga dosgrupper.

Alla stora skador bör undersökas.

Om en satellitgrupp används bör histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka verkningar har konstaterats i dosgrupperna.

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Uppgifter bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla uppgifter sammanställas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl samt tidpunkten för avlivning, antalet djur som uppvisat tecken som tyder på att testämnet är toxiskt, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador, typ av skada och procentandelen djur för varje typ av skada.

Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna och data för vilka analys planeras bör väljas när testet utformas.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifieringsdata.

— Vehikel (i förekommande fall). Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

2.2.2 **Försöksdjur**

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder osv.

— Djurens individuella vikter vid testets början.

2.2.3 **Testförhållanden**

— Motivering för val av dosnivåer.

— Utförliga uppgifter om testämnets formulering och beredning av fodret, uppnådd koncentration, prepara tets stabilitet och homogenitet.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Faktiska doser (mg per kg kroppsvikt och dag) och omräkningsfaktor från testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

2.2.4 **Resultat**

— Kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Foderkonsumtion och i tillämpliga fall vattenkonsumtion.

— Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

▼B

— Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte).

— Resultat av oftalmologisk undersökning.

— Bedömning av sensorisk aktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet (i mån av tillgänglighet).

— Blodundersökningar med relevanta basvärden.

— Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.

— Kroppsvikt vid avlivning, organvikt och förhållandena mellan organ- och kroppsvikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata om de finns tillgängliga.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

3. HÄNVISNINGAR

1. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

2. Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999–1003.

3. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691–704.

4. Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267–283.

5. Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233–236.

6. Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599–609.

7. Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). 'Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies', Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198–201.

▼B

B.27 TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET 90 DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ ICKE-GNAGARE

1. METOD

Denna testmetod för subkronisk oral toxicitet motsvarar OECD TG 409 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper kan bestämningen av subkronisk oral toxicitet med användning av upprepade doser genomföras efter det att man har fått preliminär toxicitetsinformation från test avseende akut toxicitet eller från test med upprepad dosering (28 dagar). Genom 90-dagarsstestet fås information om eventuella hälsoskador som kan uppstå till följd av upprepad exponering under en period av snabb tillväxt och in i ungt vuxenstadium. Genom testet fås information om de mest betydande toxiska verkningarna, indikation om vilka organ som påverkas och huruvida det finns en risk för ackumulering. Likaså kan man få en uppskattning om en exponeringsnivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras. Denna information kan användas för att välja dosnivåer för test avseende kronisk toxicitet och för att fastställa säkerhetskriterier gällande exponering på människor.

Testmetoden kan användas för identifiering av skadliga verkningar hos icke-gnagare som utsätts för exponering av en kemikalie och den bör endast användas i följande fall:

— Verkningar som har observerats i övriga test indikerar att det finns ett behov av förtydligande eller karakterisering med hjälp av en art som inte är gnagare.

— Toxikokinetiska test indikerar att en specifik art av icke-gnagare är det mest relevanta alternativet för valet av försöksdjur.

— Andra särskilda orsaker motiverar att en art som inte är gnagare används.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (t.ex. mg/kg) eller som en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: Ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

NOAEL: Förkortning för ”no-observed-adverse-effect level” (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Avser den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs oralt dagligen under 90 dagar i stegvis ökande doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp. Under denna period observeras djuren noggrant för att se om de uppvisar några tecken som tyder på att testämnet är toxiskt. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras och vid testets slut avlivas de överlevande djuren och obduceras.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

En ofta använd icke-gnagare är hund. Hunden bör vara av definierad ras, ofta används beagle. Även andra arter, t.ex. svin eller minigrisar, kan användas. Primater rekommenderas inte och användning av dem måste motiveras. Djuren bör vara unga och friska. När det gäller hund bör doseringen helst inledas vid 4–6 månaders ålder och aldrig senare än vid 9 månaders ålder. Om testet utförs som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste djur av samma art och ras användas för båda testen.

1.4.2 **Förberedelse av djuren**

För testet används unga och friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön och som inte har använts för tidigare test. Acklimatiseringsperiodens längd beror på djurarterna och deras ursprung. För hund eller för ändamålet uppfödda svin från en resident koloni rekommenderas minst fem dagar och för djur av externt ursprung rekommenderas minst två veckor. Försöksdjuren bör karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur tilldelas ett unikt identifieringsnummer.

1.4.3 **Beredning av doserna**

Testämnet kan tillföras via foder eller dricksvatten, genom sondmatning eller i kapslar. Den metod som väljs för oral tillförsel beror på testets syfte och testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vid behov kan testämnet lösas upp eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuellt andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet vid tillförselförhållandena bör fastställas.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Djurens antal och kön**

Minst åtta djur (fyra honor och fyra hanar) bör användas för varje dosnivå. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som avlivas under testets gång. Antalet djur vid testets slut måste vara tillräckligt med tanke på en meningsfylld utvärdering av de toxiska verkningarna. Beroende på tidigare kunskaper om ämnet eller en nära besläktad kemikalie bör man överväga att ta med ytterligare en satellitgrupp på åtta djur (fyra per kön) för kontrollgruppen och toppdosgruppen. Efter behandlingsperioden observeras satellitgruppen med avseende på reversibla eller kvarstående toxiska verkningar. Längden för denna period fastställs med beaktande av de observerade verkningarna.

▼B

1.5.2 **Dosering**

Minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp bör användas, utom om gränstest utförs (se 1.5.3). Dosnivåerna kan basera sig på resultaten från test med upprepad dos eller från preliminära test för dosbestämning och de fastställs med beaktande av alla toxikokinetiska data som finns tillgängliga för testämnet eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar utan att orsaka dödsfall eller svårt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad reaktion kan påvisas, medan inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) bör uppstå vid den lägsta dosnivån. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. över en faktor på cirka 6–10).

Kontrollgruppen är en obehandlad grupp, eller en vehikelkontrollgrupp om vehikel används för tillförsel av testämnet. Förutom att djuren i kontrollgruppen inte behandlas med testämnet bör de hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs via fodret och man märker att foderintaget minskar, kan det vara till fördel med en parallellt utfodrad kontrollgrupp for att kunna avgöra huruvida minskningen beror på att testämnet påverkar fodrets smak eller på att det förekommer toxikologiska förändringar i test-modellen.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatsämnen bör beaktas: verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper i den utsträckning dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.5.3 **Gränstest (Limit-test)**

Om ett test med en dosnivå om minst 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga toxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Gränstest tillämpas utom när exponering på människor indikerar att en högre dosnivå behövs.

1.5.4 **Tillförsel av doser**

Djuren ges dagliga doser av testämnet under 90 dagar. Varje annat doseringsschema, t.ex. dosering fem dagar per vecka, måste motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. I regel bör volymen hållas så låg som möjligt. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

▼B

För ämnen som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i kvantiteter som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. För ett ämne som tillförs genom sondmatning eller kapslar bör dosen ges vid samma tid varje dag och vid behov justeras så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett 90-dagarstest används som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste samma foder användas i båda testen.

1.5.5 **Observationer**

Observationsperioden bör vara minst 90 dagar. Djur i en satellitgrupp avsedd för fortsatta observationer hålls obehandlade under en lamplig period så att man kan upptäcka kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska verkningar.

Generella kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag och med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Djurens hälsostatus bör registreras. Minst två gånger per dag, i regel i början och slutet av varje dag, undersöks alla djur i syfte att hitta döende eller döda djur.

Noggranna kliniska observationer görs minst en gång av alla djur före den första exponeringen (för att möjliggöra jämförelser på samma objekt) och därefter minst en gång i veckan. Dessa observationer bör göras, när det är genomförbart, utanför buren, helst på en ”standardarena” och vid samma tidpunkt varje gång. Man bör eftersträva minimala variationer i observationsbetingelserna. Alla tecken på toxicitet bör registreras i detalj, inklusive tidpunkt för första upptäckt, svårighetsgrad och varaktighet. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypt beteende (t.ex. överdrivet putsande, eller att djuren springer runt i cirklar) eller eventuellt bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också noteras.

Innan testämnet tillförs och efter avslutat test undersöks djuren oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men åtminstone djuren i högdos-och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör alla djur undersökas.

1.5.5.1 *Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion*

Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Foder- och vattenkonsumtion bör mätas minst en gång varje vecka. Om testämnet tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan. Mätning av vattenkonsumtionen kan också övervägas för test med tillförsel via foder eller sond under vilka vattendrickandet kan förändras.

▼B

1.5.5.2 *Hematologi och klinisk biokemi*

Blodprov bör tas från ett angivet ställe och förvaras under lämpliga förhållanden. I slutet av testperioden tas blodprov strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet.

Blodprov, omfattande hematokrit, hemoglobinkoncentration, räkning av röda blodkroppar, total- och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt mätning av koaguleringstid och koaguleringsförmåga, protrombintid eller tromboplastintid tas vid testets början och därefter varje månad eller när halva testperioden gått, och när testet avslutas.

Kliniska biokemiska bestämningar för undersökning av betydande toxiska verkningar i vävnader, särskilt verkningar på njurar och lever, görs på blodprov som tagits från alla djur när testets inleds, varje månad eller när halva testperioden har gått, och när testet avslutas. Undersökning kan även övervägas i fråga om elektrolytbalans, kolhydratmetabolism samt lever- och njurfunktion. De specifika undersökningar som väljs beror på observationerna av hur testämnet agerar. Innan blodprov tas bör djuren fasta under en för arten lämplig period. Till de bestämningar som föreslås hör mätningar av kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukos, alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, ornitindekarboxylas, gammaglutamyltranspep-tidas, urinämneskväve, albumin, blodkreatinin, totalbilirubin och totalserumprotein.

Urinanalyser bör göras minst när testet inleds, när halva testperioden gått och när testet avslutas, med uppsamling av urin på fasta tider. Urinanalyserna omfattar utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod eller blodceller. Ytterligare parametrar kan vid behov användas för att utvidga undersökningen av observerade verkningar.

Dessutom bör undersökning av markörer för allmänna vävnadsskador övervägas. För en tillräcklig toxikologisk bedömning kan även behövas analys av lipider, hormoner, syra-basbalans, metahemoglobin och kolinesterasinhibition. Ytterligare klinisk biokemi kan vid behov användas för att utvidga undersökningen av observerade verkningar. Dessa bestämningar behövs för kemikalier inom vissa klasser eller från fall till fall.

Överlag krävs en viss flexibilitet i fråga om tillvägagångssätt, beroende på djurart och på de observerade eller förväntade verkningarna av ett givet ämne.

1.5.5.3 *Obduktion*

Alla försöksdjur bör genomgå en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull yttre granskning av kroppen, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever med gallblåsa, njurar, binjurar, testiklar, bitestiklar, äggstockar, livmoder, sköldkörtel (med bisköldkörtlar), bräss, mjälte, hjärna och hjärta från alla djur (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång) putsas från angränsande vävnad och deras våtvikt bestäms så snart som möjligt efter dissekering för att undvika uttorkning.

▼B

Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade mediet med hänsyn till typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla organ och vävnader med stora skador, hjärnan (representativa regioner inbegripet storhjärna, lillhjärna och hjärnbrygga), ryggrad (på tre nivåer: cervikal, thorakal (mellersta) och lumbal), hypofys, ögon, sköldkörtel, bisköldkörtel, bräss, matstrupe, salivkörtlar, magsäck, tunntarm och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, gallblåsa, bukspottkörtel, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, luftstrupe och lungor, aorta, könskörtlar, livmoder, accessoriska könsorgan, honornas bröstkörtlar, prostata, urinblåsa, lymfkörtlar (helst en lymfkörtel som omfattar tillförselvägen och en annan långt från tillförselvägen för att täcka systematiska effekter), perifer nerv (ischias- eller tibialnerven), helst nära muskeln, ett snitt av ryggmärgen (alternativt färskt benmärgsaspirat) och hud. Kliniska eller övriga fynd kan indikera att ytterligare vävnader behöver undersökas. Dessutom bör man bevara alla organ som på grund av testämnets kända egenskaper förmodas vara målorgan.

1.5.5.4 *Histopatologi*

En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från åtminstone alla djur i kontroll- och högdosgruppen. Undersökningarna bör utsträckas till djur i alla andra dosgrupper om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen.

Alla stora skador bör undersökas.

Om en satellitgrupp används bör histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka verkningar har konstaterats i dosgrupperna.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 DATA

Uppgifter bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla uppgifter sammanställas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl samt tidpunkten för avlivning, antalet djur som uppvisat tecken som tyder på att testämnet är toxiskt, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador, typ av skada och procentandelen djur för varje typ av skada.

Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna och data för vilka analys planeras bör väljas när testet utformas.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

▼B

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifieringsdata.

— Vehikel (i förekommande fall). Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

2.2.2 **Försöksdjur**

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder osv.

— Djurens individuella vikter vid testets början.

2.2.3 **Testförhållanden**

— Motivering för val av dosnivåer.

— Utförliga uppgifter om testämnets formulering och beredning av fodret, uppnådd koncentration, prepa ratets stabilitet och homogenitet.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Faktiska doser (mg per kg kroppsvikt och dag) och omräkningsfaktor från testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

2.2.4 **Resultat**

— Kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Foderkonsumtion och i tillämpliga fall vattenkonsumtion.

— Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

— Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte).

— Oftalmologisk undersökning.

— Blodundersökningar med relevanta basvärden.

— Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.

— Kroppsvikt vid avlivning, organvikt och förhållandena mellan organ- och kroppsvikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata om de finns tillgängliga.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

▼B

B.28 TEST AVSEENDE SUBKRONISK DERMAL TOXICITET 90 DAGARS REPETERAD DERMALTEST PÅ GNAGARE

1. METOD

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet appliceras dagligen på huden i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, en bestämd dos per grupp i 90 dagar. Under försöksperioden ska djuren observeras dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under försöket obduceras och i slutet av försöket avlivas och obduceras överlevande djur,

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket ska djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas unga friska djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Kort innan försöket klipps ryggpälsen bort på försöksdjuren. Om pälsen rakas bort bör detta ske ca 24 timmar innan försöket inleds. Klippning och rakning måste normalt upprepas varje vecka. Vid klippning eller rakning ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Minst 10 % av djurets kroppsyta ska göras klar för applicering av testämnet. Djurets vikt måste beaktas vid bestämning av hur stort område som ska klippas. Vid test av fasta ämnen, vilka vid behov kan pulveriseras, ska testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov, med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda. Daglig applicering fem till sju dagar i veckan ska ske.

Försöksbetingelser

F ö r s ö k s d j u r

Vuxna råttor eller kaniner får användas. Andra djurarter kan användas men detta måste motiveras. Djur av vanligen nyttjade laboratoriestammar ska användas. Vid inledning av försöket får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten. Om ett test av subkronisk toxicitet med dermal tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning ska samma djurart och stam användas i båda undersökningarna.

▼B

Antal och kön

Minst 20 djur (10 hondjur och 10 handjur) med frisk hud ska användas på varje doseringsnivå. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av försöksdjur under försöket ska det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt ska avlivas innan försöket slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 20 djur (10 av vardera kön) behandlas med den högsta dosen i 90 dagar och därefter observeras i 28 dagar för reversibilitet, per-sistens eller fördröjt uppträdande av toxiska verkningar.

Dosnivåer

Minst tre dosnivågrupper och en kontrollgrupp ska användas. Om vehikel används ska, förutom kontrollgruppen, en vehikelkontrollgrupp användas. Exponeringsperioden bör vara minst sex timmar per dag. Applicering av testämnet bör ske vid samma tidpunkt varje dag och den mängd ämne som används ska justeras regelbundet (varje eller varannan vecka) för att säkerställa att den hålls konstant i förhållande till djurets kroppsvikt. Djuren i kontrollgrupen ska behandlas på samma sätt som försöksdjuren, bortsett från applicering av testämnet. Om vehikel används för att underlätta doseringen ska vehikelkontrollgruppen doseras på samma sätt som försöksgrupperna och ges samma mängd ämne som den som appliceras på djuren i den försöksgrupp med den högsta doseringsnivån. Den högsta doseringsnivån bör medföra toxiska verkningar men inte leda till någon, eller endast begränsad, dödlighet. Den lägsta doseringsninvån bör inte ha någon toxisk verkan. Om det finns en användbar uppskattning av människors högsta exponering för ämnet bör den lägsta dosnivån vara högre än denna. Idealt ska medeldosen medföra minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Om flera medeldosnivåer används ska de väljas på ett sätt att en gradering av de toxiska verkningarna, erhålls. I lågdos-, medeldos- och kontrollgrupperna bör antalet dödsfall vara få för att möjliggöra en meningsfull utvärdering av resultaten.

Om testämnet medför allvarlig hudirritation bör koncentrationen sänkas, vilket kan leda till en minskning eller ett fullständigt bortfall av de övriga toxiska verkningarna vid den högsta doseringsnivån. Om huden har skadats allvarligt kan det vara nödvändigt att avbryta försöket och utföra ett nytt försök med en lägre koncentration.

Gränstest

Om en dos av 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag eller en högre dosnivå som fastställts på grundval av kännedom om exponering för människor, inte medför någon toxisk verkan kan ytterligare testning anses överflödig.

Observationsperiod

Samtliga djur ska observeras dagligen och tecken på toxicitet registreras. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner ska registreras.

▼B

Förfarande

Djuren ska hållas i var sin bur. Idealt appliceras testämnet varje dag i 90 dagar.

Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning bör hållas under observation i ytterligare 28 dagar utan applicering av testämne för att fastställa om de toxiska verkningarna försvinner eller håller i sig. Exponeringsperioden bör vara sex timmar per dag.

Testämnet ska appliceras jämnt över ett område som motsvarar ca 10 % av den totala kroppsytan. Vid användning av kraftigt toxiska ämnen kan en mindre yta täckas, men ämnet ska appliceras på ytan i ett så tunt och jämnt lager som möjligt.

Testämnet hållas i kontakt med huden med en porös gaskompress och icke hudirriterande tejp. Testytan ska vidare täckas på lämpligt sätt för att säkerställa att gaskompressen och testämnet hålls på plats och att djuren inte kan svälja testämnet. För att förhindra att djuren intar testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas, men total immobilisering rekommenderas inte.

I slutet av exponeringsperiodens ska resterande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med annan lämplig metod för rengöring av huden.

Samtliga djur ska observeras dagligen och tecken på toxicitet ska registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde för första gången samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observationer av djuren i burarna ska omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations-och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet, kroppsmotorik samt beteendemönster. Foderintag och djurens vikt ska registreras en gång i veckan. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testperioden avlivas och obduceras alla överlevande djur, utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks ska dessa avlägsnas, avlivas och obduceras.

Följande undersökningar utförs normalt på alla djur, inbegripet kontrollgruppen:

a) Innan testämnet appliceras samt sedan försöket avslutats utförs en oftamologisk undersökning med användning av ett oftalmoskop eller liknande lämplig utrustning, helst på alla djur men åtminstone på djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om förändringar i ögonen observeras ska alla djur undersökas.

b) Vid slutet av testperioden ska en hematologisk undersökning utföras, inbegripet hematokrit-och hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differentiell leukocyträkning, mätning av koagulationsnivån, t.ex. koagulationstid, protombintid, tromboplastintid eller blodplättsräkning.

▼B

c) Vid slutet av försöksperioden ska en klinisk-biokemisk blod analys utföras. För denna undersökning är följande analysområden lämpliga: elektrolytbalans, kolhydratmetabolism, lever- och njurfunktion. Valet av specifika analyser kommer att påverkas av observationer av testämnets verkningssätt. Följande bestämningar föreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukos (fasteperioden beror på djurarten), glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas ([1]), glutamin-syra-oxalättiksyra-transaminas ([2]), ornitin dekarboxylas, gamma-glutamyl-transpeptidas, urinkväve, albumin, blodkreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein. Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en tillfredsställande toxikologisk bedömning inbegriper analyser av lipider, hormoner, syra/basbalans, methemoglobin och kolinesterasaktivitet. Ytterligare klinisk-biokemiska analyser kan utföras då sådana behövs för en vidare undersökning av observerade verkningar.

d) En urinanalys krävs i regel inte, men kan dock vara nödvändig om en toxisk verkan förväntas eller observeras.

Om tidigare insamlade basdata är otillräckliga bör man överväga att bestämma hematologiska och klinisk-biokemiska parametrar innan man inleder försöket.

Makroskopisk undersökning

Alla djur bör underkastas en fullständig obduktion som inbegriper undersökning av alla externa kroppsytor, alla kroppsöppningar liksom kranie-, bröstkorgs- och bukhålan samt deras innehåll. Lever, njurar, binjurar och testiklar ska vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undgå uttorkning. Följande vävnader och organ bör bevaras i ett lämpligt medium för en eventuell framtida histopatologisk undersökning: alla vävnader och organ som uppvisar lesioner, hjärnan –inbegripet snitt av medulla/pons, lillhjärnbarken och hjärnbarken, hypofysen, sköldkörteln/bisköldkörteln, thymusvävnad, (luftstrupe) och lungor, hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever, mjälte, njurar, binjurar, bukspottskörtel, könskörtlar, livmoder, associerade könsorgan, gallblåsa (om sådan finns), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, representativa lymfkörtlar, (kvinnliga bröstkörtlar), (lårmuskulatur), nerver från det perifera nervsystemet, (bröstbenet med benmärg), (ögon), (femur, inbegripet ledyta), (ryggmärg på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från landområdet), och (exorbitala tårkörtlar). De vävnader som anges inom parentes behöver endast undersökas om det finns tecken på toxicitet eller i samband med målorgan.

Histopatologisk undersökning

a) En fullständig histopatologisk undersökning ska utföras på obehandlad och behandlad hud och på organ och vävnader från alla djur i kontroll- och högdosegrupperna.

b) Alla allvarliga lesioner ska undersökas.

([1]) Numera känt som serum alanine aminotransferase.
([2]) Numera kant som serum aspartate aminotransferase.

▼B

c) Målorgan i andra dosgrupper ska också undersökas.

d) Om råttor används ska lungorna från djur i låg- och medeldosgrupperna undersökas histopatologiskt för tecken på infektion, eftersom detta ger en lämplig uppfattning om djurens hälsotillstånd. Ytterligare histopatologiska undersökningar av djur i dessa grupper krävs inte rutinmässigt, men organ som har uppvisat tecken på lesioner i högdosgruppen ska alltid undersökas.

e) Djur i en eventuell satellitgrupp bör underkastas en histopatologisk undersökning av de organ och vävnader som har visat tecken på toxisk verkan hos djur i de behandlade grupperna.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje grupp ska anges antal djur i början av försöket, antal djur med lesioner och den procent djur som uppvisar varje slag av lesion. Resultaten ska utvärderas på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel om sådan använts) och koncentrationer.

— Upplysningar om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke-toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar.

— Tidpunkt för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Oftamologiska rön.

— Hematologiska undersökningar och samtliga resultat.

— Använda klinisk-biokemiska undersökningar och samtliga resultat (inbegripet resultat av en eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

▼B

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Eventuell statistisk bearbetning av resultaten.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se den allmänna inledningen till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se den allmänna inledningen till del B.

▼M4

B.29 SUBKRONISK INHALATIONSTOXICITET: 90-DAGARSSTUDIE

SAMMANFATTNING

Denna reviderade B.29-testmetod har utformats för att till fullo karakterisera testkemikaliens inhalationstoxicitet under en begränsad tidsperiod (90 dagar), och för att tillhandahålla stabila data för kvantitativa riskbedömningar. Grupper om 10 hangnagare och 10 hongnagare exponeras 6 timmar per dag under en 90-dagarsperiod (13 veckor) för a) testkemikalien vid tre eller fler koncentrationsnivåer, b) filtrerad luft (negativ kontroll, och/eller c) vehikeln (vehikelkontroll). Djur exponeras i allmänhet 5 dagar per vecka, men exponering 7 dagar per vecka är också tillåten. Hanar och honor testas alltid, men de kan exponeras vid olika koncentrationsnivåer om det är känt att ett kön är mer mottagligt för en viss testkemikalie. Denna metod ger försöksledaren flexibilitet att inkludera satellitgrupper (reversibilitet), avlivningar, lungsköljning (BAL), neurologiska tester och ytterligare utvärderingar av klinisk patologi och histopatologi för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet.

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 413 (2009). Den ursprungliga testriktlinjen 413 (TG 413) för subkronisk inhalation antogs 1981 (1). Den här testmetoden B.29 (som motsvarar den reviderade testriktlinjen 413 (2009)) har uppdaterats för att återspegla vetenskapen och möta nuvarande och framtida lagstiftningsbehov.

2. Studier av subkronisk inhalationstoxicitet används främst för att härleda regulatoriska koncentrationer för bedömning av risker i arbetsmiljöer. De används också för att bedöma människors bostäder, transportmedel och miljörisker. Den här testmetoden medger karakterisering av negativa effekter efter upprepad daglig exponering genom inhalation av en testkemikalie under 90 dagar (cirka 10 % av en råttas livslängd). Datan som härrör från studier om subkronisk inhalationstoxicitet kan användas för kvantitativa riskbedömningar och för valet av koncentrationer för kroniska studier. Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av nanomaterial. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet (GD) 39 (2).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

3. All tillgänglig information om testkemikalien bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiens kvalitet och minimera djuranvändningen. Information som underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer kan inkludera identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester, förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier samt data från andra studier av upprepad exponering. Om neurotoxicitet förväntas eller observeras under studiens gång, kan försöksledaren välja att inkludera lämpliga utvärderingar såsom en funktionell samlingsstudie (FOB) och mätning av motorisk aktivitet. Även om tidpunkter för exponeringar i förhållande till specifika undersökningar kan vara kritiska, bör resultaten från dessa extra aktiviteter inte störa studiens grundläggande utformning.

▼M4

4. Utspädningar av korrosiva eller irriterande testkemikalier kan testas vid koncentrationer som kommer att ge den önskade graden av toxicitet. För ytterligare information se GD 39 (2). När djur utsätts för dessa material bör målkoncentrationerna vara tillräckligt låga för att inte orsaka avsevärd smärta och lidande, men ändå tillräckliga för att utsträcka koncentration-respons-kurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppnås. Dessa koncentrationer bör väljas från fall till fall, företrädesvis baserade på en adekvat utformad undersökning av spännvidden som ger information om den kritiska endpointen, eventuellt tröskelvärde för irritation och tiden för de första tecknen (se punkterna 11–13). Motivering för valet av koncentration ska anges.

5. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt. Döende djur betraktas på samma sätt som de som dör under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecken på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

6. I testet bör friska unga vuxna gnagare användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta. Motivering ska ges om annan art används.

Förberedelse av djuren

7. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På dagen för randomiseringen bör djuren vara unga vuxna 7 till 9 veckor gamla. Kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet. Djuren väljs ut slumpvis och märks för individuell identifikation, och får därefter acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten.

Djurhållning

8. Djuren bör identifieras individuellt, företrädesvis med subkutana transpondrar för att underlätta observationer och undvika förvirring. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

▼M4

Inhalationskammare

9. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och ändamålet med testet. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringens principer och särskilda för- och nackdelar behandlas i GD 39 (2).

TOXICITETSSTUDIER

Koncentrationsgränser

10. Till skillnad från akuta studier finns det inga fastställda koncentrationsgränser i studier av subkronisk inhalationstoxicitet. För den högsta testade koncentrationen bör man beakta: 1) högsta möjliga koncentration, 2) värsta tänkbara fall av mänsklig exponering, 3) behovet av att ge en tillräcklig syretillförsel och/eller 4) djurskyddsskäl. I avsaknad av databaserade gränsvärden, får de akuta gränsvärdena i förordning (EG) nr 1272/2008 (13) användas (dvs. upp till en högsta koncentration av 5 mg/l för aerosoler, 20 mg/l för ångor och 20 000 ppm för gaser); se GD 39 (2). Motivering ska ges om det är nödvändigt att överskrida dessa gränsvärden vid testning av gaser eller mycket flyktiga testkemikalier (t.ex. köldmedier). Koncentrationsgränsen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

Spännviddsstudie

11. Innan huvudstudien påbörjas är det i allmänhet nödvändigt att genomföra en spännviddsstudie. En spännviddsstudie är mer omfattande än en inledande studie eftersom den inte är begränsad till valet av koncentration. Kunskap från en spännviddsstudie kan leda till en lyckad huvudstudie. En spännviddsstudie kan till exempel ge teknisk information om analysmetoder, partikeldimensionering, upptäckt av toxiska mekanismer, klinisk patologi- och histopatologidata, och en uppskattning av vad som kan vara NOAEL- och MTC-koncentrationer i en huvudstudie. Försöksledaren kan välja att använda en spännviddsstudie för att identifiera tröskelvärdet för irritation i luftvägarna (t.ex. med histopatologi i luftvägarna, lungfunktionstest eller lungsköljning), den övre koncentration som tolereras utan att djuren utsätts för onödig stress och de parametrar som bäst kännetecknar en testkemikalies toxicitet.

12. En spännviddsstudie kan bestå av en eller flera koncentrationsnivåer. Beroende på de endpoints som valts bör 3 till 6 hanar och 3 till 6 honor exponeras vid varje koncentrationsnivå. En spännviddsstudie ska pågå under minst 5 dagar och vanligtvis inte mer än i 28 dagar. Motiveringen för valet av koncentrationer till huvudstudien ska ges i undersökningsrapporten. Syftet med huvudstudien är att påvisa ett koncentration-respons-förhållande baserat på vad som förväntas vara den mest känsliga endpointen. Den låga koncentrationen bör helst vara en koncentration utan en påvisbar skadlig effekt medan den höga koncentrationen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

▼M4

13. Vid valet av koncentrationsnivåer för spännviddsstudien bör all tillgänglig information beaktas, inklusive struktur-aktivitetsförhållanden samt data för liknande kemikalier (se punkt 3). En spännviddsstudie kan verifiera/motbevisa vad som anses vara de endpoints som är mest mekanistiskt baserade, t.ex. kolinesterasinhibition av organiska fosforföreningar, methemoglobinbildning av erytrocytotoxiska agens, sköldkörtelhormoner (T_3, T_4) för tyreotoxiska ämnen, protein, LDH eller neutrofiler i bronkoalvelvolär sköljning för ofarliga svårlösliga partiklar eller lungretande aerosoler.

Huvudstudie

14. Huvudstudien för subkronisk toxicitet består i allmänhet av tre koncentrationsnivåer och även samtidiga negativa (luft) och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 18). Alla tillgängliga data bör användas för att underlätta valet av lämpliga exponeringsnivåer, inklusive resultaten från de systematiska toxicitetsstudierna, metabolism och kinetik (särskild vikt bör läggas vid att undvika höga koncentrationsnivåer som mättar kinetiska processer). Varje testgrupp består av 10 hangnagare och 10 hongnagare som exponeras för testkemikalien 6 timmar per dag 5 dagar per vecka under en period på 13 veckor (total studielängd minst 90 dagar). Djuren kan också exponeras 7 dagar per vecka (t.ex. vid testning av läkemedel som inhaleras. Om ett kön är känt för att vara mer mottagligt för en viss testkemikalie kan könen exponeras vid olika koncentrationsnivåer för att optimera koncentrationsresponsen enligt beskrivningen i punkt 15. Om andra gnagare än råttor exponeras enbart nos, får maximala exponeringstider justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder kortare exponeringstid än 6 timmar/dag, eller när det är nödvändigt att utföra en helkroppsexponeringsstudie med lång varaktighet (t.ex. 22 timmar/dag) (se GD 39) (2). Inget foder ska ges under exponeringsperioden, om den inte överskrider 6 timmar. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

15. Den målkoncentration som valts ska identifiera målorgan(en) och påvisa en tydlig koncentrationsrespons:

— Den höga koncentrationsnivån bör leda till toxiska effekter, men inte orsaka kvardröjande tecken eller dödlighet, vilket kan förhindra en meningsfull utvärdering.

— Den mellanliggande koncentrationsnivån(erna) bör spridas ut för gradering av toxiska effekter mellan den låga och höga koncentrationen.

— Den låga koncentrationsnivån bör frambringa få eller inga belägg för toxicitet.

Avlivande

16. Om avlivning planeras ska antalet djur vid varje exponeringsnivå ökas med det antal som ska avlivas före studiens avslutande. Motiveringen för att använda avlivningar bör tillhandahållas samt statistiska analyser som stöder dem.

▼M4

Satellitstudie (reversibilitet)

17. En satellitstudie (reversibilitet) kan användas för att observera reversibilitet, persistens eller fördröjd toxicitet för en efterbehandlingsperiod av lämplig längd, dock inte mindre än 14 dagar. Satellitgrupper (reversibilitet) består av 10 hanar och 10 honor som exponeras samtidigt med försöksdjuren i huvudstudien. Satellitstudiegrupper bör exponeras för testkemikalien vid den högsta koncentrationsnivån och det bör finnas samtidiga luft- och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 18).

Kontrolldjur

18. Samtidiga negativa (luft-) kontrolldjur bör hanteras på ett sätt som är identiskt med djuren i testgruppen, förutom att de exponeras för filtrerad luft i stället för testkemikalien. När vatten eller annat ämne används för att generera testatmosfären bör en vehikelkontrollgrupp i stället för en negativ (luft-) kontrollgrupp ingå i studien. Vatten bör användas som vehikel närhelst det är möjligt. När vatten används som vehikel bör kontrolldjuren exponeras för luft med samma relativa fuktighet som de exponerade grupperna. Valet av en lämplig vehikel bör grunda sig på en lämpligt utförd förstudie eller historiska data. Om en vehikels toxicitet inte är känd kan försöksledaren välja att använda både en negativ (luft-) kontroll och en vehikelkontroll, men det rekommenderas inte. Om historiska data visar att en vehikel inte är toxisk finns det inget behov av en negativ (luft-) kontrollgrupp och då bör endast en vehikelkontroll användas. Om en förstudie av en testkemikalie som beretts i en vehikel inte visar någon toxicitet, framgår det att vehikeln inte är toxisk vid den testade koncentrationen och att denna vehikelkontroll bör användas.

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

19. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, valda koncentrationer och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas. För att minska partikelstorleken kan partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer. Mer vägledning finns i GD 39 (2).

Partikelstorleksfördelning

20. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 3 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (4). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard, bör en sakkunnig bedömning ges om detta inte kan uppnås. Till exempel blir rökpartiklar av metall mindre än denna standard, och laddade partiklar och fibrer kan överstiga den.

▼M4

Beredning av testkemikalie i en vehikel

21. Testkemikalien ska helst testas utan en vehikel. Om det är nödvändigt att använda en vehikel för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien, bör vatten ges företräde. Närhelst en testkemikalie är upplöst i en vehikel ska dess stabilitet påvisas.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

22. Luftflödet genom exponeringskammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen i realtid av testatmosfärens koncentration (eller temporal stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ger ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta dynamiska inhalationsparametrar. Om koncentrationen övervakas i realtid kan mätfrekvensen för luftflöden minskas till en enda mätning per exponeringsdag. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare. Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att denna standard inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid. Om mätningar under den första exponeringsdagen visar att dessa gaser har korrekta nivåer behöver inga fler mätningar utföras.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

23. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsapparater, för både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas kontinuerligt och registreras varje timme vid varje exponering, om möjligt. Den relativa fuktigheten bör helst upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar), eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: Nominell koncentration

24. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom inhalationskammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: Faktisk koncentration

25. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliekoncentrationen som samlats in i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller genom icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av

▼M4

luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.

26. En sats av testkemikalien ska användas genom hela studien, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet, kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

27. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt. En enhet för realtidsövervakning, såsom en aerosolfotometer för aerosoler eller en analysator för totalkolväte för ångor kan användas för att påvisa stabiliteten för exponeringsförhållandena. Faktisk kammarkoncentration bör mätas minst 3 gånger varje exponeringsdag vid varje exponeringsnivå. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, är det acceptabelt med ett prov per exponeringsperiod. Helst ska detta prov sedan samlas in under hela exponeringsperioden. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor, och inte med mer än ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tid för att uppnå kammarjämvikt (t_{95}) bör beräknas och rapporteras. Varaktigheten för en exponering sträcker sig över den tid som testkemikalien genereras. Detta tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå kammarens jämvikt (t_{95}) och sönderfall. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).

28. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning) kan varje fas bete sig olika i en inhalationskammare. Därför ska minst ett indikatorämne väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva ingrediensen i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i totalblandningen rapporteras, inte bara den aktiva ingrediensen eller indikatorämnet (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: Partikelstorleksfördelning

29. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst en gång i veckan vid varje koncentrationsnivå med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare APS). Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor och det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela studien.

▼M4

30. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas för alla koncentrationer som testats i ett tidigt skede av försöket, kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av hänsyn till djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att studien måste upprepas.

31. Partikeldimensionering bör utföras för ångor om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas.

IAKTTAGELSER

32. Djuren bör observeras kliniskt före, under och efter exponeringsperioden. Mer frekventa iakttagelser kan indikeras beroende på djurens respons under exponeringen. När iakttagelser av djuren hindras genom användning av fasthållningsrör, dåligt upplysta kroppskammare eller ogenomskinlig atmosfär, bör djuren noga observeras efter exponeringen. Observationer före nästa dags exponering kan utvärdera eventuell reversibilitet eller stegrande toxiska effekter.

33. Alla observationer registreras med individuell registrering för varje djur. När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

34. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor, förändringar i andnings- och cirkulationssystemen, förändringar i nervsystemet, samt förändringar i kroppsmotorik och beteendemönster. Uppmärksamhet bör fästas vid iakttagelser av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning. Ytterligare utvärderingar kan inkluderas i studiens protokoll såsom kinetik, biologisk övervakning, lungfunktion, retention av svårlösliga ämnen som ackumuleras i lungvävnad, samt beteendeförändringar.

KROPPSVIKT

35. De enskilda djurens vikt bör registreras strax före den första exponeringen (dag 0), därefter två gånger i veckan (till exempel på fredagar och måndagar för att påvisa återhämtning över ett exponeringsfritt veckoslut, eller under ett tidsintervall för bedömning av systematisk toxicitet), och vid tidpunkten för dödsfallet eller avlivningen. Om inga effekter visas under de 4 första veckorna kan kroppsvikterna mätas en gång i veckan för återstoden av studien. Satellitdjur (reversibilitet) (om det används) ska fortsätta vägas varje vecka under hela återhämtningsperioden. Vid studiens upphörande bör samtliga djur vägas strax före avlivningen för en objektiv beräkning av förhållandet organ-kroppsvikt.

FÖDO- OCH VATTENINTAG

36. Födointaget bör mätas varje vecka. Vattenintaget bör också mätas.

▼M4

KLINISK PATOLOGI

37. Kliniska patologiska bedömningar bör göras av samtliga djur, inklusive kontroll- och satellitdjur (reversibilitet) när de avlivas. Tidsintervallet mellan exponeringens upphörande och insamlingen av blod ska registreras, i synnerhet när rekonstitueringen av endpointen är snabb. Provtagning efter att exponeringen har upphört indikeras för dessa parametrar med ett kort plasmaprov halvtid (t.ex. COHb, CHE och MetHb).

38. Tabell 1 listar de kliniska patologiska parametrar som i allmänhet krävs för alla toxikologiska studier. Urinanalys krävs inte rutinmässigt, men kan utföras när det bedöms lämpligt utifrån förväntad eller observerad toxicitet. Försöksledaren kan välja att bedöma ytterligare parametrar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet (t.ex. kolinesteras, lipider, hormoner, syra/bas-balans, methemoglobin eller Heinz-kroppar, kreatinkinas, myeloid/erytroid-förhållande, troponiner, arteriella blodgaser, laktatdehydrogenas, sorbitaldehydrogenas, glutamatdehydrogenas och gamma-glutamyltranspeptidas).

Tabell 1

Standardiserade parametrar för klinisk patologi

Hematologi	
Erytrocytantal	Totalt antal leukocyter
Hematokrit	Differentalt leukocytantal
Hemoglobinkoncentration	Trombocytantal
Medelvärde för korpuskulärt hemoglobin	Koaguleringsförmåga (välj ett alternativ):
Medelvärde för korpuskulär volym	— Protrobintid
Medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration	— Koagulationstid
Retikulocyter	— Partiell tromboplastintid
Klinisk kemi	
Glukos (*)	Alaninaminotransferas
Totalkolesterol	Aspartataminotransferas
Triglycerider	Alkaliskt fosfatas
Blodureakväve	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Totalprotein	Fosfor
Albumin	Klorid
Globulin	
Urinalys (valfritt)	
Utseende (färg och grumlighet)	Totalprotein
Volym	Glukos
Specifik vikt eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Eftersom en lång fasteperiod kan införa partiskhet i glukosmätningar för de behandlade djuren jämfört med kontrolldjuren, bör försöksledaren avgöra om det är lämpligt att djuren fastar. Om man använder en fasteperiod bör den vara avpassad för den art som används, för råtta kan det vara 16 timmar (fastande över natten). Bestämning av fasteglukos kan utföras efter en natts fasta under den sista exponeringsveckan, eller efter en natts fasta innan obduktionen (i det senare fallet tillsammans med alla andra kliniska patologiska parametrar).

▼**M4**

39. När det finns bevis på att de nedre luftvägarna (dvs. alveolerna) är den främsta platsen för deponering och lagring, då kan lungsköljning vara det tekniska valet för att kvantitativt analysera hypotesbaserade doseffektparametrar med fokus på alveolit, lunginflammation och fosfolipidos. Detta gör att dosrespons och tidsförloppsförändringar för alveolär skada grundligt kan undersökas. BAL-vätskan kan analyseras för totalt och differentiellt leukocytantal, totalprotein och laktatdehydrogenas. Andra parametrar som kan beaktas är de som tyder på lysosomal skada, fosfolipidos, fibros, och irriterande eller allergisk inflammation som kan innefatta bestämning av pro-inflammatoriska cytokiner/kemokiner. BAL-mätningar kompletterar i allmänhet resultaten från histopatologiska undersökningar, men kan dock inte ersätta dem. Vägledning om hur man utför lungsköljning finns i GD 39 (2).

OFTALMOLOGISK UNDERSÖKNING

40. Med ett oftalmoskop eller motsvarande anordning bör oftalmologiska undersökningar av fundus, brytningsmedia, iris och konjunktival utföras på samtliga djur före administreringen av testkemikalien, och för samtliga högkoncentrations- och kontrollgrupper vid avlivning. Om förändringar i ögonen upptäcks, ska samtliga djur i de andra grupperna undersökas, inklusive satellitgruppen (reversibilitet).

MAKROSKOPISK PATOLOGI OCH ORGANVIKTER

41. Samtliga försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl, bör underkastas fullständig blodtömning (om möjligt) och obduceras. Tidsperioden mellan slutfasen av varje djurs exponering och dess avlivning ska registreras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur påfunnits, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

42. Tabell 2 visar de organ och vävnader som bör bevaras i ett lämpligt medium under obduktion för histopatologisk undersökning. Bevarandet av organ och vävnader **[**inom hakparentes**]** och eventuellt andra organ och vävnader avgörs av försöksledaren. Organen i **fetstil** ska putsas och vägas våta så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Sköldkörteln och bitestiklarna bör endast vägas om det behövs, eftersom trimning av artefakter kan hindra en histopatologisk utvärdering. Vävnader och organ bör fixeras i 10 % buffrad formalin eller annat lämpligt fixativ så snart obduktionen utförts, och inte mindre än 24–48 timmar före trimning beroende på det fixativ som ska användas.

▼M4

Tabell 2

Organ och vävnader som bevaras vid obduktion

Binjurar	Esofagus
Aorta	[Luktbulb]
Benmärg (och/eller färskt aspirat)	**Äggstockar**
Hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	Pankreas
Cekum	Biköldkörtlar
Kolon	Perifer nerv (ischias eller tibia), helst nära muskeln)
Tolvfingertarm	Hypofys
[**Epididymis**]	Prostata
(Ögon [retina, synnerv] och ögonlock)	Rektum
Lårbenet och knäleden	Spottkörtlar
Gallblåsa (i förekommande fall)	Sädesblåsor
[Harderiankörtlar]	Hud
Hjärta	Ryggmärg (cervikala, mitt på bröstkorgen och ländryggen)
Ileum	**Mjälte**
Jejunum	Bröstben
Njurar	Mage
[Tårkörtlar (extraorbitala)]	Tänder
Larynx (3 nivåer inklusive struplockets bas)	**Testiklar**
Lever	**Tymus**
Lungor (alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker)	**Sköldkörtlar**
Lymkörtlar från lungans hilarregion, särskilt beträffande svårlösliga partikeltestkemikalier. För mer ingående undersökningar och/eller studier med immunologi i fokus kan ytterligare lymfkörtlar beaktas, t.ex. de från de mediastinala, cervikala/submandibulära och/eller aurikulära regionerna	[Tunga]
Lymfkörtlar (distalt från ingångshålet)	Luftstrupe (minst 2 nivåer inklusive 1 längdsnitt genom carina och 1 tvärsnitt)
Mjölkkörtlar (honor)	[Ureter]
Muskel (lår)	[Uretra]
Nasofaryngeala vävnader (minst 4 nivåer; 1 nivå för att inkludera den nasofaryngeala kanalen och den nasalassocierade lymfvävnaden (NALT))	Urinblåsa
	Uterus
	Målorgan
	Alla större skador och massor

▼M4

43. Lungorna bör avlägsnas intakta, vägas och indränkas med lämpligt fixativ vid ett tryck på 20–30 cm vatten för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls (5). Sektioner bör samlas in för alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker, men om lungsköljning utförs ska den osköljda loben sektioneras på tre nivåer (ej seriella sektioner).

44. Minst 4 nivåer av nasofaryngeala vävnader bör undersökas, varav en ska innehålla den nasofaryngeala kanalen (5) (6) (7) (8) (9) för en adekvat undersökning av den skvamösa, mellanliggande (icke-cilierade respiratoriska), respiratoriska (cilierade respiratoriska) och luktepitelet, och den dränerade lymfvävnaden (NALT((10) (11). Tre nivåer av struphuvudet bör undersökas, och en av dessa nivåer bör inkludera struplockets bas (12). Minst två nivåer av luftstrupen bör undersökas, inklusive ett längdsnitt genom förgreningen av carinan för de extrapulmonella bronkerna, samt ett tvärsnitt.

HISTOPATOLOGI

45. En histopatologisk utvärdering av alla organ och vävnader som räknas upp i tabell 2 bör utformas för kontroll- och högkoncentrationsgrupperna och för alla djur som dör eller avlivas under studien. Särskild uppmärksamhet bör ges åt luftvägarna, målorganen och större skador. Organ och vävnader som har skador i högkoncentrationsgruppen bör undersökas i alla grupper. Försöksledaren kan välja att utföra histopatologiska utvärderingar av flera grupper för att påvisa en tydlig koncentrationsrespons. Om en satellitgrupp (reversibilitet) används bör en histopatologisk utvärdering göras av samtliga vävnader och organ där effekter visats i de behandlade grupperna. Om det finns alltför många tidiga dödsfall eller andra problem i högkoncentrationsgruppen som äventyrar datans signifikans, bör nästa lägre koncentration undersökas histopatologiskt. Ett försök bör göras att korrelera större observationer i relation till mikroskopiska fynd.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Individuella data om djurens kroppsvikt, födointag, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvikter och histopatologi ska lämnas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd. Samtliga resultat, kvantitativa och tillfälliga, ska utvärderas genom en lämplig statistisk metod. En allmänt vedertagen statistisk metod kan användas, och statistiska metoderna bör väljas under studiens utformning.

Testrapport

47. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

▼M4

— Art/stam som används och motivering för att använda andra arter än råtta. Källor och historiska data kan tillhandahållas om de är från djur som har exponerats under liknande exponering, inhysning och fastebetingelser.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Detaljerad beskrivning av inhalationskammaren inklusive volym och ett diagram.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla och system som används för konditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i kammaren (helkropp).

— Testatmosfärens stabilitet.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Behandling av luft som tillförs/extraheras.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Tid tills inhalationskammaren har nått jämvikt (t95).

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grund för valet av målkoncentration i huvudstudien.

▼**M4**

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testkemikalien som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.

— Alla luftkoncentrationer bör redovisas i massenheter (mg/l, mg/m^3, etc.) snarare än volymenheter (ppm, ppb, etc.).

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om beredning av testkemikalien, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta material eller för att bereda testlösningar.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och för att exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den utrustning som används för att övervaka kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde (dvs. utarbetningen av en kalibreringskurva).

— Uppgifter om den utrustning som används för att samla in prover för bestämning av kammarens koncentration och partikelstorleksfördelning.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som används och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Metod för randomisering av djur till test- och kontrollgrupper.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).

▼M4

— Tabelluppställning av de enskilda djurens vikt.

— Tabelluppställning av födointag.

— Tabelluppställning av kliniska patologiska data.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av metoderna som används för att uppfylla kriterierna för denna testmetod t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör behandlas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

— En förklaring bör ges om det fanns behov av att avliva djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

— Målorganet(en) bör identifieras.

— NOAEL och LOAEL bör bestämmas.

LITTERATUR

(1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. I: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasala diagram: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

(13) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (Text av betydelse för EES), EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

B.30 STUDIER AV KRONISK TOXICITET

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 452 (2009). Den ursprungliga TG 452 antogs 1981. Utvecklingen av denna reviderade testmetod B.30 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (1) (2) (3) (4). Uppdateringen av denna testmetod B.30 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.32 i denna bilaga, karcinogenicitetsstudier, och kapitel B.33 i denna bilaga, i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier.

2. Majoriteten av kroniska toxicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare gäller också de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod, tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (5), med lämpliga ändringar som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (6).

3. De tre huvudsakliga administreringssätten som används i kroniska toxicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringssätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6).

4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via den orala vägen, den väg som används mest i kroniska toxicitetsstudier. Även om långsiktiga kroniska toxicitetsstudier som medför exponering via hud eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, så innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av kronisk toxicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier genom inhalation (6) (7) och via huden (6). Kapitel B.8 i denna bilaga (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om testning av akut inhalation (7), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (10) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.

▼M4

5. Studien om kronisk toxicitet ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering över en stor del av livslängden för de arter som används. Studien kommer att ge information om de toxiska effekterna hos testkemikalien, samt indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan också ge en uppskattning om de icke-observerade nivåerna för skadliga biverkningar som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.

6. Målen för de studier som omfattas av denna testmetod inkluderar:

— Identifieringen av den kroniska toxiciteten för en testkemikalie.

— Identifieringen av målorganen.

— Karakterisering av förhållandet dos-respons.

— Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).

— Förutsägelsen av kroniska toxicitetseffekter på nivåer för mänsklig exponering.

— Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningssätt (6).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxikologiska egenskaperna hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa den kroniska toxicitetspotentialen och minimera användningen av djur. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, eventuell information om verkningssätt, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester; förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering. Fastställandet av kronisk toxicitet bör endast utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars tester med upprepad dosering. Ett stegvist förhållningssätt till testning av kronisk toxicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (11) (12) (13) (14).

8. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga kan inbegripa huruvida statistiken ska omfatta justeringar för överlevnad och analys i händelse av förtida avlivning av en eller flera grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (6), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (15).

▼M4

9. Vid genomförandet av en studie om kronisk toxicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (16). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att ”I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen.”

10. Detaljerad vägledning om och diskussion om principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (6) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (17) (18). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppstå mellan faroundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosresponser och deras betydelse på den andra. Detta är särskilt relevant i en situation där en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga) genomförs (punkt 11).

11. Man bör överväga att genomföra en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (denna testmetod B.30) och en studie av karcinogenicitet (kapitel B.32 i denna bilaga). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datans kvalitet i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges för principerna av valet av dos (punkterna 9 och 20–25) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk.

12. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet nr 116 (6).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

13. Testkemikalien administreras dagligen i graderade doser till flera grupper försöksdjur, i allmänhet under en 12-månadersperiod, även om kortare eller längre varaktigheter kan väljas beroende på myndighetskrav (se punkt 33). Denna längd är vald för att vara tillräckligt lång för att eventuella effekter av kumulativ toxicitet blir uppenbara, utan de störande effekterna av geriatriska förändringar. Avvikelser från exponeringstider på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Testkemikalien administreras normalt oralt även om inhalation eller via huden också kan vara lämpligt. Studiens utformning kan även omfatta en eller flera avlivningar t.ex. vid 3 eller 6 månader, och ytterligare djur kan inkluderas för att tillgodose detta (se punkt 19). Under administreringsperioden observeras djuren noggrant efter tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

▼M4

METODBESKRIVNING

Val av djurart

14. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av kronisk toxicitet hos gnagare (se punkt 2) även om liknande studier av icke-gnagare kan krävas under vissa regelverk. Valet av art bör motiveras. Utformning och genomförande av studier av kronisk toxicitet i icke-gnagare, när så krävs, bör baseras på de principer som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (5). Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6).

15. I den här testmetoden används råtta, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Studien av kronisk toxicitet måste utföras med djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande studien(rna) av toxicitet med kortare varaktighet. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

16. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (19) (20) (21). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fytoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

17. Friska djur, som har acklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och acklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat

▼M4

för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

18. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas, så att det i slutet av studien finns tillräckligt många djur i varje grupp för en grundlig biologisk och statistisk utvärdering. För gnagare ska minst 20 djur per kön och grupp normalt användas vid varje dosnivå, medan det för icke-gnagare rekommenderas ett minsta antal av 4 per kön och grupp. I studier där möss ingår behövs fler djur i varje dosgrupp för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar.

Avsättningar för avlivningar, satellitgrupper och kontrolldjur

19. Studien får föreskriva avlivningar (minst 10 djur/kön/grupp) t.ex. efter 6 månader för information om utvecklingen av toxikologiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. Satellitgrupper kan också ingå för övervakning av reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, dessa begränsas normalt till studiens högsta dosnivå plus kontroll. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan också ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (22), om nödvändigt. Om avlivning eller införlivande av satellit- eller kontrollgrupper planeras, ska antalet djur som ingår i studien ökas med det antal djur som ska avlivas innan studien slutförts. Dessa djur bör normalt genomgå samma observationer, inklusive kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion, hematologiska och kliniska biokemiska mätningar och patologiska undersökningar, som djuren i den kroniska toxicitetsfasen i huvudstudien, även om avsättningar också kan göras (i avlivningsgruppen) för att mätningarna ska begränsas till vissa viktiga mätningar såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

Dosgrupper och dosering

20. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (6). Minst tre dosnivåer och en parallell kontroll ska användas, utom om ett toleranstest utförs (se punkt 27). Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.

▼M4

21. Såvida den inte är begränsad genom testkemikaliens fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån normalt väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Samtidigt som man tar hänsyn till de faktorer som anges nedan i punkt 22, ska den högsta dosnivån väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket framgår av till exempel en sänkning av kroppsviktsökningen (ca 10 %).

22. Dock kan man beroende på målen för studien (se punkt 6), välja en toppdos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har liten eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt. Den övre dosen bör inte överskrida 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag (gränsdos, se punkt 27).

23. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och en NOAEL eller andra avsedda resultat av studien, t.ex. en BMD (se punkt 25) för den lägsta dosnivån. Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas.

24. Den dosnivåspridning som väljs beror på testkemikaliens egenskaper och kan inte föreskrivas i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. en faktor på mer än ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas och motiveras om de används.

25. Som beskrivs vidare i vägledningsdokument nr 116 (6), inkluderar punkter som ska beaktas vid val av dos:

— Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.

— Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.

— Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.

— Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är övervältigande etc.

— Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.

— Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor.

▼M4

26. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

27. Om det kan förväntas, baserat på information från inledande studier, att ett test med en dosnivå motsvarande minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag med hjälp av de förfaranden som beskrivs här inte ger några skadliga effekter, och om toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt besläktade kemikalier, anses en fullständig studie med tre dosnivåer inte vara nödvändig. En gräns på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag kan tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

28. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk/kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.

29. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatsämnen, i förekommande fall: Verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikaliens stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administrering (t.ex. kost), bör finnas tillgängliga.

30. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten, kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.

▼M4

31. Vad gäller oral administrering doseras djuren med testkemikalien dagligen (sju dagar i veckan), vanligtvis under en period på 12 månader (se också punkt 33), även om en längre varaktighet kan krävas beroende på myndighetskrav. Alla andra doseringsscheman, t.ex. fem dagar per vecka, måste motiveras. När det gäller dermal administrering, behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, enligt kapitel B.9 i denna bilaga (10), under en period av 12 månader. Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt en period på 12 månader. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (8).

32. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en singeldos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (22). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

33. Även om den här testmetoden främst är utformad som en 12-månaders kronisk toxicitetsstudie kan den tillämpas på antingen kortare (t.ex. 6 eller 9 månader) eller längre (t.ex. 18 eller 24 månader) varaktighetsstudier, beroende på kraven för särskilda regelverk eller särskilda mekanistiska ändamål. Avvikelser från en exponeringstid på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Satellitgrupper som ingår för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, ska bibehållas utan dosering under en period som inte är kortare än 4 veckor och inte längre än en tredjedel av den totala studieperioden efter avslutad exponering. Ytterligare vägledning, inklusive en bedömning av överlevnaden i studien finns i vägledningsdokument nr 116 (6).

IAKTTAGELSER

34. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er), och ta hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen när det gäller administrering via sondmatning.

▼M4

35. Detaljerade kliniska observationer bör göras på samtliga djur minst en gång före den första exponeringen (för jämförelser inom samma objekt), i slutet av studiens första vecka och därefter varje månad. Observationsprotokollet bör anordnas så att variationerna mellan enskilda observatörer minimeras och är oberoende av testgrupp. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats, ungefär vid samma tidpunkter varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationer i observationsbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek och ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också registreras (24).

36. En oftalmologisk undersökning med ett oftalmoskop eller annan lämplig utrustning bör utföras på samtliga djur före den första administreringen av testkemikalien. Vid slutet av studien bör denna undersökning helst utföras på samtliga djur, men åtminstone på högdos- och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör samtliga djur undersökas. Om strukturell analys eller annan information tyder på okulär toxicitet bör frekvensen på okulära undersökningar höjas.

37. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstest med upprepad dosering indikerade en potential för att framkalla neurotoxiska effekter, bör sensorisk reaktion på stimuli av olika slag (24) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (25), (26), (27), bedömning av greppstyrka (28) och bedömning av motorisk aktivitet (29) eventuellt utföras före studiestarten och vid 3-månadersperioder efter studiestarten till och med 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till också användas.

38. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering indikerade en potential för att orsaka immunologiska effekter, kan ytterligare undersökningar av denna endpoint eventuell utföras vid avslutningen.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

39. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst varje månad, när kemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

▼M4

Hematologi och klinisk biokemi

40. I studier med gnagare bör hematologiska undersökningar utföras på minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, vid 3, 6 och 12 månader, samt vid studiens slut (om längre än 12 månader), på samma djur hela tiden. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar (se punkt 18). För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på hematologiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Blodprover bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus.

41. Följande lista över parametrar bör undersökas (30): total- och differentialräkning av vita blodkroppar, erytrocytantal, trombocytantal, hemoglobinkoncentration, hematokrit (packad cellvolym), medelvärde för korpuskulärvolym (MCV), medelvärde för korpuskulärt hemoglobin (MCH), medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid och aktiverad partiell tromboplastintid. Övriga hematologiska parametrar såsom Heinz-kroppar eller annan atypisk erytrocytmorfologi eller methemoglobin kan mätas på lämpligt sätt beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget bör en flexibel strategi antas, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie. Om testkemikalien har en effekt på det hematopoetiska systemet, kan retikulocytantal och benmärgscytologi också anges, men detta behöver inte utföras rutinmässigt.

42. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader och, särskilt, effekter på lever och njurar bör utföras på blodprov från minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, vid samma tidsintervall som specificerades för den hematologiska undersökningen, med samma djur hela tiden. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga kliniska biokemiska bestämningar. För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på kliniska biokemiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Det rekommenderas att djuren fastar över natten (med undantag av möss) före blodprovstagningen. Följande lista över parametrar bör undersökas (30): glukos, urea (ureakväve), kreatinin, totalprotein, albumin, kalcium, natrium, kalium, totalkolesterol, minst två lämpliga tester för hepatocellular utvärdering (alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, glutamatdehydrogenas, totala gallsyror) (31), och minst två lämpliga tester för hepatobiliär utvärdering (alkaliskt fosfatas, gammaglutamyl transferas, 5'-nukleotidas, totalt bilirubin, totala gallsyror) (31). Andra kliniska kemiska parametrar såsom triglycerider vid fasta, specifika hormoner och kolinesteras kan mätas på lämpligt sätt, beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget finns det ett behov av en flexibel strategi, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie.

▼M4

43. Urinanalyserna bör utföras på minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, på prov som tagits vid samma intervaller som för hematologi och klinisk kemi. Mätningar vid 3 månader behöver inte utföras om ingen effekt syntes på urinanalysen i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Följande lista över parametrar ingick i en sakkunnig rekommendation om kliniska patologiska studier (30): utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, totalprotein och glukos. Andra bestämningar inkluderar keton, urobilinogen, bilirubin och ockult blödning. Ytterligare parametrar kan användas vid behov för att utvidga undersökningen av observerad(e) verkning(ar).

44. Det anses allmänt att utgångsvärden för hematologiska och kliniska kemiska variabler behövs före behandlingen i hundstudier, men inte behöver bestämmas för studier i gnagare (30). Om historiska basdata (se punkt 50) är otillräckliga bör man överväga att generera sådana data.

Patologi

Obduktion

45. Samtliga djur i studien bör normalt underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. En bestämmelse kan också göras (i avlivnings- eller satellitgrupperna) så att mätningarna begränsas till vissa viktiga åtgärder, såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet (se punkt 19). Dessa djur behöver inte obduceras och efterföljande procedurer beskrivs i nedanstående punkter. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur, efter beslut av försöksledaren.

46. Organvikter bör samlas från samtliga djur, förutom de som undantas genom den senare delen av punkt 45. Binjurar, hjärna, bitestiklar, hjärta, njurar, lever, äggstockar, mjälte, testiklar, sköldkörtel (vägda efter fixering, med bisköldkörtlar) och livmoder från samtliga djur (bortsett från de döende och/eller avlivade) putsas från angränsande vävnad, i förekommande fall, och deras våtvikt bestäms så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. I studier med möss är det valfritt med vägning av binjurarna.

47. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (32) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]

▼M4

koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör organen som anges för oralt intag bevaras, och det är viktigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

48. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (32). Den minsta histopatologiska undersökningen bör vara:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter.

— Målvävnader, eller vävnader som uppvisade behandlingsrelaterade förändringar i högdosgruppen, från samtliga djur i alla andra doseringsgrupper.

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Data

49. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

50. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.

51. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. De statistiska metoderna och datan som ska analyseras bör väljas vid utformningen av studien (punkt 8). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

Testrapport

52. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

— Kemikaliens källa.

— Satsnummer.

— Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön vid testets början.

▼M4

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Försöksbetingelser:

— Grund för administreringssätt och dosval.

— I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning.

— Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.

— Administreringssätt och uppgifter om testkemikaliens administrering.

— Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.

— Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras):

— Överlevnadsdata.

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.

— Uppgifter om toxiska reaktioner efter kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

— Art, förekomst (och, om protokoll förts, allvarlighetsgrad) och de kliniska observationernas varaktighet (om övergående eller permanenta).

— Oftalmologiska undersökningar.

— Hematologiska tester.

— Kliniska biokemiska undersökningar.

— Urinanalystester.

— Resultaten från eventuella undersökningar av neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

— Terminal kroppsvikt.

— Organvikter (och deras kvoter, om tillämpligt).

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av samtliga behandlingsrelaterade histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata, i förekommande fall.

▼M4

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

— Dos: responssamband

— Beaktande av eventuell information om verkningssätt.

— Diskussion om eventuella modellstrategier.

— BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.

— Historiska kontrolldata.

— Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

(5) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90-dagars upprepat oraltest på icke-gnagare).

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO (2009) 28, OECD, Paris.

(8) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.

(9) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.

(10) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(31) EMEA (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼B

B.31 **TEST AVSEENDE PRENATAL UTVECKLINGSTOXICITET**

1. **METOD**

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 414 (2001).

1.1 INLEDNING

Denna metod för test av utvecklingstoxicitet är avsedd att ge allmän information om verkningarna av prenatal exponering på dräktiga försöksdjur och på den organism som utvecklas i livmodern. Detta kan inbegripa utvärdering av verkningarna på såväl modern som på fostret (död, strukturella abnormaliteter eller avvikande tillväxt). Funktionsstörningar omfattas inte av denna testmetod, även om de utgör en viktig del av utvecklingen. Funktionsstörningar kan testas separat eller i kombination med detta test genom användning av metoden för test avseende utvecklingsneurotoxicitet. För information om testning av funktionsstörningar och andra postnatala verkningar hänvisas till testmetoden för reproduktionstoxicitet på två generationer och till testmetoden för utvecklingsneurotoxicitet.

Denna testmetod kan i enskilda fall behöva anpassas i enlighet med speciell kännedom om t.ex. de fysikalisk-kemiska eller toxikologiska egenskaperna hos det ämne som testas. Sådan anpassning kan godtas om det föreligger övertygande vetenskapliga bevis om att anpassningen leder till ett mer informativt test. I sådana fall bör testrapporten innehålla en detaljerad redogörelse för de vetenskapliga bevis som åberopas.

1.2 DEFINITIONER

Utvecklingstoxikologi: Undersökning av sådana skadliga verkningar på en organism under utveckling som kan uppstå till följd av exponering före befruktningen, under den prenatala utvecklingen eller postnatalt fram till könsmognaden. Utvecklingstoxiciteten tar sig främst uttryck som 1) organismens död, 2) strukturell abnormalitet, 3) avvikande tillväxt och 4) funktionsstörningar. Utvecklingstoxicitet benämndes tidigare ofta teratogenicitet.

Skadlig verkning: Varje sådan behandlingsrelaterad avvikelse från normaltillståndet som minskar organismens förmåga att överleva, föröka sig eller anpassa sig till omgivningen. Begreppet utvecklingstoxicitet i dess vidaste mening omfattar alla verkningar som stör den normala utvecklingen hos conceptus, både före och efter födseln.

Avvikande tillväxt: En vikt- eller storleksavvikelse hos avkommans organ eller kropp.

Avvikelser (anomalier): Strukturella utvecklingsavvikelser; här inbegrips både missbildningar och variationer (28).

Missbildning/betydande abnormalitet: En strukturell ändring som bedöms vara skadlig för djuret (kan också vara dödlig) och som i regel är sällsynt.

▼B

Variation/mindre abnormalitet: En strukturell ändring som bedöms vara endast lite eller inte alls skadlig för djuret; den kan vara övergående och vara relativt vanlig hos kontrollpopulationen.

Conceptus: Summan av derivat från ett befruktat ägg vid varje utvecklingsstadium från befruktning till födsel; här inbegrips omgivande membran samt själva embryot eller fostret.

Implantation (nidation): Det förlopp då blastocyten fäster sig vid livmoderns epitelhinna; här ingår blastocytens penetrering av livmoderepitelet och inbäddning i endometriet.

Embryo: Det tidiga utvecklingsstadiet hos en organism, särskilt den produkt som utvecklas till följd av befruktningen av ett ägg, från det att den långa axeln har framträtt tills alla viktiga strukturer finns närvarande.

Embryotoxicitet: Skadlig för den normala strukturen, utvecklingen, tillväxten eller livsdugligheten hos ett embryo.

Foster: Den ofödda avkomman under den postembryonala perioden.

Fostertoxicitet: Skadlig för den normala strukturen, utvecklingen, tillväxten eller livsdugligheten hos ett foster.

Abort: Prematur utstötning av befruktningsprodukterna (embryot eller ett icke-livsdugligt foster) ur livmodern.

Resorption: Conceptus som har dött efter implantationen i livmodern och som resorberas eller har resorberats.

Tidig resorption: Tecken på implantation utan ett igenkännbart embryo eller foster.

Sen resorption: Dött embryo eller foster med externa degenerativa förändringar.

NOAEL: Förkortning för ’no-observed-adverse-effect level’ (nivå där inga skadliga verkningar observeras), dvs. den högsta dos- eller exponeringsnivå vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 REFERENSÄMNE

Inga.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Normalt tillförs testämnet till de dräktiga djuren minst från tidpunkten för implantationen till en dag före den planenliga avlivningsdagen. Den senare bör ligga så nära den normala nedkomstdagen som möjligt utan att det finns risk för att testdata går förlorade på grund av prematur nedkomst. Testmetoden är inte avsedd för undersökning enbart av organogenesperioden (t.ex. dag 5–15 hos gnagare och dag 6–18 hos kanin), utan även av verkningarna från tidpunkten för preimplantation (när det är tillämpligt) genom hela dräktighetsperioden fram till dagen före kejsarsnittet. Kort före kejsarsnittet avlivas hondjuren, livmoderinnehållet undersöks och fostren undersöks med avseende på externt observerbara anomalier och med avseende på mjukvävnads- och skelettavvikelser.

▼B

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Val av djurart**

Det rekommenderas att testningen görs på de mest relevanta arterna, och att laboratoriearterna och stammarna är desamma som normalt används för testning av prenatal utvecklingstoxicitet. Rekommenderad gnagare är råtta och rekommenderad icke-gnagare är kanin. Om andra arter används måste detta motiveras.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i försöksdjurens rum bör vara 22 °C (± 3 °C) för gnagare och 18 °C (± 3 °C) för kaniner. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Även om individuell inhysning av parade djur är att rekommendera, godtas även inhysning i små grupper.

1.5.3 **Förberedelse av djuren**

För testet används friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön under minst fem dagar och som inte har använts för tidigare test. Försöksdjuren karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren i alla testgrupper bör vara så lika som möjligt med avseende på vikt och ålder. För alla dosnivåer används unga vuxna hondjur som inte har fått ungar. Hondjuren bör paras med handjur av samma art och stam. Parning av syskon bör undvikas. För gnagare räknas dräktighetsdag 0 som den dag då en vaginalpropp eller sperma kan observeras. För kaniner räknas dag 0 i regel som dagen för coitus eller artificiell insemination, om sådan används. De parade hondjuren fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur förses med ett unikt identifieringsnummer. De parade hondjuren fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper. Om hondjuren paras i satser bör djuren i varje sats fördelas jämnt över grupperna. Likaså bör hondjur som har befruktats av samma handjur fördelas jämnt över grupperna.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 **Djurens antal och kön**

Varje test- och kontrollgrupp bör innehålla ett tillräckligt antal hondjur för att det vid obduktionen ska finnas cirka 20 hondjur som har implantation. Grupper där mindre än 16 djur har implantation kan vara olämpligt. Mortalitet hos moderdjuren leder inte nödvändigtvis till att testet blir ogiltigt, förutsatt att mortaliteten inte överskrider cirka 10 %.

▼B

1.6.2 **Förberedelse av doserna**

Om vehikel eller någon annan tillsats används för att underlätta tillförseln bör följande beaktas: Verkningarna på absorption, distribution, metabolism och kvarhållande eller utsöndring av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper till den del dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd. Den vehikel som används får inte vara utvecklingstoxisk eller påverka reproduktionen.

1.6.3 **Dosering**

Testämnet bör i regel ges dagligen från och med implantationen (t.ex. dag 5 efter parningen) fram till dagen före det planenliga kejsarsnittet. Om preliminära test, i den mån sådana har gjorts, inte indikerar en hög potential för förluster före implantationen kan behandlingen förlängas till att omfatta hela dräktighets-perioden, från parningen till dagen före den planenliga avlivningen. Det är allmänt känt att olämplig hantering eller stress under dräktigheten kan leda till prenatala förluster. För att förebygga prenatala förluster på grund av faktorer som inte är behandlingsrelaterade bör onödig hantering av dräktiga djur undvikas. Likaså bör man undvika att utsätta sådana djur för stress på grund av externa faktorer såsom buller.

Minst tre dosnivåer och en parallell kontrollgrupp bör användas. Friska djur fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper. Dosnivåerna bör väljas så att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. Såvida det inte finns några begränsningar till följd av testämnets fysikalisk-kemiska eller biologiska egenskaper bör den högsta dosen väljas så att den förväntas förorsaka en viss utvecklingstoxicitet och/eller toxiska verkningar på moderdjuret (kliniska tecken eller minskning av kroppsvikten), men inte död eller allvarligt lidande. Minst en av de mellanliggande dosnivåerna bör ge minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Den lägsta dosnivån bör inte ge några tecken på toxicitet hos moderdjuret eller utvecklingstoxicitet. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad reaktion kan påvisas. En nivå bör väljas så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) uppstår. För fallande dosnivåer är två- till fyrfaldiga dosintervall ofta optimala. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. en faktor som är högre än cirka 6–10). Även om fastställandet av en NOAEL-nivå för moderdjuret är ett mål, kan även test där en sådan nivå inte fastställs vara godtagbara

Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till alla kända toxicitetsuppgifter och all känd tilläggsinformation om metabolismen och de toxikokinetiska egenskaperna hos testämnet eller närbesläktade material. Denna information är också till hjälp när det gäller att demonstrera lämpligheten hos dossystemet.

En parallell kontrollgrupp bör användas. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om vehikel används för tillförsel av testämnet. Alla grupper ges samma volym av testämnet eller vehikeln. Djuren i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) bör hanteras på samma sätt som testgruppsdjuren. Vehikelkontrollgrupperna bör få vehikel i den största mängd som används (samma mängd som ges till den grupp som får den lägsta dosen).

▼B

1.6.4 **Gränstest (limit-test)**

Om ett test med en dosnivå om minst 1 000 mg oralt per kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här, och inga toxiska verkningar kan observeras hos de dräktiga djuren eller deras avkomma, och om verkningar inte förväntas på grundval av kända data (t.ex. data om strukturellt eller metaboliskt närbesläktade ämnen), kan ett fullständigt test med tre dosnivåer bedömas vara överflödigt. Om det är sannolikt att människor kommer att utsättas för exponering måste eventuellt en högre oral dosnivå användas vid gränstestet. För andra former av tillförsel, såsom inandning eller applicering på huden, kan testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper ofta indikera och begränsa den maximala exponeringsnivån (t.ex. applicering på huden får inte förorsaka allvarlig lokal toxicitet).

1.6.5 **Tillförsel av doser**

Testämnet eller vehikeln tillförs i regel oralt via intubation. Om någon annan tillförselväg används bör detta motiveras och det kan vara nödvändigt med tillämpliga modifikationer (2)(3)(4). Testämnet bör tillföras vid ungefär samma tid varje dag.

Dosen till individuella djur bör i regel basera sig på den senaste bestämningen av djurets kroppsvikt. Försiktighet bör dock iakttas när dosen justeras under dräktighetens sista tredjedel. Dosen bör väljas med hänsyn till kända data så att överdrivet kraftig toxicitet på moderdjuret kan undvikas. Om kraftig toxicitet ändå observeras på behandlade moderdjur bör dessa avlivas på ett humant sätt. Om flera dräktiga djur visar tecken på kraftig toxicitet bör man överväga att avsluta den dosgruppen. Om testämnet tillförs genom sondmatning rekommenderas att hela dosen tillförs på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Om majsolja används som vehikel får volymen inte överskrida 0,4 ml per 100 g kroppsvikt. Variationerna i testvolym bör minimeras genom att man justerar koncentrationerna så att en konstant volym kan säkerställas på alla dosnivåer.

1.6.6 **Observationer av moderdjuren**

Kliniska observationer bör göras och registreras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag. Tidpunkterna bör väljas med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Vid observationerna registreras djurens tillstånd (mortalitet, döende djur, relevanta beteendeändringar och alla tecken på uppenbar toxicitet).

1.6.7 **Kroppsvikt och foderkonsumtion**

Djuren bör vägas på dräktighetsdag 0 (eller inte senare än dräktighetsdag 3 om djuren kommer från en utomstående uppfödare hos vilken djuren har parats vid en viss tidpunkt), på den första doseringsdagen, därefter minst var tredje dag under doseringsperioden och till slut på den planenliga avlivningsdagen.

▼B

Foderkonsumtionen bör registreras med tre dagars intervall, på samma dagar som djuren vägs.

1.6.8 **Undersökning post-mortem**

Hondjuren avlivas en dag före den förväntade födslodagen. Hondjur som visar tecken på abort eller prematur födsel före den planenliga avlivningen bör avlivas och bli föremål för en grundlig makroskopisk undersökning.

Vid testets slut eller om djur dör under pågående test ska moderdjuret undersökas makroskopiskt med avseende på strukturella abnormaliteter eller patologiska förändringar. För att få en så hög grad av objektivitet som möjligt bör utvärderingen av moderdjuren under kejsarsnittet och fosteranalyserna helst göras utan kännedom om behandlingsgrupp.

1.6.9 **Undersökning av livmoderinnehåll**

Omedelbart efter testets slut eller så snart som möjligt efter ett dödsfall avlägsnas livmodern och djurens dräktighetsstatus fastställs. Om en livmoder inte har några tecken på dräktighet bör dess status bekräftas t.ex. genom ammoniumsulfidfärgning (för gnagare) eller Salewski-färgning eller någon annan lämplig metod (för kaniner) (5).

Varje dräktig livmoder vägs inklusive livmoderhals. Livmodern behöver inte vägas för djur som har självdött under testets gång.

För dräktiga djur fastställs antalet *corpora lutea*.

Livmoderinnehållet undersöks med avseende på eventuella döda embryon eller foster och antalet levande foster. Graden av resorption bör beskrivas i syfte att uppskatta den relativa tidpunkten för när conceptus har dött (se avsnitt 1.2).

1.6.10 **Undersökning av foster**

För varje foster fastställs kön och kroppsvikt.

Fostren undersöks för externa avvikelser (6).

Fostren undersöks också för avvikelser i skelettet och mjukdelarna (t.ex. variationer och missbildningar eller anomalier) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). Kategorisering av fosteravvikelserna rekommenderas, men krävs inte. Om kategorisering görs, bör kriterierna för definition av de olika kategorierna klart anges. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid reproduktionsorganen, som ska undersökas för tecken på avvikande utveckling.

I fråga om gnagare förbereds cirka hälften av varje kull för undersökningar avseende avvikelser i skelettet. Återstoden förbereds och undersöks för avvikelser i mjukdelarna. För detta används godkända eller lämpliga metoder för seriell sektionering eller tekniker för noggrann dissektion.

▼B

I fråga om icke-gnagare, t.ex. kaniner, bör alla foster undersökas för avvikelser i både mjukdelarna och skelettet. Fosterkropparna dissekeras noggrant och utvärderas med avseende på avvikelser i mjukdelarna. Detta kan inbegripa procedurer för ytterligare utvärdering av den interna hjärtstrukturen (25). Från hälften av de foster som har undersökts på detta sätt avlägsnas huvudet och förbereds för utvärdering av avvikelser i mjukvävnad (ögon, hjärna, nasalpassager och tunga) med användning av normala seriella sektioneringsme-toder (26) eller någon annan lika känslig metod. Kropparna hos dessa foster och återstående intakta foster förbereds och undersöks för avvikelser i skelettet, med användning av samma metoder som har beskrivits för gnagare.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data rapporteras individuellt för moderdjuren och deras avkomma och sammanställs i en tabell. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur vid testets början, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av humana skäl, tidpunkten för alla dödsfall eller humana avlivningar, antalet dräktiga hondjur, antalet djur som visat tecken på toxicitet, en beskrivning av observerade toxicitetstecken (tidpunkten då sådana först upptäcktes, de toxiska verkningarnas varaktighet och allvarlighetsgrad), typerna av observationer om embryon/foster och alla relevanta data om kullarna.

De numeriska resultaten utvärderas med en lämplig statistisk metod, med kullen som enhet för analysen av data. Den statistiska metod som används bör vara allmänt erkänd. Valet av statistiska metoder bör ingå som en del av testets utformning och bör motiveras. Rapporten bör även omfatta data om djur som inte överlever fram till den planenliga avlivningen. Sådana data kan, när det är relevant, inkluderas i gruppens medelvärden. Relevansen hos data från sådana djur bör motiveras och bedömas på individuell grund. Detsamma gäller för avgöranden om huruvida dessa data ska ingå i en grupps medelvärden eller inte.

2.2 UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Resultaten från testet avseende prenatal utvecklingstoxicitet ska utvärderas med avseende på de observerade verkningarna. Utvärderingen bör omfatta följande information:

— Resultaten från test på moderdjur och embryo/foster, inbegripet en utvärdering av förhållandet (eller avsaknaden av ett förhållande) mellan djurens exponering för testämnet och förekomsten av och allvarligheten hos alla fynd.

— Kriterier som används för att kategorisera avvikelser på fostret (externt, mjukvävnad och skelett), om kategorisering har gjorts.

▼B

— I tillämpliga fall historiska kontrolldata som stöd för tolkningen av resultaten.

— De antal som har använts vid beräkning av procenttal eller index.

— I tillämpliga fall adekvat statistisk analys av testresultaten. En sådan analys bör inbegripa tillräcklig information om analysmetoden så att en oberoende granskare eller statistiker kan göra en ny utvärdering och rekonstruera analysen.

Om utfallet tyder på frånvaro av toxiska verkningar bör ytterligare undersökningar för att fastställa testämnets absorption och biotillgänglighet övervägas.

2.3 TOLKNING AV RESULTATEN

Ett test avseende prenatal utvecklingstoxicitet ger information om verkningarna av upprepad exponering för ett ämne på moderdjuren under dräktigheten och på avkommans utveckling inne i livmodern. Testresultaten ska tolkas tillsammans med resultaten från test avseende subkronisk toxicitet, reproduktionstoxi-citet, toxikokinetik och andra test. Eftersom betoning läggs både vid endpointen för allmän toxicitet uttryckt som toxicitet för moderdjuret och vid endpointen för utvecklingstoxicitet, ger testresultatet en viss möjlighet till diskriminering mellan verkningar på utvecklingen i frånvaron av allmän toxicitet och verkningar som endast induceras på nivåer som även är toxiska för moderdjuret (27).

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna specifika uppgifter.

Testämne:

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikation inklusive CAS-nummer, om detta är känt/fastställt.

— Renhetsgrad.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

— Djurens antal och kön.

— Ursprung, förvaringsbetingelser, foder osv.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

— Motivering för val av dosnivåer.

— Utförliga uppgifter om testämnets sammansättning och beredning av fodret, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.

▼B

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Omräkning av testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos (mg per kg kroppsvikt och dag), om tillämpligt.

— Miljöbetingelser.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat:

Data om moderdjurens toxicitetsrespons, inklusive men inte begränsat till följande:

— Antalet djur vid testets början, antalet överlevande djur, antalet dräktiga djur, antalet djur som haft abort och antalet djur med prematur födsel.

— Tidpunkten (dag) för dödsfall under testets gång och huruvida djuren överlevde till testets slut.

— Data om djur som inte överlevde till den planenliga avlivningen bör rapporteras, men inte inkluderas i de statistiska jämförelserna mellan grupper.

— Dagen för observation av varje abnormalt kliniskt tecken och dess fortsatta förlopp.

— Kroppsvikt, kroppsviktsförändringar och livmoderns dräktighetsvikt, inklusive (om så önskas) kroppsviktsförändringar justerade för livmoderns dräktighetsvikt.

— Foderkonsumtion och, om uppmätt, vattenkonsumtion.

— Obduktionsresultat, inklusive livmoderns vikt.

— NOAEL-värden för verkningar på moderdjuren och på utvecklingen bör rapporteras.

”Endpoints” för utvecklingen per dos för kullar med implantation, inklusive följande:

— Antalet *corpora lutea*.

— Antalet implantationer, antalet och procentandelen levande och döda foster samt antalet resorptioner.

— Antalet och procentandelen förluster före och efter implantation.

”Endpoints” för utvecklingen per dos för kullar med levande foster, inklusive följande:

— Antalet och procentandelen levande avkomma.

— Kvoten mellan könen.

— Fostrens kroppsvikt, helst per kön och för båda könen kombinerat.

— Missbildningar (externt, mjukvävnad och skelett) och andra relevanta avvikelser.

— Kriterier för kategorisering, i tillämpliga fall.

▼B

— Totalantalet och procentandelen foster och kullar med avvikelser (externa, mjukvävnad eller skelett) samt typen och förekomsten av individuella anomalier och andra relevanta avvikelser.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Kavlock R.J. *et al.* (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.

2. Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386–398.

3. Wong, B.A., *et al.* (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1–8.

4. US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5. Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

6. Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology.* D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7. Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.

8. Igarashi, E. *et al.* (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381–391.

9. Kimmel, C.A. *et al.* (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229–242.

10. Marr, M.C. *et al.* (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

11. Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291–306.

12. Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.

13. Gibson, J.P. *et al*. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398–408.

14. Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.

15. Marr, M.C. *et al.* (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.

▼B

16. Monie, I.W. *et al.* (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163–173.

17. Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.

18. Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.

19. Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.

20. Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.

21. Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

22. Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251–277.

23. Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

24. Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233–239.

25. Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.

26. Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126–144.

27. US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.

28. Wise, D.L. *et al.* (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249–292.

▼M4

B.32 **KARCINOGENICITETSSTUDIER**

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 451 (2009). Den ursprungliga TG 451 om karcinogenicitetsstudier antogs 1981. Utvecklingen av denna reviderade testmetod B.32 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (2) (3) (4) (5) (6). Uppdateringen av denna testmetod B.32 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.30 i denna bilaga, kroniska toxicitetsstudier, och kapitel B.33 i denna bilaga, kombinerad kronisk toxicitet/karcinogenicitetsstudie i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden B.32 är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier. Det bör påpekas att vissa detaljer och krav kan variera för läkemedel (se internationella konferensen om harmonisering (ICH) vägledning S1B om testning av cancerframkallande läkemedel).

2. Majoriteten av karcinogenicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare, bör de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem som anges i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering med icke-gnagare (6) tillämpas, med lämpliga modifieringar. Ytterligare vägledning finns i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudier (7).

3. De tre huvudsakliga administreringssätten som används i karcinogenicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringssätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i vägledningsdokument nr 116 (7).

4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via oralt intag, det intag som används mest i karcinogenicitetsstudier. Även om karcinogenicitetsstudier som medför exponering via huden eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av karcinogenicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier via huden (7) och genom inhalation (7) (8). Kapitel B.8 i denna bilaga (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om akut inhalationstestning (8), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (11) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.

▼M4

5. Studien om karcinogenicitet ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering under en period som varar upp till hela livslängden för de arter som används. Studien kommer att ge information om de toxiska effekterna hos testkemikalien inklusive potentiell karcinogenicitet, samt indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan ge en uppskattning av den icke-observerade nivån för skadliga biverkningar och, i fallet med icke-genotoxiska karcinogener, för tumörresponser som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.

6. Målen för karcinogenicitetsstudier som omfattas av denna testmetod inkluderar:

— Identifieringen av de cancerframkallande egenskaperna hos en testkemikalie, vilket leder till en ökad incidens av tumörer, ökad andel av maligna tumörer eller en minskning av tiden till uppkomsten av tumörer, jämfört med parallella kontrollgrupper.

— Identifieringen av målorgan för karcinogenicitet.

— Fastställandet av tiden till uppkomst av tumörer.

— Karakterisering av förhållandet tumör-dosrespons.

— Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).

— Framtida konsekvenser av karcinogena effekter vid mänsklig exponering för lågdosnivåer.

— Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningssätt (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av den potentiella karcinogeniciteten hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa den karcinogena potentialen och minimera användningen av djur. Information om, och hänsyn till, verkningsmekanismen hos ett cancerframkallande ämne (2) (7) (12) (13) (14) (15) är särskilt viktig, eftersom den optimala utformningen kan variera beroende på om testkemikalien är en känd eller misstänkt genotoxisk karcinogen. Ytterligare vägledning om beaktande av verkningssätt finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

8. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-genotoxicitetstester; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data, mutagenicitet/genotoxicitet, karcinogenicitet och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering. Bedömning av kronisk toxicitet bör

▼M4

utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering. Kortsiktiga initieringsfrämjande cancertester kan också ge användbar information. Ett stegvist förhållningssätt till testning av karcinogenicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga inkluderar huruvida statistiken bör innefatta justering av överlevnad, analys av kumulativa tumörrisker i förhållande till överlevnadsvaraktighet, analys av tiden till tumören och analys i händelse av förtida terminering av en eller fler grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (7), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (20).

10. Vid genomförandet av en studie om karcinogenicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (21). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att ”I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen.”

11. Detaljerad vägledning om och diskussion av principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (7) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (22) (23). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppstå mellan faroundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosresponser och deras betydelse på den andra. Detta är särskilt relevant i en situation där en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga) genomförs (punkt 12).

12. Man bör överväga att genomföra en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga) och en studie av karcinogenicitet (denna testmetod B.32). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datans kvalitet i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges för principerna av valet av dos (punkterna 11 och 22–25) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk.

▼M4

13. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet nr 116 (7).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Testkemikalien administreras dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur för huvuddelen av deras livslängd, normalt via oralt intag. Testning genom inhalation eller via huden kan också vara lämpligt. Djuren observeras noggrant avseende tecken på toxicitet och för utvecklingen av neoplastiska skador. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

BESKRIVNING AV METOD

Val av djurart

15. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av karcinogenicitet hos gnagare (punkt 2). Användningen av icke-gnagare kan övervägas när tillgängliga data tyder på att de är mer relevanta för förutsägelser av hälsoeffekter på människor. Valet av art bör motiveras. Rekommenderad gnagare är råtta, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Även om användningen av möss i karcinogenicitetstester kan ha begränsad användbarhet (24) (25) (26), krävs fortfarande karcinogenicitetstester med möss under några aktuella regelverk såvida det inte kan fastställas att en sådan studie inte är vetenskapligt nödvändig. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7).

16. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Karcinogenicitetsstudien bör helst utföras på djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande toxicitetsstudien(erna) med kortare varaktighet, dock, om djur från samma stam och ursprung är kända för att ge problem med att uppnå det normalt accepterade kriteriet för överlevnad i långsiktiga studier (se vägledningsdokument nr 116 (7)), bör man överväga att använda en stam med acceptabel överlevnadsgrad för den långsiktiga studien. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Inhysning och utfodring

17. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (27) (28) (29). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej

▼M4

begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fytoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

18. Friska djur, som har acklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och acklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

19. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas så att en grundlig biologisk och statistisk utvärdering är möjlig. Varje dosgrupp och parallell kontrollgrupp bör därför innehålla minst 50 djur av vardera könet. Beroende på syftet med studien finns det möjlighet att öka den statistiska giltigheten för de viktigaste uppskattningarna genom att fördela djuren ojämnt till de olika dosgrupperna, med t.ex. fler än 50 djur i lågdosgruppen, för att uppskatta den cancerframkallande potentialen vid låga doser. Det ska dock erkännas att en måttlig ökning av gruppstorlek ger en relativt liten ökning av den statistiska giltigheten för studien. Ytterligare information om statistisk utformning av studien och val av dosnivåer för att maximera den statistiska giltigheten finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

Avsättningar för avlivningar och satellitgrupper (kontroll)

20. Studien får föreskriva avlivningar t.ex. efter 12 månader för att få information om framskridandet av neoplastiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. Om avlivning är inkluderad i studien, kommer antalet djur i varje dosgrupp som planeras att avlivas normalt vara 10 djur per kön, och det totala antalet djur som ingår i studiens utformning ska ökas med det antal djur som avlivas innan studien slutförs. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (30), om nödvändigt. Mer vägledning finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

▼M4

Dosgrupper och dosering

21. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Minst tre dosnivåer och en parallell kontroll ska användas. Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.

22. Såvida den inte är begränsad genom testkemikaliens fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna, samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Samtidigt som man tar hänsyn till de faktorer som anges nedan i punkt 23, ska den högsta dosnivån väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket framgår av till exempel en sänkning av kroppsviktsökningen (ca 10 %). Dock kan man beroende på målen för studien (se punkt 6), välja en toppdos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har liten eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt.

23. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och, beroende på testkemikaliens verkningssätt, en NOAEL eller andra avsedda resultat från studien t.ex. en BMD (se punkt 25) för den lägsta dosnivån. Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas.

24. Den dosnivåspridning som väljs beror på testkemikaliens egenskaper och kan inte föreskrivas i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas, och ska motiveras om de används.

25. Såsom diskuteras vidare i vägledningsdokument nr 116 (7), inkluderar punkter som ska beaktas vid val av dos:

— Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.

— Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.

— Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.

— Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.

▼M4

— Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.

— Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor.

26. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

27. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk-kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.

28. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatsämnen, i förekommande fall: verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikaliens stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administreringen (t.ex. kost), bör finnas tillgänglig.

29. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten, kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.

▼M4

30. Vad gäller oral administrering doseras djuren med testkemikalien dagligen (sju dagar per vecka), vanligtvis under en period på 24 månader för gnagare (se också punkt 32). Alla andra doseringsscheman, t.ex. fem dagar per vecka, måste motiveras. När det gäller dermal administrering behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka enligt kapitel B.9 i denna bilaga (11) under en period av 24 månader. Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt en period på 24 månader. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (9).

31. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en engångsdos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (31). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

32. Studiens varaktighet är normalt 24 månader för gnagare, vilket motsvarar huvuddelen av livslängden för de djur som används. Kortare eller längre varaktigheter kan användas, beroende på livslängden för djurarten i studien, men bör motiveras. För specifika stammar av möss t.ex. AKR/J-, C3H/J- eller C57BL/6J-stammar kan en varaktighet på 18 månader vara mer lämplig. Det följande ger viss vägledning avseende varaktighet, studiens upphörande och överlevnad, ytterligare riktlinjer som inbegriper en bedömning av huruvida en negativ karcinogenicitet förhåller sig till överlevnad i studien ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (7).

— Studiens upphörande bör beaktas när antalet överlevare i de lägre dosgrupperna understiger 25 procent.

— I de fall där endast högdosgruppen dör i förtid på grund av toxicitet bör detta inte leda till upphörande av studien.

— Överlevnad för vardera kön ska beaktas för sig.

— Studien bör inte fortsätta över den punkt där tillgängliga data från studien inte längre är tillräckliga för att ge en statistisk giltig utvärdering.

▼M4

IAKTTAGELSER

33. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Djuren bör dessutom kontrolleras en gång per dag för särskilda tecken med toxikologisk relevans, med beaktande av maximalt förväntade effekter efter dosering med sondmatning. Särskild uppmärksamhet bör ges åt tumörutveckling och tidpunkten för tumörens uppkomst, plats, mått, utseende, och utvecklingen av varje tydlig eller kännbar tumör ska registreras.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

34. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologiska, kliniska biokemiska och andra mätningar

35. För att maximera informationen som erhållits från studien, särskilt överväganden gällande verkningssätt, kan blodprover tas för hematologi och klinisk biokemi, och detta efter bedömning av försöksledaren. Urinanalys kan även vara lämplig. Ytterligare vägledning om värdet med att ta sådana prov som en del av en karcinogenicitetsstudie finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Om det anses lämpligt kan blodprov för hematologiska och kliniska biokemiska bestämningar och urinanalys utföras som en del i en avlivning (punkt 20) och vid studiens slut på minst 10 djur per kön och grupp. Blodprover bör tas under narkos från ett angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus under narkos, och lagras, om tillämpligt, under lämpliga förhållanden. Blodutstryk kan också beredas för undersökning, särskilt om benmärgen verkar vara målorganet, även om värdet av en sådan undersökning för bestämning av karcinogen/onkogen potential har ifrågasatts (32).

PATOLOGI

Obduktion

36. Samtliga djur i studien med undantag av kontrolldjur (se punkt 20) och andra satellitgrupper, bör underkastas en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur och andra satellitdjur efter beslut av försöksledaren. Organvikter är normalt inte en del av en karcinogen studie, eftersom geriatriska förändringar och, i senare skeden, utvecklingen av tumörer förvirrar användbarheten av organviktsdatan. De kan dock vara avgörande för att göra en sammanvägd bedömning, och särskilt för överväganden beträffande verkningssätt. Om de är en del av en satellitstudie bör de inte samlas in senare än ett år efter studiens inledning.

▼M4

37. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (33) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska också konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör organen som anges för oralt intag bevaras, och det är viktigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitlen B.8 och B.29 i denna bilaga. För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

▼M4

Histopatologi

38. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (33). De vävnader som minst ska undersökas är:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter, inklusive tumörer.

— När behandlingsrelaterade histopatologiska förändringar observeras i högdosgruppen, ska samma vävnader från samtliga djur i alla andra dosgrupper undersökas.

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

39. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

40. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.

41. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid utformningen av studien bör de statistiska metoderna och datan som ska analyseras väljas (punkt 9). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

Testrapport

42. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

▼M4

— Kemikaliens källa.

— Satsnummer.

— Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön vid testets början.

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Försöksbetingelser:

— Grund för administreringssätt och dosval.

— I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning.

— Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.

— Administreringssätt och uppgifter om testkemikaliens administrering.

— Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.

— Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras)

Allmänt

— Överlevnadsdata.

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.

— Toxikokinetiska data (om tillgängligt).

— Oftalmoskopi (om tillgängligt).

— Hematologi (om tillgängligt).

— Klinisk kemi (om tillgängligt).

▼M4

Kliniska fynd

— Tecken på toxicitet.

— Förekomst (och allvarlighetsgrad) av eventuell abnormitet.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är övergående eller permanenta).

Obduktionsdata

— Terminal kroppsvikt.

— Organvikter och deras förhållanden, om tillämpligt.

— Obduktionsfynd, abnormaliteternas förekomst och allvarlighetsgrad.

Histopatologi

— Icke-neoplastiska histopatologiska fynd.

— Neoplastiska histopatologiska fynd.

— Sambandet mellan grova och mikroskopiska fynd.

— Detaljerad beskrivning av alla behandlingsrelaterade histopatologiska fynd, inklusive allvarlighetsgradering.

— Rapport om eventuell inbördes granskning av bilder.

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

— Diskussion om eventuella modellstrategier.

— Dos-responsförhållanden.

— Historiska kontrolldata.

— Beaktande av eventuell information om verkningssätt.

— BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.

— Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

▼M4

(6) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90-dagars upprepat oraltest på icke-gnagare).

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO (2009) 28, OECD, Paris.

(9) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28 dagars studie.

(10) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.

(11) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: an overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279–284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196–1203.

(27) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål, EUT L 276, 20.10.2010, s. 33–79.

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

B. 33 KOMBINERAD KRONISK TOXICITETS-/KARCINOGENICITETSSTUDIE

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 453 (2009). Den ursprungliga TG 453 antogs 1981. Utvecklingen av denna uppdaterade testmetod B.33 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (1) (2) (3) (4) (5). Uppdateringen av denna testmetod B.33 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.32 i denna bilaga, karcinogenicitetsstudier, och kapitel B.30 i denna bilaga, kroniska toxicitetsstudier, i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier. Det bör påpekas att vissa detaljer och krav kan variera för läkemedel (se internationella konferensen om harmonisering (ICH) vägledning S1B om testning av cancerframkallande läkemedel).

2. Majoriteten av kroniska toxicitetsstudier och karcinogenicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare gäller också de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod, med lämpliga modifieringar, tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (6), som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (7).

3. De tre huvudsakliga administrationssätten som används i kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringssätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i vägledningsdokument nr 116 (7).

4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via oralt intag, det intag som används mest i kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudier. Även om långsiktiga studier som medför exponering via huden eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, så innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av kronisk toxicitet och karcinogenicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier via inhalation (7) (8) och genom huden (7). Kapitel B.8 i denna bilaga (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om akut inhalationstestning (8), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (11) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.

▼M4

5. Den kombinerade kronisk toxicitet/karcinogenicitetsstudien ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering under en period som varar upp till hela livslängden för de arter som används. Studien ger information om de toxiska effekterna hos testkemikalien, inklusive potentiell karcinogenicitet, indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan ge en uppskattning av den icke-observerade nivån för skadliga biverkningar och, i fallet med icke-genotoxiska karcinogener, för tumörresponser som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.

6. Målen för kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier som omfattas av denna testmetod inkluderar:

— Identifieringen av de cancerframkallande egenskaperna hos en testkemikalie, vilka leder till en ökad incidens av tumörer, ökad andel maligna tumörer eller en minskning av tiden till uppkomst av tumörer, jämfört med parallella kontrollgrupper.

— Fastställandet av tiden till uppkomst av tumörer.

— Identifieringen av den kroniska toxiciteten hos testkemikalien.

— Identifieringen av målorgan(en) för kronisk toxicitet/karcinogenicitet.

— Karakterisering av förhållandet dos:respons.

— Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).

— Framtida konsekvenser av karcinogena effekter vid mänsklig exponering av lågdosnivåer.

— Förutsägelse av kroniska toxiska effekter på nivåer för mänsklig exponering.

— Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningssätt (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av den potentiella karcinogeniciteten och den kroniska toxiciteten hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa dess toxikologiska egenskaper och minimera användningen av djur. Information om, och hänsyn till, verkningsmekanismen hos ett cancerframkallande ämne (2) (7) (12) (13) (14) (15) är särskilt viktig, eftersom den optimala utformningen kan variera beroende på om testkemikalien är en känd eller misstänkt genotoxisk karcinogen. Ytterligare vägledning om beaktande av verkningssätt finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

8. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, eventuell information om verkningssätt, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-genotoxicitetstester; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data, mutagenicitet/genotoxicitet, karcinogenicitet och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering.

▼M4

Fastställandet av kronisk toxicitet/karcinogenicitet bör endast utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars tester med upprepad dosering. Kortsiktiga initieringsfrämjande cancertester kan också ge användbar information. Ett stegvist förhållningssätt till testning av karcinogenicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga inkluderar huruvida statistiken bör innefatta justering av överlevnad, analys av kumulativa tumörrisker i förhållande till överlevnadsvaraktighet, analys av tiden till tumören och analys i händelse av förtida terminering av en eller fler grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (7), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (20).

10. Vid genomförandet av en studie om karcinogenicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (21). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att ”I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen.”

11. Detaljerad vägledning om och diskussion om principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (7) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (22) (23). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppnås mellan faroundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosresponser och deras betydelse å andra sidan. Detta är särskilt relevant när det gäller denna kombinerade kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudie.

12. Man bör överväga att genomföra denna kombinerade studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet, snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga) och en studie av karcinogenicitet (kapitel B.32 i denna bilaga). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad, och en viss minskning av djuranvändning jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datakvaliteten i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges av principerna för valet av dos (punkterna 11 och 22–26) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet, och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk. Ytterligare vägledning om utformningen av den kombinerade kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudien för att uppnå maximal studieprestanda när det gäller möjligheterna att minska antalet djur som används, så väl som rationalisering av de olika försöksförfaranden finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

▼M4

13. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokument nr 116 (7).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Studien är utformad med två parallella faser, en kronisk fas och karcinogenicitetsfas (se respektive punkt 34 och 35 för varaktighet). Testkemikalien administreras normalt oralt även om inhalation eller via huden också kan vara lämpligt. För den kroniska fasen administreras testkemikalien dagligen i graderade doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp, i allmänhet under en 12-månadersperiod, även om kortare eller längre varaktigheter kan väljas beroende på myndighetskrav (se punkt 34). Denna längd är vald för att vara tillräckligt lång för att eventuella effekter av kumulativ toxicitet blir uppenbara, utan de störande effekterna av geriatriska förändringar. Studiens utformning kan även omfatta en eller flera avlivningar t.ex. vid 3 eller 6 månader, och ytterligare djur kan inkluderas för att tillgodose detta (se punkt 20). För karcinogenicitetsfasen administreras testkemikalien dagligen till flera grupper av försöksdjur under en större del av deras livslängd. Djuren observeras noggrant i båda faserna avseende tecken på toxicitet och utvecklingen av neoplastiska skador. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

METODBESKRIVNING

Val av djurart

15. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av kronisk toxicitet och karcinogenicitet hos gnagare (punkt 2). Användningen av icke-gnagare kan övervägas när tillgängliga data tyder på att de är mer relevanta för förutsägelser av hälsoeffekter på människor. Valet av art bör motiveras. Rekommenderad gnagare är råtta, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Även om användningen av möss i karcinogenicitetstester kan ha begränsad användbarhet (24) (25) (26), krävs fortfarande karcinogenicitetstester med möss under några aktuella regelverk såvida det inte kan fastställas att en sådan studie inte är vetenskapligt nödvändig. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. Utformning och genomförande av kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier i icke-gnagare, när så krävs, bör baseras på de principer som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare med upprepad dosering (6). Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7).

16. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Den kombinerade kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudien bör utföras på djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande toxicitetsstudien(erna) med kortare varaktighet, dock, om djur från samma stam och ursprung är kända för att ge problem med att uppnå det normalt accepterade kriteriet för överlevnad i långsiktiga studier (se vägledningsdokument nr 116 (7)), bör man bör överväga att använda en stam med acceptabel överlevnadsgrad för den långsiktiga studien. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

▼M4

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (27) (28) (29). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fytoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

18. Friska djur, som har acklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och acklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

19. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas så att en grundlig biologisk och statistisk utvärdering är möjlig. För gnagare ska varje dosgrupp (som beskrivs i punkt 22) och parallell kontrollgrupp för studiens karcinogenicitetsfas innehålla minst 50 djur av varje kön. Beroende på syftet med studien finns det möjlighet att öka den statistiska giltigheten för de viktigaste uppskattningarna genom att fördela djuren ojämnt till de olika dosgrupperna, med t.ex. fler än 50 djur i lågdosgruppen, för att uppskatta den cancerframkallande potentialen i låga doser. Det ska dock erkännas att en måttlig ökning av gruppstorlek ger en relativt liten ökning av den statistiska giltigheten för studien. Varje dosgrupp (som beskrivs i punkt 22) och parallell kontrollgrupp för studiens kroniska toxicitetsfas bör innehålla minst 10 djur av varje kön när det gäller gnagare. Det bör noteras att denna

▼M4

siffra är lägre än i studien för kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga). Tolkningen av data från det minskade antalet djur per grupp i den kroniska toxicitetsfasen i denna kombinerade studie kommer dock att stödjas av data från det större antalet djur i studiens karcinogenicitetsfas. I studier där möss ingår behövs fler djur i varje dosgrupp för den kroniska toxicitetsfasen för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar. Ytterligare information om statistisk utformning av studien och val av dosnivåer för att maximera den statistiska giltigheten finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

Avsättningar för avlivningar, satellitgrupp och kontrolldjur.

20. Studien får föreskriva avlivningar efter t.ex. 6 månader för den kroniska toxicitetsfasen för att få information om framskridandet av icke-neoplastiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. De djur som används i den kroniska toxicitetsfasen, normalt 12 månaders varaktighet (punkt 34) ger avlivningsdata för den karcinogena fasen i studien, på så sätt uppnås ett totalt minskat antal djur. Satellitgrupper kan också ingå i den kroniska toxicitetsfasen av studien, för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks. Dessa kan begränsas till studiens högsta dosnivå plus kontroll. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (30), om nödvändigt. Ytterligare vägledning om studiens utformning för att omfatta avlivningar, satellit- och kontrolldjur, samtidigt som antalet djur som används totalt minskas ges i vägledningsdokument nr 116 (7).

21. Om satellitdjur och/eller avlivningar inkluderas i studien, kommer antalet djur i varje dosgrupp som inkluderas i detta syfte normalt vara 10 djur per kön, och det totala antalet djur som ingår i studiens utformning ska ökas med det antal djur som planeras att avlivas innan studien slutförs. Avlivningar och satellitdjur bör normalt genomgå samma observationer, inklusive kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion, hematologiska och kliniska biokemiska mätningar och patologiska undersökningar som djuren i den kroniska toxicitetsfasen i huvudstudien, även om avsättningar också kan göras (i avlivningsgruppen) för att mätningar ska begränsas till vissa viktiga mätningar såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

Dosgrupper och dosering

22. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Minst tre dosnivåer och en parallell kontrollgrupp ska användas, för både den kroniska fasen och karcinogenicitetsfasen. Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.

▼M4

23. För den kroniska toxicitetsfasen, kan en fullständig studie med tre dosnivåer inte anses vara nödvändig om det är troligt att en studie med en dosnivå på motsvarande minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag inte ger några skadliga effekter. Detta bör baseras på information från inledande studier och med hänsyn till att toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt närbesläktade kemikalier. En gräns på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag kan tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

24. Såvida den inte är begränsad genom testkemikaliens fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna, samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Den högsta dosnivån ska normalt väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket t.ex. framgår av en minskning av kroppens viktökning (ca 10 %). Dock kan beroende på målen för studien (se punkt 6), en övre dos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet väljas, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har försumbar eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt.

25. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och, beroende av testkemikaliens verkningssätt, en NOAEL eller andra avsedda resultat från studien t.ex. en BMD (se punkt 27). Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas. Vid genomförandet av en kombinerad karcinogenicitets-/kronisk toxicitetsstudie, är det primära målet att erhålla information för riskbedömning beträffande karcinogenicitet, och information om kronisk toxicitet är normalt ett delmål. Detta bör beaktas vid val av dosnivåer och dosnivåspridning för studien.

26. Den dosnivåspridning som väljs beror på målen med studien och testkemikaliens egenskaper, och kan inte föreskrivas i detalj i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas och motiveras om de används.

27. Såsom vidare beskrivits i vägledningsdokument nr 116 (7), inkluderar punkter som ska beaktas vid valet av dos:

— Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.

— Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.

— Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.

▼M4

— Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.

— Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.

— Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor, särskilt vid valet av mellan- och lågdoser.

28. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

29. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk/kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet, och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.

30. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatsämnen, i förekommande fall: verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikaliens stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administreringen (t.ex. kost), bör finnas tillgänglig.

31. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.

▼M4

32. När det gäller oral administrering doseras djuren dagligen med testkemikalien (sju dagar i veckan) under en period på 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas), se också punkterna 33 och 34. Alla andra doseringsscheman t.ex. fem dagar per vecka måste motiveras. När det gäller dermal administrering, behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, enligt kapitel B.9 i denna bilaga (11), under en period av 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas). Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas). Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (9).

33. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en singeldos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (31). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

34. Doseringsperioden och varaktigheten för den kroniska fasen i den här studien är i allmänhet 12 månader, även om studiens utformning medger och kan tillämpas på antingen kortare (t.ex. 6 eller 9 månader) eller längre (t.ex. 18 eller 24 månader) varaktighetsstudier, beroende på kraven från särskilda regelverk eller särskilda mekanistiska ändamål. Avvikelser från en exponeringstid på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Alla dosgrupper som tilldelats denna fas kommer att avslutas vid den utsatta tidpunkten för utvärdering av kronisk toxicitet och icke-neoplastisk patologi. Satellitgrupper som ingår för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, ska bibehållas utan dosering under en period som inte är kortare än 4 veckor och inte längre än en tredjedel av den totala studieperioden efter avslutad exponering.

35. Studiens varaktighet för den karcinogenicitetiska fasen av studien är normalt 24 månader för gnagare, vilket motsvarar huvuddelen av livslängden för de djur som används. Kortare eller längre varaktigheter kan användas, beroende på livslängden för djurarten i studien, men bör motiveras. För specifika stammar av möss t.ex. AKR/J-, C3H/J- eller C57BL/6J-stammar kan en varaktighet på 18 månader vara mer lämplig. Det följande ger viss vägledning om varaktighet, studiens upphörande och överlevnad, ytterligare vägledning, inbegripet en bedömning av huruvida en negativ karcinogenicitetsstudie i förhållande till överlevnad är godtagbar, finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

▼M4

— Studiens upphörande bör beaktas när antalet överlevare i de lägre dosgrupperna understiger 25 procent.

— I de fall där endast högdosgruppen dör i förtid på grund av toxicitet bör detta inte leda till upphörande av studien.

— Överlevnad för vardera kön ska beaktas för sig.

— Studien bör inte fortsätta över den punkt där tillgängliga data från studien inte längre är tillräckliga för att ge en statistisk giltig utvärdering.

OBSERVATIONER (KRONISK TOXICITETSFAS)

36. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er), och ta hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen när det gäller administrering via sondmatning.

37. Detaljerade kliniska observationer bör göras på samtliga djur minst en gång före den första exponeringen (för jämförelser inom samma objekt), i slutet av studiens första vecka och därefter varje månad. Observationsprotokollet bör anordnas så att variationerna mellan enskilda observatörer minimeras och är oberoende av testgrupp. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats, ungefär vid samma tidpunkter varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationer i observationsbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också registreras (32).

38. En oftalmologisk undersökning med ett oftalmoskop eller annan lämplig utrustning bör utföras på samtliga djur före den första administreringen av testkemikalien. Vid slutet av studien bör denna undersökning helst utföras på samtliga djur, men åtminstone på högdos- och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör samtliga djur undersökas. Om strukturell analys eller annan information tyder på okulär toxicitet bör frekvensen på okulära undersökningar höjas.

39. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstest med upprepad dosering indikerade en potential för att framkalla neurotoxiska effekter, bör sensorisk reaktion på stimuli av olika slag (32) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (33), (34), (35), bedömning av greppstyrka (36) och bedömning av motorisk aktivitet (37) eventuellt utföras före studiestarten och i 3-månadersperioder efter studiestarten till och med 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till också användas.

▼M4

40. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering indikerade en potential för att orsaka immunologiska effekter, kan ytterligare undersökningar av denna endpoint eventuellt utföras vid avslutningen.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

41. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologi och klinisk biokemi

42. I studier med gnagare bör hematologiska undersökningar utföras på samtliga djur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), vid 3, 6 och 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar (se punkt 19). För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på hematologiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Blodprover bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus.

43. Följande lista över parametrar bör undersökas (38): Total- och differentialräkning av vita blodkroppar, erytrocytantal, trombocytantal, hemoglobinkoncentration, hematokrit (packad cellvolym), medelvärde för korpuskulärvolym (MCV), medelvärde för korpuskulärt hemoglobin (MCH), medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid och aktiverad partiell tromboplastintid. Övriga hematologiska parametrar såsom Heinz-kroppar eller annan atypisk erytrocytmorfologi eller methemoglobin kan mätas på lämpligt sätt beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget bör en flexibel strategi antas, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie. Om testkemikalien har en effekt på det hematopoetiska systemet, kan retikulocytantal och benmärgscytologi också anges, men detta behöver inte utföras rutinmässigt.

44. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader och, särskilt, effekter på lever och njurar bör utföras på blodprov från samtliga försöksdjur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), vid samma tidsintervaller som specificerades för de hematologiska undersökningarna. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga kliniska biokemiska bestämningar. För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på kliniska biokemiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med

▼M4

jämförbara dosnivåer. Det rekommenderas att djuren fastar över natten (med undantag av möss) före blodprovstagningen ([1]). Följande lista över parametrar bör undersökas (38): Glukos, urea (ureakväve), kreatinin, totalprotein, albumin, kalcium, natrium, kalium, totalkolesterol, minst två lämpliga tester för hepatocellular utvärdering (alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, glutamatdehydrogenas, totala gallsyror) (39), och minst två lämpliga tester för hepatobiliär utvärdering (alkaliskt fosfatas, gammaglutamyl transferas, 5'-nukleotidas, totalt bilirubin, totala gallsyror) (39). Andra kliniska kemiska parametrar såsom triglycerider vid fasta, specifika hormoner och kolinesteras kan mätas på lämpligt sätt, beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget finns det ett behov av en flexibel strategi, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie.

45. Urinanalyserna bör utföras på samtliga försöksdjur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), på prov som tagits vid samma intervaller som för hematologi och klinisk kemi. Mätningar vid 3 månader behöver inte utföras om ingen effekt syntes på urinanalysen i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Följande lista över parametrar ingick i en sakkunnig rekommendation om kliniska patologiska studier (38): Utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, totalprotein och glukos. Andra bestämningar inkluderar keton, urobilinogen, bilirubin och ockult blödning. Ytterligare parametrar kan användas vid behov för att utvidga undersökningen av observerad(e) verkning(ar).

46. Det anses allmänt att utgångsvärden för hematologiska och kliniska kemiska variabler behöver bestämmas före behandlingen i hundstudier, men inte behöver bestämmas för studier i gnagare (38). Om historiska basdata (se punkt 58) är otillräckliga bör man överväga att generera sådana data.

PATOLOGI

Obduktion

47. Samtliga djur i studien bör normalt underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla samt deras innehåll. En bestämmelse kan också göras (i avlivnings- eller satellitgrupperna) så att mätningarna begränsas till vissa viktiga åtgärder, såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet (se punkt 21). Dessa djur behöver inte obduceras och efterföljande procedurer beskrivs i nedanstående punkter. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur, efter beslut av försöksledaren.

([1]) För ett antal mätningar i serum och plasma, särskilt glukos, är det önskvärt med fasta över natten. Den största orsaken till detta är att den ökade variationen som oundvikligen resulterar från icke-fastande, tenderar att maskera mer subtila effekter och göra tolkningen svår. Dock bör det noteras att fastande över natten kan påverka djurens allmänna metabolism, särskilt beträffande utfodringsstudier, och kan störa den dagliga exponeringen av testkemikalien. Samtliga djur bör bedömas i samma fysiologiska tillstånd och därför bör detaljerade eller neurologiska bedömningar planeras för annan dag än den kliniska biokemiska provtagningen.

▼M4

48. Organvikter bör samlas från samtliga djur, förutom de som undantas genom den senare delen av punkt 47. Binjurar, hjärna, bitestiklar, hjärta, njurar, lever, äggstockar, mjälte, testiklar, sköldkörtel (vägda efter fixering, med bisköldkörtlar) och livmoder från samtliga djur (bortsett från de döende och/eller avlivade) putsas från angränsande vävnad, i förekommande fall, och deras våtvikt bestäms så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning.

49. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (40) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

▼M4

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör listan på organ som anges för oralt intag undersökas, och det är nödvändigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

50. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (40). Den minsta histopatologiska undersökningen bör vara:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter.

— Målvävnader, eller vävnader som uppvisade behandlingsrelaterade förändringar i högdosgruppen, från samtliga djur i alla andra doseringsgrupper,

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

OBSERVATIONER (KARCINOGENICITETSFAS)

51. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Djuren bör dessutom kontrolleras en gång per dag för särskilda tecken med toxikologisk relevans. När det gäller sondmatningsstudier bör djuren kontrolleras under perioden omedelbart efter dosering. Särskild uppmärksamhet bör ges åt tumörutveckling och tidpunkten för tumörens uppkomst, plats, mått, utseende, och utvecklingen av varje tydlig eller kännbar tumör ska registreras.

52. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och foderеffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

▼M4

Hematologiska, kliniska biokemiska och andra mätningar

53. För att maximera informationen som erhållits från studien, särskilt överväganden gällande verkningssätt, kan blodprover tas för hematologi och klinisk biokemi, även om detta avgörs av försöksledaren. Urinanalys kan även vara lämplig. Data om djuren som används i studiens kroniska toxicitetsfas, vanligtvis efter en 12-månaders varaktighet (punkt 34) ger information om dessa parametrar. Ytterligare vägledning om värdet med att ta sådana prov som en del av en karcinogenicitetsstudie finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Om blodprov tas så bör dessa samlas i slutet av testperioden, strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet. De bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus. Blodutstryk kan också beredas för undersökning, särskilt om benmärgen verkar vara målorganet, även om värdet av en sådan undersökning av blodutstryk i karcinogenicitetsfasen för bestämning av karcinogen/onkogen potential har ifrågasatts (38).

PATOLOGI

Obduktion

54. Samtliga djur i studien med undantag av kontrolldjur och andra satellitgrupper (se punkt 20), ska underkastas en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla samt deras innehåll. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur och andra satellitdjur efter beslut av försöksledaren. Organvikter är normalt inte en del av en karcinogen studie, eftersom geriatriska förändringar och, i senare skeden, utvecklingen av tumörer förvirrar användbarheten av organviktsdatan. De kan dock vara avgörande för att göra en sammanvägd bedömning, och särskilt för överväganden beträffande verkningssätt. Om de är en del av en satellitstudie bör de inte samlas in senare än ett år efter studiens inledning.

55. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (40) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa

▼M4

tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska också konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör listan på organ som anges för oralt intag undersökas, och det är nödvändigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

56. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (40). De vävnader som minst ska undersökas är:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter, inklusive tumörer.

— När behandlingsrelaterade histopatologiska förändringar observeras i högdosgruppen, ska samma vävnader från samtliga djur i alla andra dosgrupper undersökas,

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING (KARCINOGENICITET OCH KRONISK TOXICITET)

Data

57. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

58. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.

59. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid utformningen av studien bör de statistiska metoderna och datan som ska analyseras väljas (punkt 9). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

60. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

— Kemikaliens källa.

— Satsnummer.

— Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön vid testets början.

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

▼M4

Försöksbetingelser:

— Grund för administreringssätt och dosval.

— I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning.

— Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.

— Administreringssätt och uppgifter om testkemikaliens administrering.

— Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.

— Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras):

Allmänt

— Överlevnadsdata.

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.

— Toxikokinetiska data, i förekommande fall.

— Oftalmoskopi (om tillgängligt).

— Hematologi (om tillgängligt).

— Klinisk kemi (om tillgängligt).

Kliniska fynd

— Tecken på toxicitet.

— Förekomst (och allvarlighetsgrad) av eventuell abnormitet.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är övergående eller permanenta).

Obduktionsdata

— Terminal kroppsvikt.

— Organvikter och deras förhållanden, om tillämpligt.

— Obduktionsfynd, abnormaliteternas förekomst och allvarlighetsgrad.

Histopatologi

— Icke-neoplastiska histopatologiska fynd.

— Neoplastiska histopatologiska fynd.

▼M4

— Sambandet mellan grova och mikroskopiska fynd.

— Detaljerad beskrivning av alla behandlingsrelaterade histopatologiska fynd, inklusive allvarlighetsgradering.

— Rapport över eventuell inbördes granskning av bilder.

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

— Diskussion om eventuella modellstrategier.

— Dos:responsförhållanden.

— Historiska kontrolldata.

— Beaktande av eventuell information om verkningssätt.

— BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.

— Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 14–191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

(6) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90 dagars upprepat oraltest på icke-gnagare).

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, tillgänglig på OECD:s offentliga webbplats för vägledningar för tester på www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.

(10) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.

(11) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).

▼M4

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9–35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37–68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69–98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279–284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196–1203.

▼M4

(27) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål, EUT L 276, 20.10.2010, s. 33–79.

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15–23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198–201.

(39) EMEA (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼B

B.34 **REPRODUKTIONSTOXICITETSTEST PÅ EN GENERATION**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet tillförs i graderade doser till flera grupper av handjur och hondjur. Handjuren bör tillföras ämnet under tillväxtperioden och under minst en fullständig spermiebildande cykel (ca 56 dagar för mus och 70 dagar för råtta) för att framkalla eventuella hälsomässiga oönskade verkningar som testämnet kan ha på spermatogenes.

Hondjur i föräldra(F_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 ska djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Det rekommenderas att testämnet tillförs via fodret eller dricksvattnet. Andra tillförselvägar är också godtagbara Samma tillförselmetod ska användas för alla djur under hela behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen ska det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska verkningar. Djuren bör tillföras testämnet sju dagar i veckan.

▼B

Försöksdjur

Val av djurart

I första hand ska råttor och möss användas. Unga friska djur, som inte tidigare har använts i försök, ska användas. Stammar med låg fertilitet bör inte användas. Försöksdjuren bör vara representativa för sin art, stam, kön, vikt och/eller ålder.

För att korrekt kunna bedöma fertiliteten ska både han- och hondjur testas. Alla försöks- och kontrolldjur ska vara avvanda innan dosering inleds.

Antal och kön

Varje behandlings- och kontrollgrupp ska bestå av ett tillräckligt högt antal djur för att resultera i omkring 20 dräktiga hondjur som är nära eller vid födslotidpunkten.

Syftet med detta är att säkerställa att det föds tillräckligt många ungar för att säkerställa en meningsfull utvärdering av hur testämnet kan påverka fertiliteten, dräktigheten och moderdjurens beteende i F_0-generationen samt diandet, tillväxten och utvecklingen i F_1-generationen från nedkomsten till avvänjning.

Försöksbetingelser

Foder och vatten ges ad libitum. När födslotidpunkten närmar sig placeras de dräktiga hondjuren i var sin födslo- eller dräktighetsbur och djuren kan eventuellt förses med material för att bygga bo.

Dosnivåer

Minst tre olika dosnivågrupper samt en kontrollgrupp ska användas. Om vehikel används för tillförsel av testämnet ska kontrollgruppen tillföras samma mängd vehikel som högdosgruppen. Om ett testämne leder till ett minskat foderintag eller påverkar absorption eller metabolism kan det vara nödvändigt att använda en motsvarande restriktivt utfodrad kontrollgrupp. Såvida det inte finns några begränsningar till följd av testämnets fysikaliska-kemiska eller biologiska egenskaper bör den högsta dosen idealt förorsaka toxiska verkningar, men inte dödsfall i föräldra(F_0)-generationen. Medeldosnivåerna (eventuellt flera) bör framkalla minsta möjliga observerbara toxiska verkningar som orsaktas av testämnet, och den lägsta dosen bör inte ha någon toxisk effekt på föräldragenerationen eller avkomman. Om ämnet tillförs via magsond eller i kapsel bör den dos som varje enskilt djur mottar beräknas på grundval av djurets kroppsvikt och varje vecka justeras med hänsyn till förändringar i kroppsvikt. Doser som tillförs dräktiga hondjur kan beräknas efter kroppsvikt vid dag 0 eller 6 av dräktigheten, om så önskas.

Gränstest

Om ett testämne med låg toxicitet i en dosnivå på 1 000 mg/kg kroppsvikt inte har någon påverkan på reproduktionen kan ytterligare tester anses vara överflödiga. Om en inledande undersökning, i vilken endast den högsta dosen används, klart visar på toxisk verkan på moderdjuren, men inte har någon skadlig verkan på fertiliteten, kan ytterligare tester anses vara överflödiga.

▼B

Förfarande

Försöksschema

Daglig dosering av föräldra(F_0)-generationen inleds när djuren är mellan fem och nio veckor gamla, och efter det att de är avvanda och har acklimatiserat sig i minst fem dagar. Om råttor används fortsätter doseringen i tio veckor före parningsperioden (för möss åtta veckor). Handjuren bör avlivas och undersökas antingen vid slutet av parningsperioden eller så kan man fortsätta att tillföra dem testämnet fram till en eventuell produktion av en andra kull, varefter de avlivas och undersöks någongång före försökets avslutning. Dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur inleds efter minst fem dagars acklimatisering och fortsätter under minst två veckor före parning. Daglig dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur fortsätter under den tre veckor långa parningsperioden, under dräktighetsperioden och fram till det att F_1-generationen är avvand. Man bör överväga eventuella justeringar av försöksschemat om det föreligger uppgifter om testämnet, t.ex. induktion av metabolism eller bioackumulering.

Parning

Parning kan utföras i förhållandet 1:1 (ett handjur till ett hondjur) eller 1:2 (ett handjur till två hondjur) i undersökningar av reproduktionstoxicitet.

Om parning i förhållandet 1:1 används förs ett handdjur och ett hondjur samman tills dräktighet inträffar eller tre veckor har förflutit. Varje morgon ska hondjuren undersökas för närvaron av spermier eller vaginalproppar. Som dag 0 i dräktighetsperioden räknas den dag då man observerar en vaginalpropp eller sperma.

De par som inte parar sig bör undersökas för att fastställa orsaken till den påtagliga ofruktsamheten.

Detta kan göras genom att djuren t.ex. får möjlighet att para sig med han- eller hondjur vars fruk-barhet är fastställd, genom mikroskopisk undersökning av reproduktionsorganen och genom undersökning av brunstighetsperioden eller speratogenes.

Kull storlekar

De djur som doseras i fertilitetsundersökningen bör ha möjlighet att föda normalt och att behålla sin avkomma tills den är avvand utan standardisering av kullar.

Om kullar standardiseras föreslås följande förfarande: Mellan dag 1 och 4 efter födseln standardiseras varje kull genom att extra ungar avlägsnas så att varje kull så långt det är möjligt består av fyra handjur och fyra hondjur.

Om det på grund av antalet han- och hondjur inte är möjligt att standardisera varje kulle att de innehåller fyra handjur och fyra hondjur kan en delvis standardisering godkännas (t.ex. fem handjur och tre hondjur). Ingen standardisering ska ske på kullar som består av mindre än åtta ungar.

▼B

Observationer

Djuren ska inspekteras minst en gång om dagen under hela försöket. Relevanta beteendeförändringar, tecken på svårartad eller förlängd födsel och alla toxicitetstecken, inbegripet dödlighet, ska registreras. Före och under parningstiden registreras foderintaget en gång i veckan. Efter födseln och under diperioden ska foderintaget (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) mätas varje vecka. Han- och hondjur av F_0-generationen vägs den dag då doseringen inleds och därefter en gång i veckan. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje enskilt djur.

Dräktighetsperioden beräknas från dag 0. Varje kull undersöks så snart som möjligt efter födseln för att fastställa ungarnas antal och kön, antal dödfödda och levande ungar och förekomsten av makroskopiskt synliga abnormiteter.

Döda ungar och ungar som avlivas dag 4 ska bevaras och undersökas för eventuella defekter. Levande ungar ska räknas och kullen vägas morgonen efter födseln, på dag 4 och dag 7 och därefter en gång i veckan tills försöket avslutats då djuren ska vägas individuellt.

Fysiska eller beteendemässiga abnormiteter som observeras i hondjuret eller avkomman ska registreras.

Patologisk undersökning

Makroskopisk undersökning

F_0-generationsdjur som avlivas efter eller dör under försöket ska undersökas makroskopiskt för strukturella abnormiteter eller patologiska förändringar, med särskilt uppmärksamhet riktad mot organen i reproduktionssystemet. Döda eller döende ungar ska undersökas för defekter.

Histopatologisk undersökning

Äggstockar, livmoder, livmoderhals, slida, testiklar, bitestiklar, sädesblåsa, prostata, koagulerings-körtlar, hypofys och målorgan (eventuellt flera) från alla djur i F_0-generationen ska bevaras för mikroskopisk undersökning. Om dessa organ inte har undersökts i andra försök med multipel dosering ska organen från djuren i högdos- och kontrollgrupperna, samt de djur som dör under försöket, undersökas mikroskopiskt om detta är praktiskt möjligt.

De organ från dessa djur som uppvisar abnormiteter ska även undersökas hos alla andra djur i F_0-generationen. I dessa fall ska alla vävnader som uppvisar makroskopiska patologiska förändringar undersökas mikroskopiskt. Liksom det föreslås i parningsavsnittet kan även reproduktionsorganen från djur som antas vara ofruktsamma undersökas mikroskopiskt.

▼B

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje grupp anges antal djur i början av försöket, antal fertila handjur, antal dräktiga hondjur, slag av förändring och den procent djur som upvisar varje slag av förändring.

Utvärderingen av resultaten ska om möjligt grundas på en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och avkommans livsduglighet.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket eller tidpunkt för planenlig avlivning.

— Tabell med angivelse av vikten för varje enskild kulle, ungarnas genomsnittsvikt och varje enskild unges vikt vid försökets avslutning.

— Toxiska och andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt.

— Tidpunkten för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt för F_0-generationen.

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla mikroskopiska rön.

— Eventuell satistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.35 TEST AVSEENDE REPRODUKTIONSTOXICITET PÅ TVÅ GENERATIONER

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 416 (2001).

1.1 INLEDNING

Denna metod för test avseende reproduktionstoxicitet på två generationer har som syfte att ge allmän information om ett testämnes verkningar på integriteten och prestanda hos hondjurs och handjurs reproduktionssystem, inklusive körtelfunktion, brunstighetscykel, parningsbeteende, befruktning, dräktighet, födsel, diperiod och avvänjning samt avkommans tillväxt och utveckling. Testet kan också ge information om testämnets verkningar på neonatal morbiditet och mortalitet, preliminära data om prenatal och postnatal utvecklingstoxicitet samt vägledning för senare test. Utöver undersökning av tillväxt och utveckling hos F1-generationen är testmetoden också avsedd för bedömning av integritet och prestanda hos hondjurs och handjurs reproduktionssystem samt F2-generationens tillväxt och utveckling. För att erhålla ytterligare information om utvecklingstoxicitet och funktionsstörningar kan segment med tilläggstest införlivas i detta protokoll, där metoderna för utvecklingstoxicitet eller utvecklingsneurotoxicitet används. Alternativt kan dessa endpoints undersökas i separata test där lämpliga testmetoder används.

1.2 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs i graderade doser till flera grupper av handjur och hondjur. Handjur i P-generationen bör tillföras ämnet under tillväxtperioden och under minst en fullständig spermiebildande cykel (cirka 56 dagar för mus och 70 dagar för råtta) för att framkalla eventuella skadliga verkningar på spermatogenesen. Verkningarna på sperman bestäms genom ett antal spermaparametrar (t.ex. spermans morfologi och motilitet), genom undersökning av vävnadspreparat och genom detaljerad histopatologi. Om data om spermatogenesen finns att tillgå från tidigare tillräckligt långa test med upprepad dos, t.ex. ett 90-dagars test, behöver P-generationens handjur inte inkluderas i utvärderingen. Det rekommenderas dock att prover eller digitala registreringar av P-generationens sperma bevaras, så att senare utvärderingar vid behov kan göras. P-gene-rationens hondjur bör ges doser under tillväxten och under flera fullständiga brunstighetscykler för att framkalla eventuella skadliga verkningar av testämnet på brunstighetscykelns normalitet. Testämnet tillförs föräldradjuren (P) under parningsperioden, under dräktighetsperioden och under F1-avkommans hela avvänjningsperiod. Efter avvänjningen tillförs testämnet fortsättningsvis till F1-avkomman under tillväxtperioden och under perioden för parning och produktion av en F2-generation, fram till det att F2-generatio-nen är avvand.

Kliniska observationer och patologiska undersökningar görs på alla djur med avseende på toxicitetstecken, med särskild tonvikt på verkningarna på integriteten och prestanda hos hondjurens och handjurens reproduktionssystem och på avkommans tillväxt och utveckling.

▼B

1.3 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.3.1 **Val av djurart**

Rekommenderat testdjur är råtta. Om andra arter används bör detta motiveras och testmetoden måste modifieras på tillbörligt sätt. Stammar med låg fertilitet eller välkänd hög incidens av utvecklingsdefekter ska inte användas. Vid testets början bör variationen i vikt mellan djuren vara minimal och får inte överstiga 20 % av vardera könets medelvikt.

1.3.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3°). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belys-ningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet att säkerställa att en lämplig blandning med testämnet fås, om man har valt denna tillförselmetod.

Djuren kan inhysas individuellt eller i burar med små grupper av samma kön. För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Efter tecken på kopulation flyttas de parade hondjuren till var sin födslo- eller maternitetsbur. Parade råttor kan också hållas i små grupper och separeras en eller två dagar före födseln. När tidpunkten för födsel närmar sig ska de parade djuren ges lämpliga och definierade material för beredning av ett bo.

1.3.3 **Förberedelse av djuren**

För testet används unga friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön under minst fem dagar och som inte har använts för tidigare test. Testdjuren karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Alla syskonförhållanden mellan djuren bör vara kända så att parning mellan sådana djur kan undvikas. Djuren fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper (stratifiering enligt kroppsvikt rekommenderas). Burarna placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen mini-meras. Varje djur förses med ett unikt identifieringsnummer. För P-generationen bör detta göras innan tillförseln av testämnet inleds. För F1-generationen bör detta göras efter avvänjningen av de djur som har valts för parning. För alla utvalda F1-djur bör uppgifter registreras om vilken kull de härstammar från. Dessutom rekommenderas att ungarna identifieras individuellt så snart som möjligt efter födseln, i fall där individuell vägning av ungar eller funktionstest övervägs.

Föräldradjuren (P) bör vara 5–9 veckor gamla när tillförseln av testämnet inleds. Djuren i alla testgrupper bör vara så lika som möjligt med avseende på vikt och ålder.

▼B

1.4 FÖRFARANDE

1.4.1 **Djurens antal och kön**

Varje behandlings- och kontrollgrupp ska bestå av så många djur att det nära eller vid tidpunkten för födseln helst finns minst 20 dräktiga hondjur. I fråga om ämnen som förorsakar oönskade behandlingsrelaterade verkningar (t.ex. sterilitet, övertoxicitet vid den höga dosen) är detta kanske inte möjligt. Syftet är att få ett tillräckligt antal dräktigheter för att säkerställa en meningsfull utvärdering av testämnets potential att påverka fertiliteten, dräktigheten och moderdjurens beteende samt diandet, tillväxten och utvecklingen hos F1-avkomman från befruktning till mognad och utvecklingen av dennas avkomma (F2) till avvänjning. Om det önskade antalet dräktiga djur (dvs. 20) inte erhålls, behöver testet således inte nödvändigtvis förkastas, utan detta bör bedömas från fall till fall.

1.4.2 **Förberedelse av doserna**

Det rekommenderas att testämnet tillförs oralt (med fodret, dricksvattnet eller genom sondmatning), utom om någon annan tillförselväg (t.ex. via huden eller genom inandning) bedöms vara lämpligare.

Vid behov kan testämnet upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuellt andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet i vehikeln bör fastställas.

1.4.3 **Dosering**

Minst tre dosnivåer och en parallell kontrollgrupp bör användas. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar men inte dödsfall eller allvarligt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar. I fall av oväntad mortalitet kan testet i regel ändå godkännas, så länge som mortalitetsgraden är lägre än cirka 10 procent hos föräldradjuren (P). Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att dosrelaterade verkningar kan påvisas. En nivå bör väljas så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) uppstår. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. en faktor som överstiger cirka 10). För utfodringstest bör dosintervallet inte vara mer en trefaldigt. Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till kända toxicitetsdata, särskilt resultat från test med upprepad dos. Likaså bör hänsyn tas till känd information om metabolism och kinetik för testämnet eller närbesläktade material. Denna information är också till hjälp när det gäller att demonstrera lämpligheten hos dossystemet.

▼B

Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om vehikel används för tillförsel av testämnet. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen få vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs med fodret och detta leder till minskat foderintag eller minskad foderanvändning, kan det vara nödvändigt med en parallellt utfodrad kontrollgrupp. Alternativt kan man i stället för en sådan kontrollgrupp använda data från kontrollerade test för utvärdering av hur ett minskat foderintag påverkar reproduktionsparametrarna.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatsämnen bör i tillämplig mån beaktas: Verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet, verkningarna på testämnets kemiska egenskaper till den del dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på testdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.4.4 **Gränstest (Limit-test)**

Om ett oralt test med en dosnivå om minst 1 000 mg/kg kroppsvikt per dag (eller, om testämnet tillförs med foder eller dricksvatten, en motsvarande procenthalt i foder eller dricksvatten med användning av de förfaranden som beskrivs för detta test) inte leder till några observerbara toxiska verkningar varken hos för-äldradjuren eller deras avkomma, och om toxicitet inte kan förväntas på grundval av data från strukturellt eller metaboliskt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med flera dosnivåer bedömas vara överflödigt. Detta gränstestkriterium är tillämpligt förutom i fall där sannolik exponering på människor indikerar att en högre oral dosnivå behövs. För andra former av tillförsel, såsom inandning eller applicering på huden, kan testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper, såsom löslighet, ofta indikera och begränsa den maximala exponeringsnivån.

1.4.5 **Tillförsel av doser**

Djuren ska ges doser av testämnet alla dagar i veckan. Tillförsel på oral väg (foder, dricksvatten eller sond-matning) rekommenderas. Om någon annan tillförselväg används måste detta motiveras och tillbörliga justeringar kan vara nödvändiga. Samma tillförselmetod ska användas för alla djur under den valda testperioden. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör magsond användas. Den volym vätska som tillförs på en och samma gång får inte överskrida 1 ml per l00 g kroppsvikt (0,4 ml per 100 g kroppsvikt om majsolja används), utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer. Om tillförsel genom sondmatning används får ungarna normalt testämnet endast indirekt genom mjölken, tills direkt tillförsel inleds efter avvänjningen. Om tillförsel via foder eller vatten används kommer ungarna dessutom att få testämnet direkt så snart de börjar äta själva under den sista veckan av diperioden.

▼B

För ämnen som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i mängder som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. Testämne som tillförs via fodret kan ges som en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet ska anges. Testämne som tillförs genom sondmatning bör ges vid samma tid varje dag, och justeras minst varje vecka så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Informationen om placentadistribution bör beaktas när sondmatade doser justeras enligt vikten.

1.4.6 **Testschema**

Daglig dosering av föräldragenerationen (P) inleds när djuren är mellan fem och nio veckor gamla. Daglig dosering av F1-generationens han- och hondjur inleds efter avvänjningen. Om testämnet tillförs med fodret eller dricksvattnet bör hänsyn tas till att F1-ungarna redan under diperioden kan utsättas för direkt exponering av testämnet. Tillförseln ska fortsätta för båda könen (P och F1) under minst 10 veckor före parningsperioden. Tillförseln fortsätts för båda könen under den två veckor långa parningsperioden. Handjuren avlivas humant och undersöks när de inte längre behövs för bedömningen av reproduktionstoxiska verkningar. Tillförseln till föräldragenerationens (P) hondjur fortsätts under hela dräktigheten och fram till det att F1-avkomman har avvants. Eventuella justeringar av testschemat bör övervägas om känd information om testämnet indikerar detta, t.ex. toxicitetsdata, induktion av metabolism eller bioackumulering. Dosen till varje djur bör i regel basera sig på den senaste bestämningen av djurets kroppsvikt. Försiktighet bör dock iakttas när dosen justeras under dräktighetens sista tredjedel.

Behandlingen av P- och F1-generationens handjur och hondjur fortsätts fram till det att testet avslutas. Alla P- och F1-generationens handjur och hondjur avlivas humant när de inte längre behövs för bedömningen av reproduktionstoxiska verkningar. F1-avkomma som inte väljs ut för parning och all F2-avkomma avlivas humant efter avvänjningen.

1.4.7 **Parning**

1.4.7.1 *Parning i föräldragenerationen (P)*

För parningen sammanförs ett hondjur med ett ensamt handjur från samma dosnivå (parning i förhållandet 1:1) tills kopulation inträffar eller 2 veckor har gått. Hondjuren undersöks varje dag för närvaron av sperma eller vaginalproppar. Som dräktighetens dag 0 räknas den dag då en vaginalpropp eller sperma observeras. Om parningen inte lyckas kan man överväga ett nytt parningsförsök där hondjuret sammanförs med ett handjur med fastställd fertilitet från samma grupp. De djur som har parat sig bör identifieras entydigt i testets data. Parning av syskon bör undvikas.

▼B

1.4.7.2 *F1-parning*

För parning av F1-avkomman väljs minst ett handjur och ett hondjur från varje kull efter avvänjningen, vilka korsas med ungar ur en annan kull på samma dosnivå. På detta sätt produceras F2-generationen. Ungarna väljs ut slumpmässigt ur varje kull i fall där inga signifikanta skillnader kan observeras rörande kroppsvikt eller utseende mellan ungarna i en kull. Om skillnader kan observeras bör de djur som bäst representerar kullen väljas ut. I praktiken görs detta bäst på grundval av kroppsvikt, även om det i vissa fall kan vara lämpligare att använda utseendet som grund. F1-avkomman ska inte paras förrän den har nått fullständig sexuell mognad.

Par utan avkomma ska undersökas i syfte att fastställa uppenbara orsaker till infertiliteten. Detta kan göras t.ex. genom att djuren får möjlighet att para sig med han- eller hondjur vars fertilitet är fastställd, genom mikroskopisk undersökning av reproduktionsorganen eller genom undersökning av brunstighetspe-rioden eller spermatogenesen.

1.4.7.3 *Andra parningen*

I vissa fall, t.ex. vid behandlingsrelaterade förändringar i kullstorlek eller om entydig effekt av den första parningen inte kan observeras, rekommenderas att vuxna P- eller F1-djur får para sig på nytt för att producera en ny kull. För denna andra parning rekommenderas korsning av djur som inte har producerat någon kull, med hondjur och handjur vars fertilitet är fastställd. Om en ny kull bedöms vara nödvändig i någondera generationen, bör den andra parningen ske cirka en vecka efter det att föregående kull har avvants.

1.4.7.4 *Kullstorlek*

Djuren får föda normalt och hålla sin avkomma tills den är avvand. Standardisering av kullarna är inte obligatorisk. Om standardisering görs, bör den metod som används beskrivas i detalj.

1.5 OBSERVATIONER

1.5.1 **Kliniska observationer**

En allmän klinisk observation bör göras varje dag. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör observationstidpunkten väljas med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter tillförseln. Avvikande beteende, tecken på svår eller förlängd födsel och alla tecken på toxicitet bör registreras. Dessutom bör alla djur inspekteras närmare minst en gång per vecka, lämpligen i samband med vägningen. Två gånger per dag (under veckosluten en gång per dag, om lämpligt) bör alla djur inspekteras för morbiditet och mortalitet.

▼B

1.5.2 **Föräldradjurens kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion**

Föräldradjuren (P och Fl) ska vägas på den första doseringsdagen och därefter minst varje vecka. Föräldragenerationernas hondjur (P och F1) ska vägas minst på dräktighetsdagarna 0, 7, 14 och 20 eller 21, under diperioden på samma dagar då kullarna vägs och slutligen på den dag då djuren avlivas. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje vuxet djur. Före parningen och under diperioden ska foderkonsumtionen mätas minst varje vecka. Vattenkonsumtionen ska mäta minst varje vecka om testämnet tillförs med vattnet.

1.5.3 **Brunstighetscykel**

Brunstighetscykelns längd och normalitet utvärderas hos P- och F1-hondjuren genom vaginala smear-test före parningen och eventuellt under parningsperioden fram till det att tecken på parning kan observeras. Tagningen av vaginala eller cervikala celler bör göras med försiktighet för att undvika störningar på slemhinnan och induktion av skendräktighet (1).

1.5.4 **Spermaparametrar**

Vid testets slut registreras för alla P- och F1-handjur vikten för testiklar och bitestiklar. Ett exemplar av varje organ bör bevaras för histopatologisk undersökning (se avsnitt 1.5.7, 1.5.8.1). Återstående testiklar och bitestiklar från en undergrupp med minst tio handjur från varje grupp av P- och F1-handjur används för räkning av homogeniseringsresistenta spermatider respektive cauda epididymala spermareserver. Från samma undergrupp av handdjur insamlas sperma från cauda epididymis eller vas deferens för utvärdering av spermans motilitet och morfologi. Om behandlingsrelaterade verkningar observeras eller om resultaten från andra test tyder på verkningar på spermatogenes, ska sperman utvärderas för alla handjur i varje dosgrupp. I annat fall kan räkningen begränsas till P- och F1-handjuren i kontroll- och högdosgruppen.

Totalantalet homogeniseringsresistenta testikulära spermatider och cauda epididymala spermier bör räknas (2)(3). Cauda-spermareserverna kan härledas från koncentrationen och volymen hos sperman i den suspension som används för de kvalitativa bedömningarna och från antalet spermier som räknats efter påföljande malning eller homogenisering av återstående cauda-vävnad. Räkningen bör utföras omedelbart efter avlivningen för den valda undergruppen av handjur från alla dosgrupper. Undantag till detta är om man gör video- eller digitalregistreringar eller om proverna djupfryses och analyseras senare. I sådana fall kan kontroll- och högdosgruppen analyseras först. Om inga behandlingsrelaterade verkningar (t.ex. på spermiernas antal, motilitet eller morfologi) kan observeras, behöver de övriga dosgrupperna inte analyseras. Om behandlingsrelaterade verkningar kan observeras i högdosgruppen bör även grupperna med lägre doser utvärderas.

▼B

Motiliteten hos epididymal sperma (eller ductus deferens-sperma) bör bedömas eller videofilmas omedelbart efter avlivningen. Sperman bör skördas på sådant sätt att skador minimeras. Utspädningen av sperman för motilitetsanalysen bör göras med användning av godtagbara metoder (4). Procentandelen progressivt motila spermier bestäms subjektivt eller objektivt. Om datorstödd motilitetsanalys används (5)(6)(7)(8)(9)(10) görs härledningen av den progressiva motiliteten på grundval av användardefinierade trösklar för genomsnittlig banhastighet och linearitetsindex. Om proverna videofilmas (11) eller om bilderna registreras på annat sätt vid obduktionen, kan den efterföljande analysen begränsas till P- och F1-handjuren i kontroll- och högdosgruppen. Undantag till detta är om behandlingsrelaterade verkningar kan observeras, i vilket fall även grupperna med lägre doser bör utvärderas. Om det inte förekommer video-eller digitalbildsregistrering måste alla prover i alla behandlingsgrupper analyseras vid obduktionen.

Ett spermaprov från epididymis (eller vas deferens) utvärderas morfologiskt. Spermierna (minst 200 per prov) bör undersökas i form av fixerade våta preparat (12) och klassificeras som normala eller abnormala. Exempel på morfologiska abnormaliteter hos spermier är fusion, isolerade huvuden och missformade huvuden eller svansar. Utvärderingen bör göras omedelbart efter avlivningen för den valda undergruppen av handjur från alla dosgrupper. Om det finns video- eller digitalregistreringar kan utvärderingen göras senare. Även cellproverna från smear-test kan, om de fixeras, avläsas senare. I sådana fall kan kontroll- och högdosgruppen analyseras först. Om inga behandlingsrelaterade verkningar (t.ex. på spermans morfologi) kan observeras behöver de övriga dosgrupperna inte analyseras. Om behandlingsrelaterade verkningar kan observeras i högdosgruppen bör även grupperna med lägre doser utvärderas.

Om någon av de ovan nämnda spermabedömningsparametrarna har undersökts tidigare som ett led i ett systematiskt toxicitetstest som varat minst 90 dagar, behöver bedömningen inte nödvändigtvis upprepas i tvågenerationstestet. Det rekommenderas dock att prover eller digitala registreringar av P-generationens sperma bevaras, så att en utvärdering vid behov kan göras senare.

1.5.5 **Avkomma**

Varje kull undersöks så snart som möjligt efter födseln (diperiodens dag 0) för att fastställa antalet ungar och deras kön, antalet dödfödda ungar, antalet levande ungar och förekomsten av betydande anomalier. Ungar som konstateras vara döda på dag 0 bör helst, om de är tillräckligt intakta, undersökas för eventuella defekter och dödsorsak, samt bevaras. De levande ungarna räknas och vägs individuellt efter födseln (diperiodens dag 0) eller på dag 1. Därefter vägs ungarna på de reguljära vägningsdagarna, t.ex. diperiodens dagar 4, 7, 14 och 21. Fysiska eller beteendemässiga abnormaliteter hos moderdjuren eller avkomman bör registreras.

▼B

Avkommans fysiska utveckling bör registreras, främst genom ökningen i kroppsvikt. Övriga fysiska parametrar (t.ex. öron- och ögonöppningar, tandsprickning, hårväxt) kan ge tilläggsinformation, men dessa data bör helst utvärderas i samband med data om sexuell mognad (t.ex. ålder och kroppsvikt när vagina öppnas eller när balanopreputial separation sker) (13). Funktionella undersökningar (t.ex. motorisk aktivitet, sensorisk funktion, reflex ontogeni) hos F1-avkomman före och/eller efter avvänjningen, särskilt faktorer som hör samman med den sexuella mognaden, rekommenderas om sådana undersökningar inte ingår i separata test. Åldern då vagina öppnas och preputial separation sker bör bestämmas för de avvanda F1-ungar som väljs ut för parning. Anogenitalt avstånd mäts på dag 0 efter födseln hos F2-ungar, om detta bedöms vara nödvändigt på grund av att F1-generationen har avvikelser rörande kvoten mellan könen eller tidpunkten för sexuell mognad.

De funktionella observationerna kan utelämnas för grupper som på annat sätt uppvisar tecken på skadliga verkningar (t.ex. betydande minskning av viktökningen). Om funktionella undersökningar görs, ska de inte omfatta de ungar som har valts ut för parning.

1.5.6 **Obduktion**

När testet avslutas eller om djur dör under testets gång, ska alla föräldradjur (P och F1), alla ungar med externa abnormaliteter eller kliniska tecken samt en slumpmässigt vald unge per kön och kull från både F1- och F2-generationen undersökas makroskopiskt för eventuella strukturella abnormaliteter eller patologiska avvikelser. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid reproduktionssystemets organ. Döende ungar som avlivas humant eller döda ungar bör, förutsatt att de är tillräckligt intakta, undersökas för eventuella defekter och dödsorsak, samt bevaras.

Livmodern hos alla förstfödande hondjur ska undersökas på ett sätt som inte stör den histopatologiska utvärderingen, för förekomsten av implantationer och deras antal.

1.5.7 **Organvikter**

Vid testets slut bestäms kroppsvikten och vikten hos följande organ för alla P- och F1-föräldradjur (pariga organ vägs individuellt):

— Livmoder, äggstockar.

— Testiklar, bitestiklar (totalt och cauda).

— Prostata.

— Sädesblåsa med koaguleringskörtlar och deras vätskor samt prostatan (som en enhet).

— Hjärna, lever, njurar, mjälte, hypofys, sköldkörtel och adrenalinkörtel samt kända målorgan.

Kroppsvikten vid testets slut bestäms för de F1- och F2-ungar som väljs ut för obduktion. Vikten bestäms även för följande organ från den slumpmässigt valda ungen per kön per kull (se avsnitt 1.5.6): hjärna, mjälte och bisköldkörtel.

▼B

Resultaten från obduktionen och vägningen av organ bör i tillämplig mån bedömas med hänsyn till observationer från andra test med upprepad dos.

1.5.8 **Histopatologi**

1.5.8.1 *Föräldradjur*

Följande organ och vävnader (eller representativa prover) från föräldradjuren (P och F1) ska fixeras och förvaras i ett lämpligt medium för histopatologisk undersökning:

— Vagina, livmoder med livmoderhals samt äggstockar (bevarade i adekvat fixervätska).

— En testikel (bevarad i Bouins fixervätska eller motsvarande), en bitestikel, sädesblåsa, prostata och koaguleringskörtel.

— Tidigare identifierade målorgan från alla P- och F1-djur som har valts ut för parning.

Fullständig histopatologi görs av de ovan uppräknade bevarade organen och vävnaderna för alla sådana P-och F1-djur i högdos- och kontrollgruppen som har valts ut för parning. Undersökning av äggstockarna hos P-djuren är inte obligatorisk. Organ som har behandlingsrelaterade avvikelser bör även undersökas i låg- och medeldosgrupperna som stöd för bestämningen av NOAEL. Dessutom bör histopatologisk undersökning göras på reproduktionsorganen från sådana djur i låg- och medeldosgruppen som misstänks för reducerad fertilitet, t.ex. djur som inte parade sig, inte befruktades, inte avlade, eller djur som inte födde frisk avkomma. Alla betydande skador såsom atrofi eller tumörer bör undersökas.

Detaljerad histopatologisk undersökning görs på testiklarna (t.ex. med användning av Bouins fixervätska, paraffininbäddning och transverssektioner av 4–5 μm tjocklek) för att identifiera behandlingsrelaterade verkningar såsom tillbakabildade spermatider, uteblivna germinalcellslager eller -typer, multinukleära jätteceller eller degraderingen av spermatogeniska celler in i lumen (14). Undersökning av den intakta bitesti-keln ska inbegripa caput, corpus och cauda, vilket kan åtföljas av en utvärdering av en longitudinell sektion. Bitestikeln utvärderas för leukocytinfiltration, förändringar i prevalensen av celltyper, avvikande celltyper och spermafagocytos. PAS och hematoxylinfärgning kan användas för undersökning av handjurens reproduktionsorgan.

Äggstockarna efter diperioden bör innehålla primordiala och växande folliklar samt de stora corpora lutea från diperioden. Den histopatologiska undersökningen bör detektera kvalitativ utarmning av den primordiala follikelpopulationen. En kvantitativ utvärdering av de primordiala folliklarna görs för F1-hondjuren. Antalet djur, valet av äggstockssektion och sektionens storlek bör vara statistiskt lämpliga för det utvärderingsförfarande som används. Utvärderingen bör inbegripa räkning av antalet primordiala folliklar, som kan kombineras med små växande folliklar, för jämförelse av äggstockarna hos behandlinggruppernas och kontrollgruppens djur (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2 *Avvanda ungar*

Grovt abnormala vävnader och målorgan från alla ungar med externa abnormaliteter eller kliniska tecken, samt från en slumpmässigt vald unge per kön och per kull i både F1- och F2-generationen (som inte valts ut för parning), ska fixeras och förvaras i ett lämpligt medium för histopatologisk undersökning. Fullständig histopatologisk karakterisering av bevarade vävnader bör göras, med särskild tonvikt på reproduktionssystemets organ.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data rapporteras individuellt för moderdjuren och deras avkomma och sammanställs i en tabell. Tabellen ska för varje testgrupp och varje generation visa antalet djur vid testets början, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av humana skäl, tidpunkten för alla dödsfall eller humana avlivningar, antalet fertila djur, antalet dräktiga hondjur, antalet djur som uppvisar tecken på toxicitet, en beskrivning av de toxicitetstecken som har observerats (tidpunkten då sådana först upptäcktes, de toxiska verkningarnas varaktighet och allvarlighetsgrad), typerna av observationer om föräldradjur och avkomma, typerna av histopatologiska avvikelser och alla relevanta data om kullarna.

De numeriska resultaten ska utvärderas med en lämplig och allmänt erkänd statistisk metod. Valet av statistiska metoder bör ingå som en del av testets utformning och bör motiveras. Statistiska dos-responsmodeller kan vara användbara för analysen av data. Rapporten ska innehålla tillräckligt med information om analysmetoden och det datorprogram som används, så att en oberoende granskare eller statistiker kan göra en ny utvärdering och rekonstruera analysen.

2.2 UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Resultaten från detta test för reproduktionstoxicitet på två generationer ska utvärderas med avseende på de observerade verkningarna, inbegripet resultaten från obduktion och mikroskopiska undersökningar. Utvärderingen ska omfatta förhållandet mellan, eller avsaknaden därav, mellan testämnesdosen och närvaron eller frånvaron, incidensen och allvarlighetsgraden för abnormaliteter, inbegripet grova skador, identifierade målorgan, verkningar på fertiliteten, kliniska abnormaliteter, verkningar på reproduktionsförmågan och kullen, avvikelser rörande kroppsvikt, verkningar på mortaliteten samt alla andra toxiska verkningar. Vid utvärdering av testresultaten bör hänsyn tas till testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper och de toxikokinetiska data som är kända.

Ett korrekt genomfört test för reproduktionstoxicitet bör inbegripa en tillfredsställande uppskattning av den nivå där inga verkningar observeras och ge en förståelse för de skadliga verkningarna på reproduktion, födsel och digivning, samt på den postnatala utvecklingen inklusive tillväxt och sexuell utveckling.

▼B

2.3 TOLKNING AV RESULTATEN

Ett test för reproduktionstoxicitet på två generationer ska ge information om verkningarna av upprepad exponering för ett ämne under alla faser av reproduktionscykeln. Testet ska särskilt ge information om reproduktionsparametrarna samt om avkommans utveckling, tillväxt, mognad och överlevnad. Testresultaten ska tolkas tillsammans med resultaten från test avseende subkronisk toxicitet, prenatal utvecklingstoxicitet och toxikokinetik samt andra kända testresultat. Resultaten från detta test kan användas för att bedöma behovet av ytterligare testning av en kemikalie. Extrapolering av testresultaten till att gälla för exponering på människor kan i viss utsträckning godtas. Resultaten kan bäst tillämpas på information om dosnivåer där inga verkningar kan observeras och information om tillåten exponering på människor (20)(21)(22)(23).

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Testämne:

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifieringsdata.

— Renhetsgrad.

Vehikel (i förekommande fall).

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Testdjur:

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsbetingelser, foder och dylikt.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

— Motivering för val av dosnivåer.

— Uppgifter om testämnets sammansättning och beredning av fodret, uppnådda halter.

— Blandningens stabilitet och homogenitet.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Omräkning av testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos (mg per kg kroppsvikt och dag), om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

▼B

Resultat:

— Foderkonsumtion och, i mån av tillgänglighet, vattenkonsumtion, fodereffektivitet (kroppsviktsökning per gram konsumerat foder) och testämneskonsumtionen för P- och F1-djuren, utom för perioden för sammanlevnad och för minst den sista tredjedelen av diperioden.

— Absorptionsdata, om sådana är kända.

— Uppgifter om kroppsvikt för de P- och F1-djur som har valts ut för parning.

— Kullens och ungarnas vikt.

— Kroppsvikt vid avlivningen samt absolut och relativ organvikt för föräldradjuren.

— Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (om de är reversibla eller inte).

— Tidpunkten (dag) för dödsfall under testets gång och huruvida djuren överlevde till testets slut.

— Uppgifter om toxisk respons per kön och dos, inbegripet index för parning, fertilitet, dräktighet, födsel, livsduglighet och digivning. Rapporten bör även innehålla de sifferuppgifter som har använts för beräkningen av dessa index.

— Toxiska eller andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt och dylikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Antalet P- och F1-hondjur med normal cykel och cykelns längd.

— Totalantalet spermier från cauda epididymis, procentandelen progressivt motila spermier, procen tandelen morfologiskt normala spermier och procentandelen spermier per varje identifierad abnormalitet.

— Tid till parning, inbegripet antalet dagar fram till dess att parning skett.

— Dräktighetsperiodens längd.

— Antalet implantationer, antalet corpora lutea och kullstorlek.

— Antalet levande födda och antalet förluster efter implantation.

— Antalet ungar med grova synliga abnormaliteter och, eventuellt, antalet onormalt små individer.

— Fysiska kännetecken hos ungarna och andra uppgifter om den postnatala utvecklingen. Motivering bör ges för valet av vilka kännetecken som utvärderas.

— Funktionsobservationer hos ungar och vuxna, om tillämpligt.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

▼B

Diskussion om resultaten.

Slutsatser, inbegripet värden för den lägsta nivå där inga verkningar kan observeras (NOAEL) hos moderdjur och avkomma.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Sadleir, R.M.F.S. (1979), ”Cycles and Seasons”, *Reproduction in Mammals,* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston och R.V. Short (red.), Cambridge, New York.

2. Gray, L.E. et al. (1989), ”A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat”, *Fundamental and Applied Toxicology,* 12:92–108.

3. Robb, G.W. et al. (1978), ”Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats”, *Journal of Reproduction and Fertility,* 54:103–107.

4. Klinefelter, G.R. et al. (1991), ”The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat”, *Reproductive Toxicology,* 5:39–44.

5. Seed, J. et al. (1996), ”Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report”, *Reproductive Toxicology,* 10(3):237–244.

6. Chapin, R.E. et al. (1992), ”Methods for Assessing Rat Sperm Motility”, *Reproductive Toxicology,* 6:267–273.

7. Klinefelter, G.R. et al. (1992), ”Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration”, *Journal of Andrology* 13:409–421.

8. Slott, V.L. et al. (1991), ”Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations”, *Reproductive Tox icology,* 5:449–458.

9. Slott, V.L. och Perreault, S.D. (1993), ”Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer”, *Methods in Toxicology, Part A.,* Academic, Orlando, Florida, 319–333.

10. Toth, G.P. et al. (1989), ”The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations”, *Journal of Andrology,* 10:401–415.

11. Working, P.K. och M. Hurtt (1987), ”Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility”, *Journal of Andrology,* 8:330–337.

12. Linder, R.E. et al. (1992), ”Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants”, *Reproductive Toxicology,* 6:491–505.

13. Korenbrot, C.C. et al. (1977), ”Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat”, *Biological Reproduction,* 17:298–303.

14. Russell, L.D. et al. (1990), ”Histological and Histopathological Evaluation of the Testis”, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15. Heindel, J.J. och R.E. Chapin, (red.) (1993), ”Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxico logy”, Academic, Orlando, Florida.

16. Heindel, J.J. et al. (1989), ”Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity, Growth Factors and the Ovary”, A.N. Hirshfield (red.), Plenum, New York, 421–426.

17. Manson, J.M. och Y.J. Kang, (1989), ”Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology”, *Principles and Methods of Toxicology,* A.W. Hayes (red.), Raven, New York.

▼B

18. Smith, B.J. et al. (1991), ”Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity”, *Reproductive Toxicology,* 5:379–383.

19. Heindel, J.J. (1999), ”Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment”, G. Daston och C.A. Kimmel, (red.), ILSI Press, Washington, DC.

20. Thomas, J. A. (1991), ”Toxic Responses of the Reproductive System”, *Casarett and Doull's Toxicology,* M.O. Amdur, J. Doull och C.D. Klaassen (red.), Pergamon, New York.

21. Zenick, H. och E.D. Clegg (1989), ”Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach”, *Principles and Methods of Toxicology,* A.W. Hayes (red.), Raven Press, New York.

22. Palmer, A.K. (1981), *Developmental Toxicology,* Kimmel, C.A. och J. Buelke-Sam (red.), Raven Press, New York.

23. Palmer, A.K. (1978), *Handbook of Teratology,* Vol. 4, J.G. Wilson och F.C Fraser (red.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36 **TOXIKOKINETIK**

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s TG 417 (2010). Studier som undersöker toxikokinetik (TK) i en testkemikalie utförs för att erhålla relevant information om dess absorption, distribution, biotransformering (dvs. metabolism) och exkretion, som hjälp för att relatera koncentration eller dos till den observerade toxiciteten, och för att underlätta förståelsen av dess toxicitetsmekanism. TK kan hjälpa till med att förstå de toxikologiska studierna genom att visa att försöksdjuren systematiskt exponeras för testkemikalien och genom att visa vilka som är de cirkulerande delarna (ursprunglig kemikal/metaboliter). Grundläggande TK-parametrar som bestämts genom dessa studier ger också information om risken för ackumulering av testkemikalien i vävnader och/eller organ och potentialen för framkallande av biotransformering som en följd av exponeringen av testkemikalien.

2. TK-data kan bidra till bedömningen av lämpligheten och relevansen av djurtoxicitetsdata för extrapolering av fara för människor och/eller riskbedömning. Dessutom kan toxikokinetiska studier ge användbar information för bestämning av dosnivåer för toxicitetsstudier (linjär kontra icke-linjär kinetik), administreringssättsverkningar, biotillgänglighet och frågor som rör studieutformning. Vissa typer av TK-data kan användas i fysiologiskt baserad toxikokinetisk (PBTK) modellutveckling.

3. Det finns viktiga användningsområden för metabolit/TK-data såsom föreslagen möjlig toxicitet och verkningssätt och deras relation till dosnivå och exponeringssätt. Dessutom kan metabolismdata ge användbar information för bedömning av den toxikologiska betydelsen av exponeringar till exogent frambringade metaboliter av testkemikalien.

4. Adekvat toxikokinetisk data är till hjälp för att stödja den fortsatta acceptansen och tillämpligheten av kvantitativa struktur-aktivitetssamband, jämförelse med strukturlika ämnen eller grupperingsstrategier i säkerhetsbedömningen av kemikalier. Kinetiska data kan också användas för att utvärdera den toxikologiska relevansen av andra studier (t.ex. in vivo/in vitro).

5. Om inget annat administreringssätt nämns (se särskilt punkterna 74–78) tillämpas denna testmetod på oral tillförsel av testkemikalien.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

6. Regelsystem har olika krav och behov vad gäller mätning av endpoints och parametrar relaterade till toxikokinetik för olika klasser av kemikalier (t.ex. bekämpningsmedel, biocider, industrikemikalier). Till skillnad från de flesta testmetoder beskriver denna testmetod toxikokinetisk testning, vilket omfattar ett flertal mätningar och endpoints. I framtiden kan flera nya testmetoder och/eller vägledningsdokument utvecklas för att beskriva varje endpoint enskilt och mer detaljerat. När det gäller denna testmetod, vars tester eller bedömningar specificeras av kraven och/eller behoven för varje regelsystem.

▼M4

7. Det finns många studier som kan utföras för att utvärdera TK-beteendet hos en testkemikalie för regulatoriska ändamål. Dock är, beroende på särskilda regulatoriska behov eller situationer, inte alla dessa möjliga studier nödvändiga för utvärderingen av en testkemikalie. Flexibilitet, med hänsyn till den undersökta testkemikaliens egenskaper, behövs vid utformningen av toxikokinetiska studier. I några fall kanske bara vissa frågor behöver utforskas för att ta itu med de testkemikalierelaterade faro- och riskfrågorna. I några sammanhang kan TK-data samlas som en del av utvärderingen i andra toxikologiska studier. I andra sammanhang kan ytterligare och/eller mer omfattande TK-studier vara nödvändiga beroende på behovet av regler och/eller om nya frågor uppstår som en del av testkemikaliens utvärdering.

8. All tillgänglig information om testkemikalien och relevanta metaboliter och analoger bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiekvaliteten och undvika onödig djuranvändning. Detta kan omfatta data från andra relevanta testmetoder (in vivo-studier, in vitro-studier, och/eller in silico-utvärderingar). Fysikalisk-kemiska egenskaper, såsom en kemikalies fördelningskoefficient i oktanol-vatten (uttryckt som log P_{OW}), pKa, vattenlöslighet, ångtryck och molekylvikt kan vara användbara för planering av en studie och tolkning av resultat. De kan fastställas med lämpliga metoder som beskrivs i de relevanta testmetoderna.

BEGRÄNSNINGAR

9. Denna testmetod är inte utformad för att hantera särskilda omständigheter, såsom dräktigt eller diande djur och avkomma, eller för att utvärdera potentiella resthalter i exponerade livsmedelproducerande djur. Däremot kan datan som erhålls från en B.36-studie ge bakgrundsinformation som en vägledning vid utformning av specifika studier för dessa undersökningar. Den här testmetoden är inte avsedd för testning av nanomaterial. En rapport om preliminär översyn av OECD:s testriktlinjer för deras tillämplighet för nanomaterial visar att TG 417 (motsvarande denna testmetod B.36) inte kan tillämpas på nanomaterial (1).

DEFINITIONER

10. Definitioner som används för tillämpningen av denna testmetod finns i tillägget.

DJURSKYDDSÖVERVÄGANDEN

11. Vägledning om human behandling av djur finns i OECD:s vägledningsdokument (GD) 19 (2). Det rekommenderas att OECD:s GD 19 konsulteras för alla in vivo- och in vitro-studier beskrivna i denna testmetod.

BESKRIVNING AV METODER

Pilotstudier

12. Användning av pilotstudier rekommenderas och uppmuntras vid valet av försöksparametrar till toxikokinetiska studier (t.ex. metabolism, massbalans, analysförfaranden, dosfinnande, utandning av CO_2, etc.). Karakteriseringen av vissa av dessa parametrar kräver inte användningen av radioaktivt märkta kemikalier.

▼M4

Val av djur

Arter

13. De djurarter (och den stam) som används för TK-testning bör helst vara densamma som användes i andra toxikologiska studier utförda med testkemikalien av intresse. Normalt bör råtta användas då den har använts i stor utsträckning för toxikologiska studier. Användningen av andra eller ytterligare arter kan vara befogat om viktiga toxikologiska studier visar prov på signifikant toxicitet i dessa arter eller om deras toxicitet/toxikokinetik visar sig vara mer relevant för människor. Motivering bör ges för val av djurart och dess stam.

14. Om inte annat anges avser denna testmetod råttan som försöksart. Vissa aspekter för metoden kan behöva modifieras vid användningen av andra försöksarter.

Ålder och stam

15. Unga friska vuxna djur (normalt 6–12 veckor vid tidpunkten för doseringen) bör användas (se också punkterna 13 och 14). Motivering bör ges för användningen av djur som inte är unga vuxna. Alla djur bör vara i samma ålder i början av studien. Viktskillnaden mellan enskilda djur bör inte överstiga ± 20 % av medelvikten för testgruppen. Helst bör den stam som används vara samma som användes för härledning av den toxikologiska databasen för testkemikalien.

Djurens antal och kön

16. Minst fyra djur av samma kön bör användas för varje dos som testas. Motivering bör ges för könet på de djur som används. Användningen av båda könen (fyra hanar och fyra honor) bör övervägas om det finns belägg för betydande könsrelaterade skillnader i toxicitet.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Djuren bör i regel inhysas individuellt under testperioden. Inhysning i grupp kan vara berättigad under särskilda omständigheter. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmra ljus och 12 timmar mörker. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C) och den relativa fuktigheten 30–70 %. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten.

Testkemikalie

18. En radioaktivt märkt testkemikalie med ^{14}C kan användas för alla massbalans- och metabolitidentifieringsaspekter av studien, men om det kan påvisas att:

— Massbalans och metabolitidentifiering kan utvärderas tillräckligt med den omärkta testkemikalien.

— Den analytiska specificiteten och sensitiviteten för metoden som används med en icke-radioaktiv testkemikalie är lika med eller större än det som kan uppnås med den radioaktivt märkta testkemikalien.

▼M4

Då behöver man inte använda en radioaktivt märkt testkemikalie. Vidare kan andra radioaktiva och stabila isotoper användas, särskilt om ämnet svarar för eller är en del av testkemikaliens toxiska del. Om möjligt bör den radioaktiva märkningen lokaliseras i en kärndel av molekylen som är metaboliskt stabil (den är inte utbytbar, avlägsnas inte metaboliskt som CO_2 och blir inte del av en-kolreserven i organismen). Märkning av flera platser eller specifika områden i molekylen kan vara nödvändig för att se vad som händer med testkemikaliens metabolism.

19. De radioaktivt märkta och omärkta testkemikalierna bör analyseras med lämpliga metoder för att upprätta renhet och identitet. Den radioaktiva renheten hos den radioaktiva testkemikalien bör vara den högst uppnåbara för en viss testkemikalie (helst mer än 95 %) och rimlig ansträngning bör göras för att identifiera föroreningar som förekommer i 2 % eller mer. Renheten tillsammans med identiteten och andelen eventuella orenheter som har identifierats bör rapporteras. Enskilda reglerande program kan välja att ge ytterligare vägledning som hjälp för definitionen och specifikationerna av testkemikalier som består av blandningar för bestämning av renhet.

Val av dos

Pilotstudie

20. Vanligtvis är en enkel oral dos tillräcklig för pilotstudien. Dosen bör vara icke-toxisk, men tillräckligt hög för att medge metabolisk identifiering i exkret (och plasma om tillämpligt) samt uppfylla det fastställda syftet med pilotstudien som nämns i punkt 12 i denna testmetod.

Huvudstudier

21. För huvudstudierna är minst två doser att föredra eftersom samlad information från minst två dosgrupper kan vara behjälplig för dosinställning i andra toxicitetsstudier, och hjälpa till med dosrespons-bedömningen av redan tillgängliga toxicitetstester.

22. Om två doser administreras bör båda doserna vara tillräckligt höga för att medge metabolisk identifiering i exkrement (och plasma om tillämpligt). Information från tillgängliga toxicitetsdata bör beaktas vid valet av dos. Om informationen inte är tillgänglig (t.ex. från akuta orala toxicitetsstudier med registrerade tecken på toxicitet eller från toxicitetsstudier med upprepad dosering) kan ett värde för den högre dosen som ligger under LD_{50}- (oralt och via huden) eller LC_{50}-uppskattningen (inhalation), eller under det lägre värdet för akut toxicitetsintervall beaktas. Den lägre dosen bör vara en del av den högre dosen.

23. Om endast en dosnivå undersöks bör helst dosen vara tillräckligt hög för att medge metabolitidentifiering i exkrement (och plasma om tillämpligt), utan att framkalla uppenbar toxicitet. En motivering bör ges till varför inte en andra dosnivå har inkluderats.

24. Om doseffekten på de kinetiska processerna behöver upprättas kanske två doser inte räcker och minst en dos behöver vara tillräckligt hög för att mätta dessa processer. Om arean under plasmakoncentration-tidkurvan (AYC) inte är linjär mellan två dosnivåer som används i huvudstudien, är detta ett tydligt tecken på att mättnad av en eller flera kinetiska processer sker någonstans mellan de två dosnivåerna.

▼M4

25. För testkemikalier med låg toxicitet bör en maximal dos på 1 000 mg/kg kroppsvikt (oralt och via huden) användas (om administreringen sker via inhalation, se kapitel B.2 i denna bilaga för vägledning; vanligtvis överskrider inte denna dos 2 mg/l). Kemisk-specifika överväganden kan kräva en högre dos beroende på regleringsbehoven. Valet av dos ska alltid motiveras.

26. Engångsdostoxikokinetiska data och vävnadsdistributionsdata kan vara lämpliga för att fastställa potentialen för ackumulering och/eller persistens. I vissa fall kan dock administrering med upprepad dos behövas i) för att mer fullständigt hantera potentialen för ackumulering och/eller persistens eller förändringar i TK (t.ex. enzyminduktion och inhibition), eller ii) vad som krävs enligt tillämpliga regelsystem. I studier med upprepad dosering där administrering med upprepade låga doser vanligtvis räcker, kan under vissa omständigheter också vara nödvändiga (se även punkt 57).

Administrering av testkemikalie

27. Testkemikalien ska upplösas eller suspenderas homogent i samma vehikel som används i andra toxicitetsstudier med oral sondmatning som utförs med testkemikalien, om sådan vehikelinformation finns tillgänglig. Grunden för valet av vehikel ska ges. Valet av vehikel och doseringsvolymen ska beaktas vid studiens utformning. Det sedvanliga administreringssättet är genom sondmatning, dock kan administrering via gelatinkapsel eller foderblandning vara fördelaktig i specifika situationer (i båda fallen bör detta motiveras). Verifiering av den faktiska dos som administreras till varje djur bör ges.

28. Den maximala volymen vätska som ska administreras genom sondmatning vid ett tillfälle beror på försöksdjurens storlek, typen av dosvehikel, och huruvida fodret undanhålls eller ej före administreringen av testkemikalien. Motivering för administrering eller undanhållande av foder före dosering ska ges. I regel bör volymen hållas så låg som möjligt för antingen vattenbaserade eller icke-vattenbaserade vehiklar. Dosvolymer bör normalt inte överskrida 10 ml/kg kroppsvikt för gnagare. Vehikelvolymer som används för mer lipofila testkemikalier kan börja med 4 ml/kg kroppsvikt. Vid upprepad dosering, när dagligt fastandet kontraindiceras, bör lägre dosnivåer (t.ex. 2–4 ml/kg kroppsvikt) övervägas. Där så är möjligt kan man överväga att använda en dosvolym som överensstämmer med den som administrerats i andra sondmatningsstudier av en testkemikale.

29. Intravenös (IV) administrering av testkemikalien och mätning av testkemikalien i blod och/eller exkrement kan användas för att fastställa biotillgänglighet eller relativ oral absorption. För IV-studien administreras en engångsdos (vanligtvis lika med men inte överskridande den lägre orala dosen – se val av dos) av testkemikalien med en lämplig vehikel. Detta ämne bör administreras i lämplig volym (t.ex. 1 ml/kg kroppsvikt) på den valda platsen för administreringen till minst fyra djur av lämpligt kön (båda könen kan användas om det är befogat, se punkt 16). En fullt upplöst eller suspenderad dosberedning är nödvändig för IV-administrering av testkemikalien. Vehikeln för IV-administrering ska inte störa blodintegriteten eller blodflödet. Om testkemikalien infunderas bör infusionshastigheten rapporteras och standardiseras mellan djuren, förutsatt att en infusionspump

▼M4

används. Narkos bör användas om man för in en kanyl i halsvenen (för administrering av testkemikalie och/eller insamling av blod) eller om man använder den femorala artären för administreringen. Hänsyn bör tas till den typ av bedövning som kan påverka toxikokinetiken. Djuren bör få tillfälle att återhämta sig före administreringen av testkemikalien plus vehikeln.

30. Andra administreringssätt, såsom hud och inhalation (se punkterna 74–78), kan vara tillämpliga för vissa testkemikalier med tanke på deras fysikalisk-kemiska egenskaper och den förväntade mänskliga användningen eller exponeringen.

Mätningar

Massbalans

31. Massbalans bestäms genom summering av procenten för den administrerade (radioaktiva) dosen som utsöndrats i urin, avföring och utandningsluft, och procentandelen som finns i vävnader, resterna av kroppen och burtvätt (se punkt 46). Generellt anses en total återvinning av den administrerade testkemikalien (radioaktivitet) i storleksordningen > 90 % vara tillräcklig.

Absorption

32. En initial uppskattning av absorption kan uppnås genom att utesluta den procentuella dosen i det gastrointestinala (GI) området och/eller avföringen från massbalansbestämningen. För procentberäkningen av absorption, se punkt 33. För undersökning av avföring, se punkterna 44–49. Om den exakta omfattningen av absorption efter oral dosering inte kan fastställas genom massbalansstudier (t.ex. där mer än 20 % av den administrerade dosen finns i avföringen) kan ytterligare undersökningar vara nödvändiga. Dessa studier kan antingen omfatta 1) oral administrering av testkemikalie och mätning av testkemikalie i galla eller 2) oral och intravenös administrering av testkemikalien och mätning av nettotestkemikalie i urin plus utandningsluft plus kadaver för var och en av de båda sätten. I båda studieutformningarna genomförs mätning av radioaktivitet som en surrogatmetod för kemikaliespecifik analys av testkemikalien plus metaboliter.

33. Om en gallutsöndringsstudie genomförs används vanligtvis oral administrering. I denna studie bör kanyler föras in i gallgångarna hos minst fyra djur av lämpligt kön (eller av båda könen om det är befogat) och en engångsdos av testkemikalien ska administreras. Efter administreringen av testkemikalien bör utsöndringen av radioaktivitet/testkemikalie i gallan övervakas så länge som krävs för att uppskatta procentandelen av den administrerade dosen som utsöndras via denna väg, som kan användas för att direkt beräkna omfattningen av oral absorption enligt följande:

$$\text{Procentandel absorption} = \frac{(\text{mängd i galla} + \text{urin} + \text{utandningsluft} + \text{kropp utanmatspjälkningskanalinnehåll})/\text{administrerad mängd} \times 100}{}$$

34. I några klasser av testkemikalien kan direkt utsöndring av den absorberade dosen uppträda i de intestinala membranen. I sådana fall anses inte mätningen av %-dosen i avföringen efter en oral dos i gallgången representativt för den icke-absorberade dosen. Det rekommenderas att då tarmsekretion tros ske baseras den absorberade %-dosen på absorptionen beräknad på utsöndringen efter den orala jämfört med den intravenösa (hel eller gallgång) (se punkt 35). Det rekommenderas också att om kvantifiering av tarmsekretet anses nödvändig, mäts exkretionen i gallgången efter den intravenösa administreringen.

▼M4

Biotillgänglighet

35. Biotillgänglighet kan bestämmas genom plasma-/blodkinetik på de orala och intravenösa grupperna, såsom beskrivs i punkterna 50–52, genom särskilda kemiska analyser av testkemikalien och/eller relevant metabolit(er), därför krävs inte testkemikalier märkta med radioaktivitet. Beräkningen av testkemikaliens biotillgänglighet (F) eller relevant metabolit(er) kan utföras enligt följande:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dos_{IV}/Dos_{exp})$$

Där AUC är arean under plasmakoncentration-tidkurvan, och exp är den experimentella vägen (oral, dermal eller via inhalation).

36. Vid riskbedömning av systematiska effekter, föredras i allmänhet biotillgänglighet framför procentuell absorption när man jämför systematiska koncentrationer i djurstudier med analoga bioövervakningsdata från studier över arbetstagares exponering. Situationen kan bli mer komplicerad om doserna är i det icke-linjära området så det är viktigt att toxikokinetisk screening bestämmer doserna i det linjära området.

Vävnadsfördelning

37. Kunskap om en testkemikalies vävnadsfördelning och/eller dess metaboliter är viktig för identifieringen av målvävnader och förståelsen för de underliggande mekanismerna för toxicitet, samt information om testkemikaliens potential och metabolitackumulering och persistens. Procentandelen av den totala (radioaktiva) dosen i vävnader samt rester i kroppen är det som minst som ska mätas vid exkretionsförsökets upphörande (t.ex. upp till 7 dagar efter dosering eller mindre beroende på testkemikaliens specifika beteende). När ingen testkemikalie detekteras i vävnaderna vid studiens upphörande (t.ex. för att testkemikalien kanske har eliminerats före studiens upphörande på grund av en kort halveringstid), bör man vara försiktig för att undvika feltolkning av datan. I denna typ av situation bör vävnadsfördelningen undersökas vid tidpunkten för testkemikaliens (och/eller metabolit) plasma-/blodtoppkoncentration (T_{max}) eller topphastighet för urinexkretion, när så är lämpligt (se punkt 38). Vidare kan vävnadsinsamlingar vid ytterligare tidpunkter vara nödvändiga för att bestämma vävnadsfördelningen av testkemikalien och/eller dess metaboliter, bedöma tidsberoendet (om tilllämpligt), underlätta upprättande av massbalansen och/eller det som krävs av en behörig myndighet. Vävnader som bör samlas in är lever, fett, magtarmkanalen, njurar, mjälte, helblod, rester av kroppen, målvävnadsorgan och eventuellt andra vävnader (t.ex. sköldkörtel, erytrocyter, reproduktionsorgan, hud, öga (särskilt i pigmenterade djur) som har en potentiell betydelse för den toxikologiska utvärderingen av testkemikalien. Analys av ytterligare vävnader vid samma tidpunkter bör beaktas för att maximera utnyttjandet av djuren och i händelse av att målorgantoxicitet observeras i subkroniska eller kroniska toxicitetsstudier. Den (radioaktiva) restkoncentrationen och förhållandet vävnad-blod bör också rapporteras.

38. Utvärderingen av vävnadsfördelningen vid ytterligare tidpunkter såsom tidpunkten för plasma-/blodtoppkoncentrationen (t.ex. T_{max}) eller urinexkretionens topphastighet, kan också behövas eller krävas av en behörig myndighet. Denna information kan underlätta förståelsen av toxicitet samt testkemikaliens potential och metabolitackumulering och persistens. Motivering för urvalet bör ges; prover för analys bör i allmänhet vara desamma som de ovan (se punkt 37).

▼M4

39. Kvantifiering av radioaktivitet i vävnadsfördelningsstudier kan utföras med organdissektion, homogenisering, förbränning och/eller löslighet, följt av vätskescintillationsräkning (LSC) av fångade rester. Vissa tekniker, för närvarande på olika utvecklingsstadier t.ex. kvantitativ helkroppsautoradiografi och receptormikroskopisk autoradiografi, kan vara användbara för att bestämma fördelningen av en testkemikalie i organ och/eller vävnader (3) (4).

40. För exponeringsvägar annat än orala, bör specifika vävnader samlas in och analyseras, såsom lungor i inhalationsstudier och hud i dermala studier. Se punkterna 74–78.

Metabolism

41. Exkret (och plasma, i förekommande fall) bör samlas in för identifiering och kvantifiering av oförändrad testkemikalie och metaboliter som beskrivs i punkterna 44–49. Det är acceptabelt med sammanslagning av urin och avföring för att underlätta metabolitidentifiering inom en given dosgrupp. Profilering av metaboliter från varje tidsperiod rekommenderas. Om bristen på prov och/eller radioaktivitet utesluter detta, är det dock acceptabelt med sammanslagning av urin och avföring över flera tidpunkter, men sammanslagning mellan könen eller doser är inte acceptabelt. Lämpliga kvalitativa och kvantitativa metoder ska användas för att analysera urin, avföring, sönderfallen radioaktivitet från behandlade djur samt galla vid behov.

42. Rimliga ansträngningar bör göras för att identifiera alla metaboliter som finns i 5 % eller mer av den administrerade dosen och för att tillhanda ett metaboliskt system för testkemikalien. Testkemikalier som kännetecknas av exkrementer som innefattar 5 % eller mer av den administrerade dosen bör identifieras. Identifiering hänvisar till den exakta strukturella bestämningen av komponenter. Normalt utförs identifiering antingen genom co-kromatografi av metaboliten med kända standarder som använder två olika system eller tekniker för positiv strukturell identifiering, såsom masspektrometri, kärnmagnetisk resonans (NMR) etc. När det gäller co-kromatografi anses inte kromatografiska tekniker som använder samma stationära fas med två olika lösningsmedelsystem vara en lämplig tvåmetodsverifiering av metabolitidentitet, eftersom metoderna inte är självständiga. Identifiering genom co-kromatografi ska erhållas genom användning av två olika analytiskt oberoende system såsom omvänd och normal tunnskiktskromatografi (TLC) och vätskekromatografi (HPLC). Förutsatt att den kromatografiska separationen är av lämplig kvalitet är ytterligare bekräftelse genom spektroskopi inte nödvändig. Alternativt kan otvetydig identifiering även erhållas med metoder som ger strukturell information såsom vätskekromatografi/masspektrometri (LC-MS) eller vätskekromatografi/tandem-masspektrometri (LC-MS/MS), gaskromatografi/masspektrometri (GC-MS), och NMR-spektrometri.

43. Om det inte är möjligt med identifiering av metaboliter på 5 % eller mer av den administrerade dosen bör en motivering/förklaring lämnas i slutrapporten. Det kan vara lämpligt att identifiera metaboliter som utgör mindre än 5 % av den administrerade dosen för att få en bättre förståelse av metabolismen för faro- och/eller riskbedömning av testkemikalien. Strukturell bekräftelse ska lämnas när det är möjligt. Detta kan inkludera profilering av plasma eller blod, eller andra vävnader.

▼M4

Exkretion

44. Hastigheten och omfattningen av exkretion av den administrerade dosen bör bestämmas genom mätning av procentandelen av den återvunna (radioaktiva) dosen från urin, avföring och utandningsluft. Dessa data hjälper också till att etablera massbalans. De kvantiteter av testkemikalien (radioaktivitet) som eliminerats i urin, avföring och utandningsluft bör bestämmas med lämpliga tidsintervall (se punkterna 47–49). Försök med upprepad dos ska utformas för att medge insamling av exkretionsdata för att uppfylla de mål som beskrivs i punkt 26. Detta kommer att möjliggöra jämförelse med försök med engångsdos.

45. Om en pilotstudie har visat att ingen signifikant mängd av testkemikalien (radioaktivitet) (enligt punkt 49) utsöndras i utandningsluften, då behöver inte utandningsluften samlas in i den slutgiltiga studien.

46. Varje djur ska placeras i en separat metabolisk enhet för uppsamling av urin och avföring (urin, avföring och utandningsluft). Vid slutet av varje uppsamlingsperiod (se punkterna 47–49), bör de metaboliska enheterna sköljas med lämpligt lösningsmedel (detta är känt som ”burtvätt”) för att säkerställa maximal återvinning av testkemikalien (radioaktivitet). Insamling av urin och avföring bör upphöra efter 7 dagar, eller efter att minst 90 % av den administrerade dosen har återvunnits, beroende på vilket som inträffar först.

47. De totala mängderna av testkemikalien (radioaktivitet) i urin ska bestämmas vid minst två olika tidpunkter under dag 1 av uppsamlingen, varav en 24 timmar efter dosering, och därefter dagligen till dess studien upphör. Valet av mer än två provtagningstidpunkter under dag ett (t.ex. vid 6, 12 och 24 timmar) uppmuntras. Resultaten från pilotstudier ska analyseras för information om alternativa eller kompletterande tidpunkter för insamling. En motivering ska ges för insamlingsschemana.

48. Den totala mängden testkemikalie (radioaktivitet) i avföring ska fastställas på daglig basis med början 24 timmar efter dosering tills studien avslutas, såvida inte pilotstudier föreslår alternativa eller kompletterande tidpunkter för insamling. En motivering ska ges för de alternativa insamlingsschemana.

49. Insamlingen av passerad CO_2 och andra flyktiga material kan avbrytas i ett givet studieförsök när mindre än 1 % av den administrerade dosen återfinns i utandningsluften under en 24-timmars uppsamlingsperiod.

Tidpunktsstudier

Plasma-/blodkinetik

50. Syftet med dessa studier är att få en uppskattning av grundläggande TK-parametrar (t.ex. C_{max}, T_{max}, halveringstid ($t_{1/2}$), AUC) för testkemikalien. Dessa studier kan utföras med en dos eller, mer troligt med två eller fler doser. Dosinställning bör bestämmas av försökstypen och/eller frågan som behandlas. Kinetiska data kan behövas för att lösa frågor såsom testkemikaliens biotillgänglighet och/eller för att klargöra doseffekten för godkännande (t.ex. för att klargöra huruvida godkännandet är mättat på ett dosberoende sätt).

51. För dessa studier ska minst fyra djur av samma kön per dosgrupp användas. Motivering bör ges för könet på de djur som används. Användningen av båda könen (fyra hanar och fyra honor) bör övervägas om det finns belägg för betydande könsrelaterade skillnader i toxicitet.

▼M4

52. Efter administreringen av testkemikalien (radioaktiv) ska blodprov tas från varje djur vid lämpliga tidpunkter med hjälp av lämplig provtagningsmetod. Volymen och antal blodprov som kan erhållas per djur kan begränsas genom potentiella effekter från upprepad provtagning på djurhälsa/fysiologi och/eller analysmetodens känslighet. Proven ska analyseras för varje enskilt djur. I vissa fall (t.ex. metabolitkarakterisering) kan det vara nödvändigt att samla in prover från fler än ett djur. Samlingsprover bör identifieras och en förklaring för sammanslagning bör ges. Om en radioaktiv märkt testkemikalie används kan en analys av den totala aktuella radioaktiviteten vara tillräcklig. Om så är fallet, bör den totala radioaktiviteten analyseras i helblod och plasma eller plasma och röda blodkroppar för möjliggöra en beräkning av blod-/plasmaförhållandet. Under andra omständigheter kan mer specifika undersökningar som kräver identifiering av modersubstans och/eller metaboliter, eller bedömning av proteinbindning behövas.

Övrig vävnadskinetik

53. Syftet med dessa studier är att få information om tidsförloppet för att behandla frågor rörande toxisk verkningsmekanism, bioackumulering och biopersistens genom bestämning av testkemikalienivåer i olika vävnader. Valet av vävnader och antal tidspunkter som utvärderas beror på frågan som ska behandlas och testkemikaliens toxikologiska databas. Utformningen av dessa ytterligare vävnadskinetiska studier bör ta hänsyn till den information som samlats in som beskrivs i punkterna 37–40. Dessa studier kan gälla engångsdosering eller upprepad dosering. En detaljerad motivering för den använda strategin ska ges.

54. Skäl för att utföra andra vävnadskinetiska studier kan omfatta:

— Tecken på utökad blodhalveringstid tyder på möjlig ackumulering av testkemikalien i olika vävnader eller

— intresse av om en stabil tillståndsnivå har uppnåtts i vissa vävnader (även om en stabil tillståndsnivå av en testkemikalie kan ha uppnåtts kan det finnas intresse av att veta att en stabil tillståndsnivå också har uppnåtts i målvävnader i t.ex. studier med upprepad dosering).

55. För dessa typer av tidförloppsstudier bör en lämplig oral dos av testkemikalien administreras till minst fyra djur per dos per tidpunkt och tidsförloppet för distributionen övervakas i utvalda vävnader. Endast ena könet får användas om inte könsspecifik toxicitet observeras. Om total radioaktivitet eller moderkemikalien och/eller metaboliter analyseras beror på den fråga som behandlas. Bedömning av vävnadsdistributionen bör göras med lämpliga metoder.

Enzyminduktion/inhibition

56. Studier som tar upp eventuella effekter av enzyminduktion/inhibition eller biotransformation av testkemikalien som studeras kan krävas i ett eller flera av följande fall:

1) Tillgängliga uppgifter tyder på ett samband mellan biotransformering av testkemikalien och ökad toxicitet.

2) Tillgängliga toxicitetsdata tyder på ett ickelinjärt förhållande mellan dos och metabolism.

▼M4

3) Resultatet av metabolitidentifieringsstudier visar identifiering av en potentiell toxisk metabolit som kan ha producerats av en enzymväg som inducerats av testkemikalien.

4) För att förklara effekter som antas vara kopplade till enzyminducerade fenomen.

5) Om toxikologiskt signifikanta förändringar i den metaboliska profilen hos testkemikalien observeras antingen *in vitro*- eller *in vivo*-försök med olika arter eller villkor, kan karakteriseringen av involverad enzym(er) behövas (t.ex. fas I-enzymer såsom isoenzymer av cytokrom P450-beroende mono-oxygenassystemet, fas II-enzymer såsom isoenzymer av sulfotransferas eller uridindifosfat glukuronosyltransferas, eller andra relevanta enzymer). Denna information kan användas för att utvärdera relevansen av art till art extrapoleringar.

57. Lämpliga studieprotokoll för att värdera testkemikalierelaterade förändringar i TK, lämpligt validerade och motiverade bör användas. Exempelstudieutformning utgörs av upprepad dosering med omärkt testkemikalie, följt av en radioaktivt märkt engångsdos dag 14 eller upprepad dosering med radioaktivt märkt testkemikalie och provtagning dag 1, 7 och 14 för bestämning av metabolita profiler. Upprepad dosering med radioaktivt märkta kemikalier kan också ge information om bioackumulering (se punkt 26).

KOMPLETTERANDE METODER

58. Kompletterande metoder bortom in vivo-försök som beskrivs i denna testmetod kan ge nyttig information om absorption, distribution, metabolism eller eliminering av en testkemikalie i vissa arter.

Användning av *in vitro*-information

59. Flera frågor som rör metabolism av testkemikalien kan behandlas i in vitro-studier med lämpliga testsystem. Nyligen isolerade eller odlade hepatocyter och subcellulära fraktioner (t.ex. mikrosomer och cytosol eller S9-fraktioner) från levern kan användas för att studera eventuella metaboliter. Lokal metabolism i målorganet t.ex. lungan kan vara av intresse vid riskbedömningen. För dessa ändamål kan mikrosomala fraktioner av målorgan vara användbara. Studier med mikrosomer kan vara användbara för att hantera potentiella kön- och livsetappsskillnader och karakterisera enzymparametrar (K_m och V_{max}) som kan hjälpa till vid bedömningen av dosberoende metabolism i förhållande till exponeringsnivåer. Dessutom kan mikrosomer vara användbara för att identifiera de specifika mikrosomala enzymer som är involverade i metabolismen av testkemikalien som kan vara relevanta i artextrapolering (se också punkt 56). Potentialen för induktion av metabolism kan också undersökas genom leversubcellulära fraktioner (t.ex. mikrosomer och cytosol) av djur som förbehandlats med testkemikalien i fråga, in vitro via hepatocytinduktionsstudier eller från specifika cellinjer som uttrycker relevanta enzymer. Under vissa omständigheter och under lämpliga förhållanden kan subcellulära fraktioner som kommer från mänskliga vävnader övervägas för bestämning av potentiella artskillnader i biotransformation. Resultaten från in vitro-undersökningar kan också vara användbara i utvecklingen av PBTK-modeller (5).

▼M4

60. In vitro-hudabsorptionsstudier kan också ge kompletterande information för att karakterisera absorption (6).

61. Primära cellkulturer från leverceller och färska vävnadsskivor kan användas för att behandla liknande frågor som med levermikrosomer. I vissa fall kan det vara möjligt att svara på specifika frågor med hjälp av cellinjer med definierade uttryck av det relevanta enzymet eller modifierade cellinjer. I vissa fall kan det vara användbart att studera inhiberingen och induktionen av specifika cytokrom P450-isozymer (t.ex. CYP1A1, 2E1, 1A2 och andra) och/eller fas II-enzymer av modersubstansen med hjälp av in vitro-studier. Informationen som erhålls kan användas för liknande strukturerade föreningar.

Användning av toxikokinetiska data från toxicitetsstudier som kompletterande information

62. Analys av blod, vävnad och/eller avföringsprover som erhållits under genomförandet av eventuella andra toxicitetsstudier kan ge data om biotillgänglighet, förändringar i plasmakoncentration i tid (AUC, C_{max}), bioackumuleringspotential, nedbrytningshastighet och köns- eller livsskedesförändringar i metabolism och kinetik.

63. Övervägande av studiens utformning kan användas för att besvara frågor som rör mättad absorption, biotransformering eller utsöndringsvägar vid högre dosnivåer, hanteringen av nya metaboliska vägar vid högre doser och begränsningen av toxiska metaboliter för högre doser.

64. Andra farobedömningsöverväganden kan omfatta frågor såsom:

— Åldersrelaterad känslighet på grund av skillnader i statusen för blod-hjärnbarriären, njuren och/eller avgiftningskapaciteten.

— Subpopulationskänslighet på grund av skillnader i biotransformeringskapacitet eller andra TK-skillnader.

— Omfattningen av exponeringen av fostret genom transplacental överföring av kemikalier eller hos de nyfödda genom digivning.

Användning av toxikokinetisk modellering

65. Toxikokinetiska modeller kan vara användbara för olika faro- och riskbedömningsaspekter som till exempel förutsägelsen av systematisk exponering och intern vävnadsdos. Vidare kan specifika frågor om verkningsmekanism behandlas, och dessa modeller kan ge en grund för extrapolering mellan arter, exponeringsvägar, doseringsmönster och mänsklig riskbedömning. Data som är användbara för utvecklandet av PBTK-modeller för en testkemikale för en given art inkluderar 1) fördelningskoefficienter, 2) biokemiska konstanter och fysiologiska parametrar, 3) vägspecifika absorptionsparametrar och 4) in vivo-kinetiska data för modellutvärdering (t.ex. nedbrytningsparametrar för relevanta (> 10 %) utsöndringsvägar, K_m och V_{max} för metabolism). Försöksdatan som används vid modellutvecklingen ska genereras med vetenskapligt sunda metoder och modellresultaten ska valideras. Testkemikalie och artspecifika parametrar såsom absorptionshastighet, blodvävnadspartitionering och metaboliska hastighetskonstanter bestäms ofta för att underlätta utvecklingen av oberoende eller fysiologiskt baserade modeller (7).

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

66. Det rekommenderas att studierapporten innehåller en innehållsförteckning.

Rapportens huvuddel

67. Rapportens huvuddel ska innehålla information som omfattas av denna testmetod indelad i avsnitt och punkter enligt följande:

Sammanfattning

68. Denna del av studien ska innehålla en sammanfattning av studiens utformning och en beskrivning av metoderna som använts. Den bör också belysa de viktigaste resultaten avseende massbalans, arten och omfattningen av metaboliter, vävnadsrester, nedbrytningshastighet, bioackumuleringspotential, könsskillnader etc. Sammanfattningen bör presenteras i tillräcklig detalj för att möjliggöra en bedömning av resultaten.

Inledning

69. Denna del av rapporten ska omfatta studiens mål, motiv och utformning såväl som lämpliga referenser och eventuell bakgrundshistoria.

Material och metoder

70. Denna del av rapporten ska innehålla detaljerade beskrivningar av all relevant information, inklusive:

a) Testkemikalie

Denna underavdelning ska innehålla identifiering av testkemikalien: Kemiskt namn, molekylstruktur, kvalitativ och kvantitativ bestämning av dess kemiska sammansättning, kemisk renhet och när det så möjligt, typ och mängd av eventuella orenheter. Den bör också innehålla information om fysikalisk/kemiska egenskaper, inklusive fysiskt tillstånd, färg, bruttolöslighet och/eller fördelningskoefficient, stabilitet, och om så är lämpligt, frätande egenskaper. Om tillämpligt ska information om isomerer lämnas. Om testämnet är radioaktivt bör information om följande ingå i denna underavdelning: Typen av radionuklid, läge för märkning, specifik aktivitet och radiokemisk renhet.

Typ eller beskrivning av eventuell vehikel, spädningsmedel, suspenderingsmedel och emulgeringsmedel eller andra material som används vid administreringen av testkemikalien bör anges.

b) Försöksdjur

Denna underavdelning ska innehålla information om försöksdjuren, inklusive val och motivering av art, stam, ålder vid studiens inledning, kön samt kroppsvikt, hälsotillstånd och djurhållning.

c) Metoder

Denna underavdelning ska innehålla detaljer om studiens utformning och metod som används. Den ska innehålla en beskrivning av:

1) Motivering för varje ändring av exponeringsväg och exponeringsförhållanden, om tillämpligt.

▼M4

2) Motivering för valet av dosnivåer.

3) Beskrivning av pilotstudier som används i den experimentella utformningen av uppföljningsstudier, om tillämpligt. Pilotstudiens underlag ska lämnas in.

4) Hur doseringslösningen bereddes och typen av lösningsmedel eller vehikel, om någon, som används.

5) Antal behandlingsgrupper och antal djur per grupp.

6) Doseringsnivåer och volym (och specifik dosaktivitet då radioaktivitet används).

7) Väg och metod för administrering.

8) Doseringsfrekvens.

9) Fasteperiod (om sådan används).

10) Total radioaktivitet per djur.

11) Djurhantering.

12) Provtagning och hantering.

13) Analysmetoder som används för separering, kvantifiering och identifiering av metaboliter.

14) Detektionsgräns för de använda metoderna.

15) Andra experimentella mätningar och förfaranden som används (inklusive validering av metoder för metabolitanalys).

d) Statistisk analys.

Om statistisk analys används för att analysera studieresultaten ska tillräcklig information om analysmetoden och de datorprogram som används ingå, så att en oberoende granskare/statistiker kan omvärdera och rekonstruera analysen.

När det gäller systemmodellstudier såsom PBTK bör presentationen av modellerna innehålla en fullständig beskrivning av modellen för att tillåta en oberoende rekonstruktion och validering av modellen (se punkt 65 och Tillägg: Definitioner).

Resultat

71. All data ska sammanfattas i tabellform med lämplig statistisk utvärdering och beskrivas i texten i denna avdelning. Radioaktivitetsdata ska sammanfattas och presenteras på lämpligt sätt för studien, vanligtvis i mikrogram- eller milligramekvivalenter per massa för provet, även om andra enheter kan användas. Denna avdelning bör innehålla grafiska illustrationer, reproduktion av representativa kromatografiska och spektrometriska data, metabolitidentifiering/kvantifiering och föreslagna metaboliska vägar inklusive metaboliternas molekylstruktur. Vidare ska följande information ingå i denna avdelning, om tillämpligt:

1) Kvantitet och procentandel av återvinning i urin, avföring, utandningsluft, samt urin och avföring i burtvätt.

— För dermala studier ska även data inkluderas beträffande återvinning av testkemikalien från behandlad hud, hudtvätt och kvarvarande radioaktivitet i huden vilket omfattar utrustning och metabolisk enhet samt resultaten från hudtvättsstudien. För fortsatt diskussion se punkterna 74–77.

▼M4

— Inhalationsstudier ska även innehålla data om återvinning av testkemikalien från lungor och nasala vävnader (8). För fortsatt diskussion se punkt 78.

2) Vävnadsfördelning rapporteras som procent av administrerad dos och koncentration (mikrogramekvivalenter per gram vävnad), och vävnad-blod eller vävnad-plasma-förhållanden.

3) Materialbalans utvecklad ur varje studie som inbegriper analys av kroppsvävnader och utsöndringar.

4) Plasmakoncentrationer och toxikokinetiska parametrar (biotillgänglighet, AUC, Cmax, Tmax, nedbrytning, halveringstid) efter administrering genom relevant väg(ar) för exponering.

5) Hastighet och omfattning av absorption av testkemikalien efter administrering genom relevant väg(ar) för exponering.

6) Mängden testkemikalie och metaboliter (rapporterad som en procentandel av den administrerade dosen) som uppsamlas från avföringen.

7) Hänvisning till tilläggsdata som innehåller individuella djurdata från alla kvantitativa endpoints (t.ex. dosadministrering, procentandel återvinning, koncentrationer, TK-parametrar etc.).

8) En figur med de föreslagna metaboliska vägarna och metaboliternas molekylära strukturer.

Diskussion och slutsatser

72. I detta avsnitt bör författaren/författarna:

1) Föreslå en metabolisk väg på grundval av resultaten från testkemikaliens metabolism och disposition.

2) Diskutera eventuella art- och könskillnader när det gäller disposition och/eller biotransformering av testkemikalien.

3) Ställa upp i tabellform och diskutera identifieringen och omfattningen av metaboliter, nedbrytningshastighet, bioackumuleringspotential och nivå på moderämne i vävnadsrester och/eller metabolit(er) såväl som möjliga dosberoende förändringar i TK-parametrar, i förekommande fall.

4) I detta avsnitt integrera eventuella relevanta TK-data som erhållits i samband med genomförandet av toxicitetsstudier.

5) Ge en kortfattad slutsats som kan stödjas av resultaten från studien.

6) Tillagda avsnitt (som behövs eller är lämpliga).

73. Ytterligare avsnitt bör användas för att inkludera stöd för bibliografisk information, tabeller, figurer, tillägg etc.

▼M4

ALTERNATIVA EXPONERINGSVÄGAR

Hud

Hudbehandling

74. Det här avsnittet innehåller specifik information om undersökningen av testkemikaliens toxikokinetik vid administrering via huden. För hudabsorption ska kapitel B.44 i denna bilaga (hudabsorption: in vivo-metod (9)) konsulteras. För andra endpoints såsom distribution och metabolism kan den här testmetoden B.36 användas. En eller flera dosnivåer för testkemikalien ska användas vid dermal behandling. Testkemikalien (t.ex. rent, utspätt eller berett material som innehåller testkemikalien vilken appliceras på huden) ska vara samma (eller ett realistiskt surrogat) som människor eller andra potentiella målarter kan exponeras för. Dosnivån(erna) ska väljas i enlighet med punkterna 20–26 i denna testmetod. Faktorer som kan tas i övervägande i dermalt dosval inkluderar förväntad mänsklig exponering och/eller doser vid vilka toxicitet observerades i andra dermala toxicitetsstudier. Den dermala dosen(erna) bör upplösas, om nödvändigt, i en lämplig vehikel och appliceras i en tillräcklig volym för att leverera de doserna. Strax före testet ska pälsen klippas på ryggdelen på försöksdjurens bål. Rakning kan användas, men det bör göras cirka 24 timmar före testet. Vid klippning eller räkning av pälsen ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas, vilket kan ändra dess genomtränglighet. Cirka 10 % av kroppsytan bör göras ren för applicering av testkemikalien. Vid mycket toxiska kemikalier kan den yta som täcks vara mindre än 10 %, men en så stor del av området som möjligt ska täckas med en tunn och jämn film. Samma behandling av ytan ska användas för alla dermala testgrupper. De doserade områdena ska skyddas med lämpligt skydd som sitter på plats. Djuren bör inhysas separat.

75. En dermal tvättstudie bör genomföras för att bedöma mängden applicerad dos av testkemikalien som kan avlägsnas från huden genom tvättning av den behandlade huden med en mild tvål och vatten. Denna studie kan också ge stöd i upprättandet av massbalans när testkemikalien administreras via huden. För denna dermala tvättstudie bör en engångsdos av testkemikalien appliceras på två djur. Val av dosnivå är i enlighet med punkt 23 i denna testmetod (se även punkt 76 för diskussion om hudkontakttid). Mängderna av testkemikalien som återvunnits i tvättarna bör fastställas för att bedöma effektiviteten vid borttagningen av testkemikalien genom tvättproceduren.

76. Såvida den inte hindras av korrosionsverkan bör testkemikalien appliceras och hållas på huden i minst 6 timmar. Vid tidpunkten för borttagandet av skyddet bör det behandlade området tvättas enligt förfarandet i den dermala tvättstudien (se punkt 75). Både skyddet och tvättarna ska analyseras för kvarvarande testkemikalie. Vid studiens upphörande ska varje djur avlivas skonsamt i enlighet med (2) och den behandlade huden ska avlägsnas. En lämplig del av behandlad hud ska analyseras för att bestämma kvarvarande testkemikalie (radioaktivitet).

77. För toxikokinetisk bedömning av läkemedel kan olika förfaranden i enlighet med lämpligt regelverk behövas.

▼M4

Inhalation

78. En engångskoncentration (eller mer vid behov) av testkemikalien bör användas. Koncentrationen(erna) ska väljas i enlighet med punkterna 20–26 i denna testmetod. Inhalationsbehandlingar ska utföras med hjälp av utrustning för ”noskon” eller ”enbart huvud” för att förhindra absorption genom alternativa vägar för exponering (8). Om andra villkor för inhalationsexponering används bör motiveringen för ändringen dokumenteras. Varaktigheten av exponering genom inhalation bör definieras, normalt är exponeringen 4–6 timmar.

LITTERATUR

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

(6) Kapitel B.45 i denna bilaga, hudabsorption: in vitro-metod.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO (2009) 28, OECD, Paris.

(9) Kapitel B.44 i denna bilaga, hudabsorption: in vivo-metod.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Tillägg

DEFINITIONER

Absorption: Process(er) med upptag av kemikalier i eller genom vävnader. Absorption avser moderföreningen och alla dess metaboliter. Inte att förväxla med ”biotillgänglighet”.

Ackumulering (Bioackumulering): Ökning av mängden testkemikalie över tid i vävnader (vanligtvis fettvävnader, efter upprepad dosering); om tillförseln av en testkemikalie i kroppen är större än den hastighet med vilken den elimineras, ackumulerar organismen testkemikalien och toxiska koncentrationer av testkemikalien kan uppnås.

ADME: Förkortning för absorption, distribution, metabolism och exkretion.

AUC: (arean under plasmakoncentration-tid-kurvan): Arean under kurvan i ett diagram för koncentrationen av testkemikalien i plasma över tiden. Den representerar den totala mängden testkemikalie som absorberas av kroppen inom en förutbestämd tidsperiod. Vid linjära förhållanden är AUC (från tiden noll till oändligheten) proportionell mot den totala mängden av en testkemikalie som absorberas av kroppen, oavsett graden av absorption.

Autoradiografi (helkropps-autoradiografi): Används för att avgöra kvalitativ och/eller kvantitativ vävnadslokalisering av en radioaktiv testkemikalie. Denna teknik använder röntgenfilm eller på senare tid digital fosforimaging för att visualisera radioaktivt märkta molekyler eller fragment av molekyler genom att registrera strålningen som emitteras i det objekt som studeras. Kvantitativ helkropps-autoradiografi kan, jämfört med organdissektion, ha vissa fördelar för utvärdering av testkemikaliens distribution och bedömningen av den totala återvinningen och upplösningen av radioaktivt material i vävnader. En betydande fördel är, till exempel, att den kan användas för en pigmenterad djurmodell för att utvärdera eventuell association av testkemikalien med melanin, som kan binda vissa molekyler. Medan det kan ge bekväma helkroppsöversikter av bindningsställen med hög kapacitet-låg affinitet, kan denna teknik dock vara begränsad i att känna igen specifika målställen såsom receptor-bindningsställen där relativ hög upplösning och hög känslighet behövs för detektering. När autoradiografi används bör försöket som syftar till att bestämma massbalansen för den administrerade föreningen utföras som en separat grupp eller i en separat studie från vävnadsfördelningsförsöket, där alla exkret (vilket även kan inkludera utandningsluft) och hela kroppen homogeniseras och analyseras genom vätskescintillationsräkning.

Gallexkretion: Exkretion via gallgångarna.

Bioackumulering: Se ”ackumulering”.

Biotillgänglighet: Fraktion av en administrerad dos som når det stora kretsloppet eller görs tillgänglig på platsen för fysiologisk aktivitet. Normalt refererar testkemikaliens biotillgänglighet till modersubstansen, men skulle kunna hänvisa till dess metabolit. Den anses endast ha en kemisk form. *Observera*: Biotillgänglighet och absorption är inte detsamma. Skillnaden mellan t.ex. oral absorption (dvs. närvaron i tarmväggen och portal cirkulation) och biotillgänglighet (dvs. närvaron i systemblod och i vävnader) kan uppstå från kemisk nedbrytning på grund av metabolism i tarmväggen eller utflödestransport tillbaka till lumen i magsäcken eller presystemisk metabolism i levern, bland andra faktorer (10). Biotillgängligheten för den toxiska komponenten (modersubstans eller en metabolit) är en kritisk parameter i riskbedömningen för människor (hög till lågdos-extrapolering, väg till extrapolering) för härledning av ett internt värde från externa NOAEL eller BMD (tillämpad dos). Det är den orala absorptionen som räcker för leverpåverkan vid oral administrering. Dock för varje påverkan annat än vid portalen för inträde, är det biotillgängligheten som i allmänhet är en mer pålitlig parameter för vidare användning i riskbedömningen, inte absorptionen.

▼M4

Biopersistens: Se ”persistens”.

Biotransformation: (Vanligtvis enzymatisk) kemisk omvandling av testkemikalien av intresse, till en annan kemikalie i kroppen. Synonymt med metabolism.

C_{max}: Antingen maximal (toppvärde) koncentration i blodet (plasma/serum) efter administrering eller maximal (toppvärde) utsöndring (i urin eller avföring) efter administrering.

Nedbrytningshastighet: Kvantitativt mått på den hastighet vid vilken testkemikalien förs bort från blodet, plasman eller en viss vävnad per tidsenhet.

Kammare: Strukturell eller biokemisk del (eller enhet) av ett organ, vävnad eller cell, som är skild från resten.

Avgiftningsvägar: Serier av steg som leder till eliminering av toxiska kemikalier från kroppen, antingen genom metabolisk förändring eller exkretion.

Distribution: Spridning av en testkemikalie och dess derivat i en organism.

Enzymer/isozymer: Proteiner som katalyserar kemiska reaktioner. Isozymer är enzymer som katalyserar liknande kemiska reaktioner men skiljer sig i sin aminosyresekvens.

Enzymatiska parametrar: K_m: Michaelis konstant och V_{max}: maximal hastighet.

Exkretion: Process(er) genom vilken en administrerad testkemikalie och/eller dess metaboliter avlägsnas från kroppen.

Exogent: Införd från eller producerad utanför organismen eller systemet.

Extrapolering: Slutledning av en eller flera okända värden på grundval av det som är känt eller har observerats.

Halveringstid ($t_{1/2}$): Den tid det tar för koncentrationen av testkemikalien att minska med hälften i en kammare. Den refererar normalt till plasmakoncentrationen av testkemikalien i hela kroppen.

Induktion/enzyminduktion: Enzymsyntes som svar på en miljömässig stimulans eller en inducermolekyl.

Linjäritet/linjär kinetik: En process är linjär med avseende på kinetik när alla överföringshastigheter mellan kammare står i proportion till de mängder eller koncentrationer som är närvarande dvs. första ordningen. Följaktligen är nedbrytnings- och distributionsvolymerna konstanta såväl som halveringstiderna. De uppnådda koncentrationerna är proportionella med doseringshastigheten (exponering), och ackumuleringen är lättare förutsägbar. Linjäritet/icke-linjäritet kan bedömas genom att jämföra relevanta parametrar t.ex. AUC efter olika doser eller efter engångsexponering och upprepad exponering. Avsaknad av dosberoende kan vara tecken på mättnad av enzymer involverade i metabolismen i föreningen, en ökning av AUC efter upprepad exponering jämfört med engångsexponering kan vara tecken på inhibering av metabolismen, och en minskning av AUC kan vara en indikation på induktion av metabolismen (se även (11))

Massbalans: Redovisning av när testkemikalien inträder i och lämnar systemet.

▼M4

Materialbalans: Se massbalans.

Toxicitetsmekanism (sätt)/verkningsmekanism (sätt): Verkningsmekanism avser specifika biokemiska interaktioner genom vilka en testkemikalie alstrar dess effekt. Verkningssätt hänvisar till mer allmänna vägar som leder till en testkemikalies toxicitet.

Metabolism: Synonymt med biotransformering.

Metaboliter: Produkter av metabolism eller metaboliska processer.

Oral absorption: Den procentuella andelen testkemikaliedos absorberad från administreringsstället (dvs. matspjälkningskanalen). Denna kritiska parameter kan användas för att förstå fraktionen av den administrerade testkemikalien som når portvenen och därefter levern.

Partialkoefficient: Även känd som fördelningskoefficienten som är ett mått på den differentiella lösligheten av en kemikalie i två lösningsmedel.

Toppblodnivåer (plasma/serum): Maximal (toppvärde) blodkoncentration (plasma/serum) efter administrering (se även ”C_{max}”).

Persistens (biopersistens): Långsiktig närvaro av en kemikalie (i ett biologiskt system) på grund av resistens mot nedbrytning/eliminering.

Jämförelse: Endpointinformation för en eller flera kemikalier används för att göra en förutsägelse av endpointen för målkemikalien.

Receptormikroskopisk autoradiografi (eller receptor-mikroautoradiografi): Denna teknik kan användas för att sondera xenobiotisk interaktion med specifika vävnadsställen eller cellpopulationer såsom exempelvis för receptorbindning eller specifika verkningssättstudier som kan kräva hög upplösning och hög känslighet, vilket kanske inte är möjligt med andra tekniker såsom helkropps-autoradiografi.

Administreringsväg (oral, intravenös, dermal, inhalation etc.): Avser de sätt vilka kemikalien administreras till kroppen (t.ex. oralt genom sondmatning, oralt genom foder, dermal, genom inhalation, intravenöst etc.).

Mättnad: Tillstånd där en eller flera av de kinetiska processerna (t.ex. absorption, metabolism eller nedbrytning) är vid ett maximum (läs ”mättad”).

Sensitivitet: Möjligheten för en metod eller instrument att diskriminera mellan mätningsresponser som representerar olika nivåer av en variabel av intresse.

Stationärt tillstånd för blodnivåer (plasma): Icke-jämviktstillstånd för ett öppet system där alla krafter som verkar på systemet exakt balanseras av motsatta krafter, på ett sådant sätt att alla dess komponenter är stationära i koncentrationen även om materia flödar genom systemet.

Systemmodellering (fysiologiskt baserad toxikokinetik, farmakokinetiskt baserad, fysiologiskt baserad farmakokinetisk, biologiskt baserad etc.): Abstrakt modell som använder matematiskt språk för att beskriva ett systems beteende.

Målvävnad: Vävnad i vilken en huvudsaklig skadlig effekt av ett gift manifisteras.

▼M4

Testkemikalie: Alla kemikalier eller blandningar som testas med denna testmetod.

Vävnadsfördelning: Reversibel rörelse av en testkemikalie från en plats i kroppen till en annan. Vävnadsfördelning kan studeras genom organdissekering, homogenisering, förbränning och vätskescintillationsräkning eller genom kvalitativ och/eller kvantitativ helkropps-autoradiografi. Den förstnämnda är användbar för att uppnå koncentration och procentandel av återvinning från vävnader och återstående kropp av samma djur, men kan sakna upplösning för alla vävnader och kan ha mindre än idealisk total återvinning (< 90 %). Se definition av den senare ovan.

$\mathbf{T_{max}}$: Tid för att nå C_{max}.

Toxikokinetik (farmakokinetik): Studie av absorptionen, distributionen, metabolismen och exkretionen av kemikalier över tiden.

Validering av modeller: Processen för att bedöma lämpligheten av en modell för att konsekvent beskriva tillgängliga toxikokinetiska data. Modellerna kan utvärderas via statistisk och visuell jämförelse av modellprognoser med experimentella värden mot en gemensam oberoende variabel (t.ex. tid). Omfattningen av utvärderingen bör motiveras i förhållande till den avsedda användningen av modellen.

▼B

B.37 FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR TILL FÖLJD AV AKUT EXPONERING

1. METOD

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av ämnens toxiska effekter är det viktigt att beakta potentialen hos substanser i vissa ämnesgrupper att framkalla specifika typer av neurotoxicitet som kanske inte upptäcks vid andra toxicitetsundersökningar. Det har observerats att vissa organiska fosforföreningar framkallar fördröjd neurotoxicitet och dessa ska beaktas för eventuell utvärdering.

Screening-tester *in vitro* får tillämpas för att identifiera de ämnen som kan framkalla fördröjd polyneuropati; negativa resultat från *in vitro*-undersökningar bevisar dock inte att testsubstansen inte skulle vara neurotoxisk.

Se Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Organiska fosforföreningar omfattar icke joniserande organiska fosforestar, tioestrar eller anhydrider av organofosfor-, organofosforo- eller organofosforamidsyror eller av besläktade fosfonthio-, fosforthio- eller fosforthioamidsyror eller andra ämnen som kan framkalla sådan fördröjd neurotoxicitet som ibland observeras i denna ämnesgrupp.

Fördröjd neurotoxicitet är ett syndrom som förknippas med förlängd fördröjd debut för ataxi, distala axonopatier i ryggmärgen och perifera nerver samt hämmande och åldrande av neurotoxiskt esteras (NTE) i nervvävnad.

1.3 REFERENSÄMNEN

Ett referensämne ska testas i en positiv kontrollgrupp för att påvisa att den testade artens respons inte ändras väsentligt under försöksförhållandena i laboratoriet.

Ett exempel på en mycket använd neurotoxisk substans är trio-tolylfosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-namn: fosforsyra, tris(2-metyl-fenyl)ester), även kallad tris-o-kresylfosfat.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testsubstansen tillförs oralt i en enda dos till tamhöns som i tilllämpliga fall skyddats från akuta kolinerga effekter. Djuren observeras under 21 dagar i fråga om beteendestörningar, ataxi och förlamning. Biokemiska mätningar, särskilt inhibition av neurotoxiskt esteras (NTE) utförs på höns som väljs slumpvis ur varje grupp, normalt 24–48 timmar efter doseringen. 21 dagar efter exponeringen avlivas resterande höns och en histopatologisk undersökning av valda nervvävnader genomförs.

▼B

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Förberedelse**

Friska unga vuxna höns som inte får medicin och som inte har virussjukdomar eller gångdefekter ska väljas slumpmässigt till behandlings- respektive kontrollgrupper och acklimatiseras till laboratorieförhållandena under minst fem dagar före undersökningens skalljan.

Burar eller inhängnader som är stora nog att ge hönsen fri rörlighet och som underlättar observation av hönsens gång ska användas.

Dosering av testsubstansen ska normalt ske oralt genom sondmatning, gelatinkapslar eller motsvarande metod. Vätska kan ges outspädd eller löst i en lämplig vehikel som majsolja; fasta ämnen ska om möjligt lösas eftersom stora doser fasta ämnen i gelatinkapslar kanske inte kan absorberas effektivt. I fråga om icke-flytande vehiklar ska vehikelns toxiska egenskaper vara kända; i annat fall ska de bestämmas före försöket.

1.5.2 **Försöksförhållanden**

1.5.2.1 *Försöksdjur*

Unga vuxna värphöns *(Gallus gallus domesticus)* i åldern 8–12 månader rekommenderas. Standardstora arter och stammar ska användas och hönsen ska normalt ha fötts upp under sådana förhållanden att de kunnat röra sig fritt.

1.5.2.2 *Antal och kön*

Utöver behandlingsgruppen ska både en vehikelkontrollgrupp och en positiv kontrollgrupp användas. Vehikelkotrollgruppen ska behandlas på samma sätt som behandlingsgruppen med undantag för att tillförsel av testsubstansen utesluts.

Tillräckligt många höns ska användas i varje grupp för att minst sex fåglar ska kunna avlivas för biokemisk bestämning (tre stycken vid vardera av två tidpunkter) och sex överleva observationsperioden på 21 dagar för patologisk undersökning.

Den positiva kontrollgruppen kan hållas parallellt eller vara en aktuell historisk kontrollgrupp. Den ska omfatta minst sex höns som behandlats med ett välkänt neurotoxiskt ämne som ger fördröjd polyneuropati, tre för biokemisk och tre för patologisk undersökning. Regelbunden uppdatering av historiska data rekommenderas. Nya positiva kontrolldata ska tas fram om någon viktig komponent (t.ex. stam, foder, förvaringsutrymmen) har ändrats av det berörda laboratoriet efter det att det tidigare försöket genomfördes.

▼B

1.5.2.3 *Dosnivåer*

En preliminär undersökning med ett lämpligt antal höns och dosnivågrupper ska utföras för att fastställa vilken nivå som ska användas i huvudundersökningen. En viss dödlighet i den preliminära undersökningen är nödvändig för att fastställa en tillräcklig dos för huvudundersökningen. För att förhindra dödsfall beroende på akuta kolinerga effekter får atropin eller något annat skyddsämne, om vilket det är känt att det inte påverkar fördröjda neurotoxiska responser, användas. En variation av testmetoder får användas för att beräkna den maximala icke-dödliga dosen av testsubstans (se metod B.l*a*). Historiska data om hönsen eller annan toxikologisk information kan också vara till hjälp vid valet av dos.

Testsubstansens dosnivå i huvudundersökningen ska vara den högsta möjliga med beaktande av resultaten från den preliminära undereökningen för dosval och den övre dosgränsen på 2 000 mg/kg kroppsvikt. Eventuella dödsfall ska inte vara fler än att tillräckligt många djur överlever för biokemi (sex stycken) och histologi (sex stycken) efter 21 dagar. Atropin eller andra skyddsämnen, om vilka det är känt att de inte påverkar fördröjda neurotoxiska responser, ska användas för att förhindra dödsfall till följd av akuta kolinerga effekter.

1.5.2.4 *”Limit-test”*

Om ett test vid en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och dag, med användning av de förfaranden som beskrivs för denna metod, inte framkallar några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte är att förvänta på grundval av data från strukturellt besläktade ämnen, kan en undersökning med användning av en högre dos anses överflödig. ”Limit-test” är tillämpligt, med undantag för om exponering på människor påvisar ett behov av att använda en högre dosnivå.

1.5.2.5 *Observationsperiod*

Observationsperioden ska vara 21 dagar.

1.5.3 **Förfarande**

Efter tillförsel av ett skyddsämne för att förhindra dödsfall till följd av akuta kolinerga effekter tillförs testsubstansen som engångsdos.

1.5.3.1 Allmänna observationer

Observationerna ska påskalljas direkt efter exponeringen. Samtliga höns ska observeras noggrant flera gånger under de första två dagarna och därefter minst en gång dagligen under en period på 21 dagar eller fram till planerad avlivning. Alla tecken på toxicitet ska noteras, inbegripet tid för beteendestörningarnas debut, deras typ, allvar och duration. Ataxi ska mätas enligt en ordningsskala pä minst fyra nivåer, och förlamning ska noteras. Minst två gånger per vecka ska de höns som valts ut för patologiska undersökningar tas ut från burarna och underkastas en period av påtvingad motorisk aktivitet, t.ex. klättring på stege, för att underlätta observation av minimala toxiska effekter. Döende djur och djur som lider av svår smärta ska tas bort när detta upptäcks, avlivas skonsamt och obduceras.

▼B

1.5.3.2 Kroppsvikt

Samtliga höns ska vägas just före tillförseln av testsubstansen och därefter minst en gång i veckan.

1.5.3.3 Biokemi

Sex höns väljs slumpvis från var och en av behandlings- respektive vehikelkontrollgrupperna och tre höns från den positiva kontrollgruppen (om denna grupp hålls parallellt.) Hönsen ska avlivas några dagar efter dosering, och hjärnan och lumbala delar av ryggmärgen prepareras och testas i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Därutöver kan det också vara lämpligt att preparera och testa ischiasnerwävnad i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Normalt ska tre fåglar från kontrollgruppen och varje behandlingsgrupp avlivas efter 24 timmar och tre efter 48 timmar, medan de tre hönsen från de positiva kontrollgrupperna ska avlivas efter 24 timmar. Om eventuella kliniska tecken på förgiftning (detta kan ofta bedömas genom observation vid debuten på kolinerga svar) indikerar att det toxiska ämnet kan tas upp mycket långsamt är det bättre att ta vävnadsprov från tre fåglar vid vardera av två tidpunkter mellan 24 och så sent som 72 timmar efter dosering.

Om det bedöms lämpligt kan även analyser av acetylkolinesteras (AChE) utföras på dessa prover. Spontan reaktivering av AChE kan dock uppträda *in vivo* och därmed leda till en underskattning av ämnets potential som AChE-hämmare.

1.5.3.4 Obduktion

Obduktion av samtliga djur (avlivade enligt planen och döende djur som avlivats) ska omfatta observation av hjärnans och ryggmärgens utseende.

1.5.3.5 Histopatologisk undersökning

Nervvävnad från djur som överlevt observationsperioden och som inte används för biokemiska undersökningar ska underkastas mikroskopisk undersökning. Vävnaderna ska fixeras *in situ* med användning av perfusionsteknik. Snitten ska omfatta lillhjärnan (longitudiellt, medialt), förlängda märgen, ryggmärgen och perifera nerver. Ryggradssnitten ska tas från halsområdet, mitten av brösthålan och det lumbosakrala området. Snitt från tibialnervens distala region och dess förgreningar till *musculus gastrocnemius* och ischiasnerven ska tas. Snitten ska färgas med lämplig myelin- och axonspecifik färg.

2. **DATA**

Negativa resultat i fråga om de sluteffekter som valts för denna metod (biokemi, histopatologi och beteendeobservationer) skulle normalt inte kräva ytterligare tester av fördröjd neurotoxicitet. Tvetydiga eller oklara resultat i fråga om dessa sluteffekter kan komma att kräva ytterligare utvärdering.

Individuella data ska anges. Därutöver ska alla data sammanfattas i tabellform som för varje testgrupp visar antalet djur vid försökets skalljan, antalet djur som uppvisar skador, beteendeeffekter eller biokemiska effekter, typen och allvaret av dessa skador eller effekter och procentandelen djur som uppvisar respektive typ och grad av allvar av skada eller effekt.

▼B

Resultaten av denna undersökningen ska utvärderas i fråga om fördelning, allvar och korrelation mellan beteendeeffekter, biokemiska och histopatologiska effekter och eventuellt andra observerade effekter i behandlings- och kontrollgrupperna.

Numeriska resultat ska utvärderas genom lämpliga och allmänt erkända statistiska metoder. De statistiska metoder som används ska väljas vid utformandet av undersökningen.

3. **RAPPORTERING**

FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur

— Använd stam.

— Antal djur och deras ålder.

— Källa, förvaringsförhållanden etc.

— Djurens individuella vikt vid försökets skalljan.

Försöksförbållanden:

— Uppgifter om testsubstansen, stabilitet och homogenitet i tillämpliga fall.

— Motivering av val av vehikel.

— Uppgifter om tillförseln av testsubstansen.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Grund för val av dos.

— Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda mate rialets fysiska form.

— Benämning på och uppgifter om tillförsel av eventuellt skyddsämne.

Resultat:

— Uppgifter om kroppsvikt.

— Uppgifter om toxisk respons per grupp, inbegripet dödsfall.

— De kliniska observationernas art, allvar och duration (reversibilitet ska anges).

— En detaljerad redogörelse för biokemiska metoder och resultat.

— Obduktionsresultat.

— En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska resultat.

— Statistisk bearbetning av resultat i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

Denna metod motsvarar OECD TG 418.

▼B

B.38 **FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR 28 DAGARS UPPREPAD DOSUNDERSÖKNING**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av ämnens toxiska effekter är det viktigt att beakta potentialen hos substanser inom vissa ämnesgrupper att framkalla vissa typer av neurotoxicitet som kanske inte upptäcks vid andra toxicitetsundersökningar. Det har observerats att vissa organiska fosforföreningar framkallar fördröjd neurotoxicitet och dessa ska beaktas för eventuell utvärdering.

Screening-tester *in vitro* får tillämpas för att identifiera de ämnen som kan framkalla fördröjd polyneuropati; negativa resultat från *in vitro*-undersökningar bevisar dock inte att testsubstansen inte skulle vara neurotoxisk.

Denna 28 dagars undersökning av fördröjd neurotoxicitet ger information om de tänkbara hälsorisker som troligen uppstår till följd av upprepad exponering under en begränsad tidsperiod. Den ger information om dosrespons och kan ge en beräkning av en NOAEL-nivå som kan vara användbar för att fastställa säkerhetsföreskrifter om exponering.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Organiska fosforföreningar omfattar icke joniserande organiska fosforestrar, tioestrar eller anhydnder av organofosfor-, organofosforo- eller organofosforamidsyror eller av besläktade fosfonthio-, fosforthio- eller fosforthioamidsyror eller andra ämnen som kan framkalla sådan fördröjd neurotoxitet som ibland observeras i denna ämnesgrupp.

Fördröjd neurotoxicitet är ett syndrom som förknippas med förlängd fördröjd debut för ataxi, di-stala axonopatier i ryggmärgen och perifera nerver samt hämmande och åldrande av neurotoxiskt esteras (NTE) i nervvävnad.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testsubstansen tillförs dagligen oralt till tamhöns under 28 dagar. Djuren observeras minst en gång dagligen i fråga om beteendestörningar, ataxi och förlamning till dess det gått 14 dagar efter den sista dosen. Biokemiska mätningar, särskilt inhibition av neurotoxiskt esteras (NTE) utförs på höns som väljs slumpvis ur varje grupp, normalt 24 – 48 timmar efter doseringen. Två veckor efter den sista dosen avlivas resterande höns och en histopatologisk undersökning av valda neuralvävnader genomförs.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

Friska unga vuxna höns som inte får medicin och som inte har virussjukdomar eller gångdefekter ska väljas slumpmässigt till behandlings- respektive kontrollgrupper och acklimatiseras till laboratorieförhållandena under minst fem dagar före undersökningens skalljan.

Burar eller inhängnader som är stora nog att ge hönsen fri rörlighet och som underlättar observation av hönsens gång ska användas.

Oral dosering ska ske dagligen sju dagar i veckan, helst genom sondmatning eller tillförsel av gelatinkapslar. Vätska kan ges outspädd eller löst i en lämplig vehikel som majsolja; fasta ämnen ska om möjligt lösas eftersom stora doser fasta ämnen i gelatinkapslar kanske inte kan absorberas effektivt. I fråga om icke-flytande vehiklar ska vehikelns toxiska egenskaper vara kända; i annat fall ska de bestämmas före försöket.

1.4.2 **Försöksförhållanden**

1.4.2.1 *Försöksdjur*

Unga vuxna värphöns *(Gallus gallus domesticus)* i åldern 8 – 12 månader rekommenderas. Standardstora arter och stammar ska användas och hönsen ska normalt ha fötts upp under sådana förhållanden att de kunnat röra sig fritt.

1.4.2.2 *Antal och kön*

Vanligen bör minst tre behandlingsgrupper och en vehikelkontrollgrupp användas. Vehikelkontrollgruppen ska behandlas på samma sätt som behandlingsgruppen med undantag för att tillförsel av testsubstansen utesluts.

Tillräckligt många höns ska användas i varje grupp för att minst sex fåglar ska kunna avlivas för biokemisk bestämning (tre stycken vid vardera två tidpunkter) och sex överleva en 14 dagar lång observationsperiod efter behandlingen för patologisk undersökning.

1.4.2.3 *Dosnivåer*

Dosnivåerna ska väljas med beaktande av resultaten från ett akut test av fördröjd neurotoxicitet eller andra befintliga toxicitets- eller kinetiska data som finns tillgängliga i fråga om testsubstansen. Den högsta dosnivån ska väljas i syfte att inducera toxiska effekter, helst fördröjd toxicitet, men inte dödsfall eller svårt lidande. Därefter ska dosnivåer fastställas i en fallande skala i syfte att påvisa eventuella dos-responssamband och NOAEI. vid den lägsta dosnivån.

▼B

1.4.2.4 *”Limit-test”*

Om ett test vid en dosnivå på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag, med användning av de förfaranden som beskrivs för denna undersökning, inte framkallar några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte är att förvänta på grundval av data om strukturellt besläktade ämnen kan en undersökning med en högre dos anses överflödig. ”Limit-test” är tillämpligt, med undantag för om exponering på människor indikerar att det finns behov av att använda en högre dosnivå.

1.4.2.5 *Observationsperiod*

Samtliga djur ska observeras minst en gång dagligen under exponeringsperioden och därefter under 14 dagar, med undantag för planerad dissektion.

1.4.3 **Förfarande**

Djuren doseras med testsubstansen sju dagar i veckan under en period på 28 dagar.

1.4.3.1 *Allmänna observationer*

Observationerna ska påskalljas direkt efter exponeringen. Samtliga höns ska observeras minst en gång dagligen under de 28 behandlingsdagarna och under minst 14 dagar efter dosering eller fram till planerad avlivning. Alla tecken på toxicitet ska noteras, inbegripet tid för beteendestörningarnas debut, deras typ, allvar och duration. Observationerna ska omfatta, men inte begränsas till, beteendeavvikelser. Ataxi ska mätas enligt en ordningsskala på minst fyra nivåer, och förlamning ska noteras. Minst två gånger per vecka ska hönsen tas ut från burarna och underkastas en period av påtvingad motorisk aktivitet, t.ex. klättring på stege, för att underlätta observation av minimala toxiska effekter. Döende djur och djur som lider av svår smärta ska tas bort när detta upptäcks, avlivas skonsamt och obduceras.

1.4.3.2 *Kroppsvikt*

Samtliga höns ska vägas just före tillförseln av testsubstansen och därefter minst en gång i veckan.

1.4.3.3 *Biokemi*

Sex höns väljs slumpvis från var och en av behandlings- respektive vehikelkontrollgrupperna och avlivas några dagar efter doseringen, och hjärnan och lumbala delar av ryggmärgen prepareras och testas i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Därutöver kan det också vara lämpligt att preparera och testa ischiasnervvävnad i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Normalt ska tre fåglar från kontrollgruppen och var och en av behandlingsgrupperna avlivas efter 24 timmar och tre 48 timmar efter den sista doseringen. Om data från den akuta undersökningen eller andra undersökningar (t.ex. toxikokinetik) indikerar att andra tidpunkter för avlivning är att föredra efter slutdosering så ska dessa tidpunkter tillämpas och grunden för detta dokumenteras.

Om det bedöms lämpligt kan även analyser av acetylkolinesteras (AChE) utföras på dessa prover. Spontan reaktivering av AChE kan dock uppträda *in vivo* och därmed leda till en underskattning av ämnets potential som AChE-hämmare.

▼B

1.4.3.4 *Obduktion*

Obduktion av samtliga djur (avlivade enligt planen och döende djur som avlivats) ska omfatta observation av hjärnans och ryggmärgens utseende.

1.4.3.5 *Histopatologisk undersökning*

Nervvävnad från djur som överlevt observationsperioden och som inte används för biokemiska undersökningar ska underkastas mikroskopisk undersökning. Vävnaderna ska fixeras *in situ* med användning av perfusionsteknik. Snitten ska omfatta lillhjärnan (longitudiellt, medialt), förlängda märgen, ryggmärgen och perifera nerver. Ryggradssnitten ska tas från halsområdet, mitten av brösthålan och det lumbosakrala området. Snitt från tibialnervens distala region och dess förgreningar till *musculus gastrocnemius* och ischiasnerven ska tas. Snitten ska färgas med lämplig myelin- och axonspecifik färg. Inledningsvis ska mikroskopundersökning utföras på de bevarade vävnaderna av samtliga djur i kontroll- respektive högdosgruppen. Om det finns bevis på effekter i högdosgruppen ska mikroskopundersökning även utföras på hönsen från mellan- och lågdos-grupperna.

2. **DATA**

Negativa resultat i fråga om de sluteffekter som valts för denna metod (biokemi, histopatologi och beteendeobservationer) skulle normalt inte kräva ytterligare tester av fördröjd neurotoxicitet. Tvetydiga eller oklara resultat i fråga om dessa sluteffekter kan komma att kräva ytterligare utvärdering.

Individuella data ska anges. Därutöver ska alla data sammanfattas i tabellform som för varje testgrupp visar antalet djur vid försökets skalljan, antalet djur som uppvisar skador, beteendeeffek-tcr eller biokemiska effekter, typen och allvaret av dessa skador eller effekter och procentandelen djur som uppvisar respektive typ och grad av allvar av skada eller effekt.

Resultaten av denna undersökning ska utvärderas i fråga om fördelning, allvar och korrelation mellan beteendeeffekter, biokemiska och histopatologiska effekter och eventuellt andra observerade effekter i behandlings- och kontrollgrupperna.

Numeriska resultat ska utvärderas genom lämpliga och allmänt erkända statistiska metoder. De statistiska metoder som används ska väljas vid utformandet av undersökningen.

3. **RAPPORTERING**

FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten skal! om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur

— Använd stam.

— Antal djur och deras ålder.

— Källa, förvaringsförhållanden etc.

— Djurens individuella vikt vid försökets skalljan.

▼B

Försöksförhållanden:

— Uppgifter om testsubstansen, stabilitet och homogenitet i tillämpliga fall.

— Motivering för val av vehikel.

— Uppgifter om tillförseln av testsubstansen.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Grund för val av dos.

— Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda mate rialets fysiska form.

— Grund för att välja andra tidpunkter för biokemisk bestämning om de inte motsvarar 24 re spektive 48 timmar.

Resultat:

— Uppgifter om kroppsvikt.

— Uppgifter om toxisk respons per grupp, inbegripet dödsfall.

— Nivå för no-observed adverse effect.

— De kliniska observationernas art, allvar och duration (reversibilitet ska anges).

— En detaljerad redogörelse för biokemiska metoder och resultat.

— Obduktionsresultat.

— En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska resultat.

— Statistisk bearbetning av resultat i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

HÄNVISNINGAR

Denna metod motsvarar OECD TG 419.

▼B

B.39 TEST AV REPARATIONSSYNTES (UDS) HOS LEVERCELLER FRÅN DÄGGDJUR IN-VIVO

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 486, Test av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur *in vivo* (Unscheduled DNA Synthesys (UDS) Test with Mammalian Liver Celler *in Vivo* (1997)).

1.1 INLEDNING

Ändamålet med testet av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur in *vivo* är att identifiera testsubstanscr som inducerar DNA-reparation i leverceller från behandlade försöksdjur (se (1) (2) (3) (4).

Detta in vivo-test erbjuder en metod för undersökning av genotoxiska effekter av kemikaler i levern. Slutpunktsmätning är indikativt för DNA-skador och påföljande reparation i leverceller. Levern är vanligen det huvudsakliga sätet för metabolismen av absorberade ämnen. Det är således ett lämpligt säte för att mäta DNA-skador *in vivo.*

Om det finns bevis för att testsubstansen inte kommer att nå målvävnaden är det inte lämpligt att använda detta test.

Reparationssyntesens slutpunkt mäts genom att bestämma upptaget av märkta nukleosider i celler som inte undergår reguljär DNA syntes (S-fas). Den teknik som är den mest använda är bestämning av upptag av triti-ummärkt tymidin (H-TdR) med hjälp av autoradiografi. Råttlever används med fördel för UDS-tester *in vivo.* Andra vävnader än lever kan användas, men omfattas inte av denna metod.

Detektionen av ett UDS-svar är beroende av antalet DNA-baser som ”klipps bort” och byts ut vid platsen för skadan. UDS-testet är därför särskilt värdefullt för att detektera substansinducerad ”longpatch”-reparation (20–30 baser). ”Shortpatch”-reparation (1–3 baser) detekteras däremot med mycket lägre känslighet. Vidare kan mutagena händelser inträffa på grund av utebliven reparation, felreparation eller felreplikation av DNA-skador. Omfattningen av UDS-svaret ger ingen indikation på noggrannheten i reparationsprocessen. Dessutom är det möjligt att ett mutagen reagerar med DNA men att DNA-skadan inte repareras via en reparationsprocess där DNA-baser ”klipps bort” och byts ut. Bristen på specifik information rörande mutagen aktivitet, erhållen genom UDS-testet, kompenseras för genom dess potentiella känslighet, eftersom den mäts i hela genomet.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

celler som repareras: ett nettoantal korn i kärnan (net nuclear grain, NNG) som är större än ett förvalt värde, vilket ska verifieras av det laboratorium som utför testet.

nettoantal korn i kärnan (NNG): kvantitativ mätning av UDS-aktivitet hos celler i autoradiografiska UDS-tester, beräknade genom att subtrahera medelantalet av de cytoplasmiska kornen i kärnekvivalenta cytoplasmiska områden (CG) från antalet korn i kärnan (nuclear grains, NG): NNG = NG-CG. NNG-räkningar beräknas för individuella celler och slås sedan samman för celler i en kultur, i parallella kulturer, etc.

▼B

reparationssyntes (UDS): DNA-reparationssyntes efter 'bortklippning' och avlägsnande av en DNA-sträng som innehåller ett avsnitt med skador inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen. (UDS)

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

UDS-testet med leverceller från däggdjur *in* vivo indikerar DNA-reparationssyntes efter "bortklippning" och avlägsnande av en sträng med DNA innehållande ett avsnitt med skador, vilka inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen. Testet baseras i vanliga fall på en inkorporering av ^{3}H-TdR i DNA hos leverceller, vilka har en låg frekvens av celler som befinner sig i cellcykelns S-fas. Upptaget av ^{3}H-TdR bestäms vanligen genom autoradiografi. eftersom denna teknik inte ar sä mottaglig för interferens från celler i S-fas som, t.ex. vätske-scintillationsräkning

1.4 BESKRIVNING AV METODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Vanligen används råttor men det går även bra att använda ett annat lämpligt däggdjur. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna försöksdjur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen ska påbörjas, är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten möjligt och den bör inte överstiga ±20 % av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga och vuxna försöksdjur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren ska ha en unik identifiering och hållas i sina burar under minst fem dagar innan undersökningen börjar, för att göra det möjligt för dem att acklimatiseras till förhållandena i laboratoriet.

1.4.1.4 *Berdninq av testsubstansen*

Testsubstanser i fast form bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till försöksdjuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller så späds de ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabelt.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lölsningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

▼B

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå i varje oberoende utförd del av experimentet. Förutom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör utgöras av substanser som är kända för att ge UDS när de administreras vid exponeringsnivåer som kan förväntas att ge en detekterbar ökning jämfört med bakgrunden. Positiva kontroller som kräver metabolisk aktivering bör användas vid doser som framkallar ett måttligt svar (4). Doserna kan väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men att de inte omedelbart avslöjar identiteten hos kokade utstryksglas för läsaren. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Tider for provtagning	Substans	CA S-nummer	EINECS-nummer
Tidiga provtagningstider (2–4 tim.)	N-Nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Sena provtagningstider (12–16 tim.)	N-2-Fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Andra lämpliga positiva kontrollsubstanser kan används. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Försökdjurens antal och kön**

Ett lämpligt antal försöksdjur bör användas, för att man ska kunna ta hänsyn till den naturliga biologiska variationen hos testresultaten. Antalet försöksdjur bör utgöras av minst tre analyserbara försöksdjur per grupp. Där det finns en signifikant historiks databas som har ackumulerats, krävs det endast ett eller två försöksdjur för de samtidiga negativa och positiva kontrollgrupperna.

Om det vid tiden för undersökningen visar sig att det finns data som är tillgängliga från undersökningar på samma stam och där samma tillförselväg för exponering har använts, samt att dessa visar att det inte finns några betydande skillnader i toxicitet mellan könen, kan testning på endast ett kön, helst på hanar, vara tillräckligt. I de fall där exponering av människa för kemikaler kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

1.5.2 **Behandlingsschema**

Testsubstanser administreras i allmänhet i form av en enstaka behandling.

1.5.3 **Dosnivåer**

Normalt används minst två olika dosnivåer. Den högsta dosen definieras som dos vilken producerar tecken på toxicitet på ett sådant sätt att högre dosnivåer, baserade på en likadan doseringsregim, skulle förväntas leda till letalitet. 1 allmänhet bör den lägre dosen vara 50 % till 25 % av den högre dosen.

▼B

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag med avseende pa de dosbestämmande kriterierna och bör utvärderas från fall till fall. Om en undersökning för att bestämma intervallet utförs på grund av att det inte finns några lämpliga data tillgängliga, bör denna utföras i samma laboratorium, och där man använder samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som i huvudundersökningen.

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken producerar en indikation på toxicitet i levern (t.ex. pyknotiska kärnor).

1.5.4 **Limit-test**

En fullständig undersökning kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i 'limit-testen'.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras vanligen via sondmatning genom att använda en magsond eller en lämplig intubationskanyl. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla, där de kan motiveras. Den intraperitoneala vägen rekommenderas dock inte, eftersom den skulle kunna exponera levern direkt för testsubstansen snarare än via det cirkulatoriska systemet. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror av försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 2 ml/100 g kroppsvikt. Användningen av större volymer måste motiveras. Förutom när det gäller irriterande eller korro-.siva substanser, vilka normalt kommer att avslöja förvarade effekter vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen, så att konstant volym kan säkerställas vid alla dosnivåer.

1.5.6 **Beredning av leverceller**

I normala fall bereds leverceller från behandlade försöksdjur 12–16 timmar efter dosering. Ytterligare en tidig provtagningstidpunkt (normalt 2–4 timmar efter behandlingen) är normalt nödvändig om inte det finns ett tydligt positivt svar efter 12–16 timmar. Alternativa provtagningstidpunkter kan används när det är motiverat utifrån toxikokinetiska data.

Kortvariga kulturer med leverceller från däggdjur startas genom att skölja lever in situ med kollagenas och att låta nyligen dissocierade leverceller fästa sig på en lämplig yta. Leverceller från negativa kontrollförsöksdjur bör ha en viabilitet (5) på minst 50 %.

1.5.7 **Bestämning av UDS**

Nyligen isolerade leverceller från däggdjur inkuberas normalt med ett medium som innehåller ^{3}H-TdR under en tid som är tillräckligt lång, t.ex. 3–8 timmar. När inkubationsperioden går mot sitt slut, bör mediet avlägsnas från cellerna, vilken sedan kan inkuberas i ett medium som innehåller ett överskott på omärkt tymidin för att försvaga oinkorporerad radioaktivitet ('cold chase'). Cellerna tvättas sedan, fixeras och torkas. Vid längre inkubationstider, kan 'cold chase' visa sig vara onödigt. Utstryksglas doppas sedan i en autoradiografisk emulsion, exponeras i mörker (t.ex. nedkylda under 7–14 dagar) framkallas och färgas in, varpå exponerade silverkorn sedan räknas. Två till tre utstryksglas bereds från varje försöksdjur.

▼B

1.5.8 **Analys**

Preparationerna av utstryksglas bör innehålla tillräckligt många celler med normal morfologi för att medge en meningsfull bestämning av UDS. Preparationer undersöks mikroskopiskt efter tecken på uppenbar cytotoxicitct (t.ex. pyknos, reducerade nivåer av radioaktiv märkning).

Utstryksglas bör kodas innan kornen räknas. Normalt påvisas 100 celler från varje försöksdjur från minst två utstryksglas. om mindre än 100 celler/försöksdjur påvisas bör detta motiveras. Vid kornräkningar påvisas inte kärnor i S-fas, men proportionen av celler i S-fas kan registreras.

Mängden av ^{3}H-TdR som inkorporerats i kärnan och cytoplasman hos morfologiskt normala celler, som bevisats av upplagringen av silverkorn, bör bestämmas med hjälp av lämpliga metoder.

Kornräkningar bestäms i kärnorna (nuclear grains, NG) och kärnekvivalenta områden i cytoplasman (cytoplasmic grains, CG). CG-räkningar mäts genom att antingen ta det område av cytoplasman som har den mest omfattande märkningen, eller genom att ta ett medeltal av två eller tre slumpmässiga cytoplasmaräkningar nära kärnan. Andra räknemetoder (t.ex. helcellsräkning) kan användas om de kan motiveras (6).

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella utstryksglas och försöksdjursdata bör tas fram. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform. Räkningar av nettoantalet korn i kärnan (NNG) bör tas fram för varje cell, för varje försöksdjur och för varje dos och tid genom att subtrahera CG-räkningar från NG-räkningar. Om ’celler under reparation’ räknas in, bör kriterierna för definition av ’celler under reparation’ vara motiverade och baserade på historiska eller samtidiga negativa kontrolldata. Numeriska resultat kan utvärderas utifrån statistiska metoder. Om statistiska tester används, bör de selekteras och motiveras innan undersökningen utförs.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Exempel på kriterier för positiva/negativa svar innefattar:

positiva	i)	NNG-värden över ett förvalt tröskelvärde som är motiverat på basis av historiska laboratoriedata
eller	ii)	NNG-värden som är signifikant större än den samtidiga kontrollen
negativa	i)	NNG-värden inom/under det historiska kontrolltröskelvärdet
eller	ii)	NNG-värden som inte är signifikant större än den samtidiga kontrollen

▼B

Den biologiska relevansen hos registrerade data bör uppmärksammas: d.v.s. parameter såsom variationer mellan olika försöksdjur, dos/respons-förhållanden och cytotoxicitetet bör också beaktas. Statistiska metoder kan användas såsom en hjälp vid utvärderingen av testresultaten. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Ett positivt resultat från UDS-testet på leverceller från däggdjur *in vivo* indikerar att testsubstansen inducerar DNA-skador i leverceller från däggdjur in vivo, vilka kan repareras av reparartionssyntes in vitro. Ett negativt resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar skador på DNA som är detekterbara med hjälp av detta test.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter ska nå ut i det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering för valet av vehikel

— testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedel/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

— art/stam som används

— försöksdjurens antal, ålder och kön

— ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.

— individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

— positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel)

— data från en undersökning av spännvidden, om en sådan har utförts

— grund för valet av dosnivå

— uppgifter om beredningen av testsubstansen

— uppgifter om administreringen av testsubstansen

— grund för det sätt administreringen sker på

— metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tilllämpbart

▼B

— omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämpbart

— uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet

— detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman

— metoder för matning av toxicitet

— metod för beredning och odling av leverceller

— den autoradiografiska teknik som använts

— antalet utstryksglas som preparerats och antalet celler som påvisats

— kriterier för utvärdering

— kriterier för att bedöma om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

— individuella utstryksglas, försöksdjurs- och gruppmedelvärden för antalet korn i kärnan, cytoplasmiska korn, och nettoantalet korn i kärnan (NNG)

— dos/respons-förhållande, om detta är tillgängligt

— statistisk utvärdering, om en sådan utförts

— tecken på toxicitet

— samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata

— historiska negativa och positiva kontrolldata (lösningsmedel/vehikel) med intervall, medelvärden och stan dardavvikelser

— antalet ”celler under reparation”, om detta har fastställts

— antalet celler i S-fas, om detta har bestämts

— cellernas viabilitet

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlison, B. and Penman, M. G. (1985). An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.,* 156, s. 1–18.

2. Buttervvorth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the In *Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation *Res.,* 189, s. 123–133.

3. Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlison, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay, in Kirkland D. J. and Fox M., (eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommitee on Guidelines for Mutagenicity Testing.* Report *Part II revised.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney s. 52–77.

▼B

4. Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Herner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and *In Vivo.* Mutation Res., 312, s. 263–285.

5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assesment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isoladet Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/ln Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, s. 21–27.

6. Mirsalis,). C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/ln Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen,* 4, s. 553–562.

▼B

B.40 *IN VITRO-TEST* AV HUDKORROSIVITET: BESTÄMNING AV TRANSKUTANT ELEKTRISKT MOTSTÅND (TER)

1. METOD

Denna testmetod motsvarar OECD TG 430 (2004).

1.1 INLEDNING

Hudkorrosivitet innebär att en irreversibel vävnadsskada uppstår i huden som en följd av att ett testmaterial [definierat enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS)] (1) appliceras. Denna metod bygger på ett förfarande som innebär att testmaterialets hudkorrosivitet inte testas på levande djur.

Bedömning av hudkorrosiviteten har normalt inneburit användning av försöksdjur (2). På grund av den smärta och det lidande som försöksdjuren utsätts för har översynen av testmetod B.4 gjorts på ett sådant sätt att bedömningen av hudkorrosiviteten går att göra med alternativa metoder *in vitro,* så att försöksdjur inte längre behöver användas.

Ett första steg mot att definiera alternativa testmetoder som kunde användas för testning av hudkorrosiviteten var att genomföra förvalideringsstudier (3). Efter detta gjordes en formell valideringsstudie (6)(7)(8) av *in* vitro-metoder för att bedöma hudkorrosiviteten (4)(5). Utfallet av dessa studier sammantaget med annan publicerad litteratur ledde till rekommendationen att följande tester skulle användas för bedömning av hudkorrosiviteten *in vivo* (9)(10)(1 1): ett test där en modell av human hud används (se testmetod B.40b) och bestämning av transkutant elektriskt motstånd (denna metod).

Från en valideringsstudie och andra publicerade studier rapporteras att prövningen av transkutant elektriskt motstånd (TER) på råtthud (12)(13) kan användas för en tillförlitlig särskiljning mellan ämnen som är kända för att vara hudkorrosiva och kända icke-korrosiva ämnen (5)(9).

Testet enligt denna metod gör det möjligt att identifiera kemikalier och blandningar som är hudkorrosiva. Dessutom gör testet det möjligt att identifiera icke hudkorrosiva ämnen och blandningar med stöd av annan befintlig information (t.ex. pH, förhållandet mellan struktur och aktivitet, data som gäller människor och/eller djur) (1)(2)(11)(14). Testet ger ingen information om hudirritation, inte heller ger det möjlighet till den underklassificering som är möjlig enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1).

För en fullständig utvärdering av lokala hudeffekter efter en enda hudexponering rekommenderas den sekventiella teststrategi som finns som tillägg till testmetod B.4 (2) och som anges i det internationella systemet för klassificering och märkning (1). Denna teststrategi inbegriper *in vitro-tester* av hudkorrosivitet (enligt den häri beskrivna metoden) och hudirritation innan tester på levande djur övervägs.

▼B

1.2 DEFINITION

Hudkorrosivitet *in vivo:* innebär att en irreversibel skada uppstår i huden, det vill säga synlig nekros genom epidermis och ner i dermis efter att ett testämne har applicerats och fått verka i upp till fyra timmar. Korrosiva reaktioner kännetecknas av sår, blödning, blodiga sårskorpor och i slutet av observationsperioden på 14 dagar av missfärgning på grund av blekning av huden, håravfall på hela hudområden och ärrbildning. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Transkutant elektriskt motstånd (TER): är ett mått på hudens elektriska impedans, uttryckt i kΩ. Det är en enkel och robust metod för att bedöma hudens barriärfunktion genom att registrera jonflödet genom huden med en Wheatstonebrygga.

1.3 REFERENSÄMNEN

Tabell 1

Referenskemikalier

Namn	EINECS-nr	CAS-nr	
1,2-Diaminopropan	201-155-9	78-90-0	Starkt korrosivt
Akrylsyra	201-177-9	79-10-7	Starkt korrosivt
2-tert-butylfenol	201-807-2	88-18-6	Korrosivt
Kaliumhydroxid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrosivt
Svavelsyra (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrosivt
Oktansyra (kaprylsyra)	204-677-5	124-07-02	Korrosivt
4-Amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	Icke-korrosivt
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Icke-korrosivt
Fenetylbromid	203-130-8	103-63-9	Icke-korrosivt
Tetrakloretylen	204-825-9	27-18-4	Icke-korrosivt
Isostearinsyra	250-178-0	30399-84-9	Icke-korrosivt
4-(Metyltio)-bensaldehyd	222-365-7	3446-89-7	Icke-korrosivt

De flesta av kemikalierna i förteckningen har tagits från den förteckning över kemikalier som valdes för den internationella valideringsstudien ECVAM (4). Urvalet bygger på följande kriterier:

i) Lika många korrosiva som icke-korrosiva ämnen.

▼B

ii) Kommersiellt tillgängliga ämnen som täcker in de flesta relevanta kemiskalieklasser.

iii) Medtagande av såväl starkt korrosiva som mindre korrosiva ämnen för att göra det möjligt att särskilja ämnen på grundval av deras hudkorrosivitet.

iv) Val av kemikalier som kan hanteras i ett laboratorium utan att utgöra någon annan allvarlig risk utöver hudkorrosiviteten.

1.4 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet appliceras och får verka i upp till 24 timmar på den epidermala ytan av hudbitar i ett testsystem med två kammare där hudbitarna fungerar som skiljemembran mellan kamrarna. Hudbitarna tas från humant avlivade, 28-30 dagar gamla råttor. Korrosivt material identifieras genom sin förmåga att framkalla skador på hudens hornlager och störningar i den normala barriärfunktionen, vilket kan fastställas som en sänkning av det transkutana elektriska motståndet (TER) under ett tröskelvärde (12). För TER för råtthud har ett brytvärde på 5 kΩ valts, baserat på omfattande data för ett brett urval av kemikalier där den absoluta majoriteten av värden antingen låg klart över (ofta > 10 kΩ) eller klart under (ofta < 3 kΩ) detta värde (12). I allmänhet sänker material som inte har någon korrosiv verkan på djur inte TER under detta brytvärde, oavsett om de är hudirriterande eller inte. Vidare kan användning av andra hudberedningar eller annan utrustning ändra brytvärdet, vilket kräver ytterligare validering.

Ett färgämnesbindningssteg ingår i testförfarandet för verifiering av positiva resultat vid TER-värden runt 5 kΩ. Färgämnesbindningssteget visar om ökningen av jongenomsläpplighet beror på fysisk nedbrytning av hornlagret. TER-metoden med råtthud har visats ge förutsägbarhet för korrosiv verkan *in vivo* på kanin, fastställd med testmetod B.4 (2). Det ska påpekas att *in* vivo-kanintestet är mycket konservativt med avseende på hudkorrosiv verkan och hudirritation jämfört med lapptest på mänsklig hud (15).

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Djur**

Råtta är den föredragna arten eftersom råttors hudkänslighet för kemikalier i detta test har visats tidigare (10). Åldern (då huden tas till vara) och råttstammen är av särskild betydelse för att säkerställa att hårsäckarna är i vilofas innan den vuxna hårtillväxten börjar.

▼B

Rygg- och flankhår från unga, ungefär 22 dagar gamla han- eller honråttor (erhållna från Wistar eller en jämförbar stam) avlägsnas noggrant med en liten sax. Därefter tvättas djuren noga och torkas sedan omsorgsfullt medan det klippta området hålls ner i antibiotikalösning (som innehåller t.ex. streptomycin, penicillin, kloramfenikol och amfotericin, i koncentrationer som hämmar bakterietillväxt). Djuren tvättas på nytt med antibiotika på tredje eller fjärde dagen efter den första tvätten och används inom 3 dagar från den andra tvätten, då hornlagret har återhämtat sig från hårborttagningen.

1.5.2 **Beredning av hudbitar**

Djuren avlivas med en human metod när de är 28-30 dagar gamla. Åldern är av stor betydelse. Huden från rygg och flank från varje djur avlägsnas sedan och överflödet av underhudsfett skalas försiktigt bort från huden. Hudbitar med en diameter på ungefär 20 mm tas ut. Hudbitarna kan lagras innan de används om det kan visas att positiva och negativa kontrolldata är likvärdiga med dem som erhålls för färsk hud.

Varje hudbit placeras över änden av ett PTFE-rör (polytetrafluoreten) så att överhuden är i kontakt med röret. En o-ring i gummi presspassas över rörets ände för att hålla huden på plats och överflödig vävnad putsas bort. Rörets och o-ringens mått visas i figur 2. O-ringen i gummi förseglas sedan till PTFE-rörets ände med vaselin. Röret fästs med en fjäderklämma i en kammare som innehåller $MgSO_4$-lösning (154 mM) (figur 1). Hudbiten ska vara helt nedsänkt i $MgSO_4$-lösningen. Upp till 10–15 hudbitar kan erhållas från ett enda råttskinn.

Innan testningen börjar mäts de båda hudbitarnas elektriska motstånd som ett kvalitetskontrollförfarande för varje djurhud. Båda bitarna ska ge värden för motståndet som är större än 10 kΩ för att återstoden av hudbitarna ska kunna användas för testet. Om motståndet är mindre än 10 kΩ ska återstående hudbitar från den aktuella huden kastas.

1.5.3 **Applicering av test- och kontrollämnen**

Parallella positiva och negativa kontroller ska användas för varje studie för att säkerställa att försöksmodellen fungerar adekvat. Hudbitar från ett enda djur ska användas. Förslag på ämnen för positiv och negativ kontroll är 10 M saltsyra respektive destillerat vatten.

Testämnen i vätskeform (150 µl) appliceras på epidermisytan inuti röret. Vid testning av ämnen i fast form appliceras en tillräcklig mängd för att säkerställa att hela epidermisytan täcks. Därefter tillförs avjoniserat vatten (150 µl) på det fasta ämnet och röret omskakas varsamt. Testämnet bör ha maximal kontakt med huden. För vissa fasta ämnen kan detta uppnås genom uppvärmning till 30 °C så att testämnet smälter eller mjuknar. Alternativt kan ämnet finfördelas till granulat eller pulver.

▼B

Varje testämne appliceras på tre hudbitar. Testämnet får verka i 24 timmar vid 20-23 ºC och avlägsnas därefter genom sköljning med kranvattenstråle (upp till 30 ºC). Sköljningen bör pågå till dess att inget ämne längre fås bort.

1.5.4 **TER-mätningar**

Hudens elektriska impedans uttryckt som transkutant elektriskt motstånd, TER, mäts med hjälp av växelström med låg spänning med en Wheatstonebrygga (13). Allmänna tekniska data för bryggan är 1–3 V driftspänning, en sinusformad eller rektangulär växelström på 50–1 000 Hz och ett mätområde på minst 0,1–30 kΩ. Den brygga som användes i valideringsstudien mätte induktans, kapacitans och motstånd upp till värden på 2 000 H, 2 000 μF respektive 2 Mω vid frekvenser på 100 Hz eller 1 kHz med användning av seriella eller parallella värden. För mätningen av hudkorrosivitet genom TER-bestämning registrerades motståndet vid frekvensen 100 Hz och seriella värden användes. För att sänka hudens ytspänning tillförs etanol (70 %) i tillräcklig mängd för att täcka epidermisytan. Etanolen får verka några sekunder och hälls sedan ur röret. Därefter behandlas huden med 3 ml MgSO4-lösning (154 mM). För motståndsmätningen (kΩ/hudbit) placeras mätutrustningens elektroder på hudbitens motstående båda ytor (figur 1). Elektrodernas mått och elektrodlängden under krokodilklämman framgår av figur 2. Den inre elektrodklämman hålls uppe på PTFE-röret under motståndsmätningen för att säkerställa att elektrodlängden i magnesiumsulfatlösningen hålls konstant. Den yttre elektroden placeras innanför receptorkammaren så att elektroden ligger mot kammarens botten. Avståndet mellan fjäderklämman och PTFE-rörets botten ska hållas konstant (figur 2) eftersom avståndet påverkar det erhållna motståndsvärdet. Följaktligen ska avståndet mellan den inre elektroden och hudbiten vara konstant och minimalt (1–2 mm).

Om det uppmätta motståndsvärdet överstiger 20 kΩ kan detta bero på att hudbitens epidermisyta är täckt av testämne. För att få bort ämnet kan man t.ex. sluta till PTFE-röret med tummen (som bör skyddas med handske) och skaka om röret i cirka 10 sekunder, hälla ut magnesiumsulfatlösningen och upprepa mätningen med ny $MgSO_4$-lösning.

Såväl testanordningens egenskaper och mått som försöksförfarandet kan påverka de TER-värden som erhålls. Tröskelvärdet på 5 kΩ för hudkorrosivitet togs fram utifrån data som erhållits med den specifika anordning och det specifika förfarande som beskrivs för denna metod. Andra tröskelvärden och kontrollvärden kan gälla om testbetingelserna ändras eller om en annan testanordning används. Därför måste metoden och tröskelvärdena för motstånd kalibreras genom test av ett antal referensstandarder som väljs bland de kemikalier som användes i valideringsstudien (4) (5) eller från liknande kemikalieklasser som de kemikalier som undersöks. En uppsättning lämpliga referenskemikalier listas i tabell 1.

▼B

1.5.5 **Metoder som bygger på färgämnesbindning**

Exponering för vissa icke-korrosiva material kan sänka motståndet under tröskelvärdet 5 kΩ så att joner kan flöda genom hornlagret då det elektriska motståndet minskar (5). Exempelvis kan neutrala organiska ämnen och kemikalier som har ytaktiva egenskaper (bland annat detergenter, emulgeringsmedel och andra ytaktiva ämnen) avlägsna hudlipider och därmed försämra barriärfunktionen och göra huden mer genomsläpplig för joner. Om TER-värdena för testämnena är lägre än eller omkring 5 kΩ utan någon synlig skada bör en bestämning av färgämnespenetrationen göras i kontroll och behandlad vävnad för att fastställa om de erhållna TER-värdena är en följd av ökad genomsläpplighet hos huden eller av hudkorrosivitet (3)(5). Om hudkorrosivitet föreligger och hornlagret är skadat kommer färgämnet sulforhodiamin B snabbt att tränga igenom hudytan och färga underliggande vävnad då det appliceras. Detta färgämne är stabilt mot ett brett urval av kemikalier och påverkas inte av det extraktionsförfarande som beskrivs nedan.

1.5.5.1 *Applicering och avlägsnande av färgämnet sulforhodamin B*

Efter TER-testet hälls magnesiumsulfatet bort från röret och huden granskas noga med avseende på synlig skada. Om ingen tydlig och mer omfattande skada observeras appliceras 150 µL 10-procentig (vikt i volym) lösning av färgämnet sulforhodamine B (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS-nummer 222-529-8; CAS-nummer 3520-42-1) i destillerat vatten på epidermisytan av alla hudbitar. Lösningen får verka i 2 timmar. Därefter avlägsnas överskott (obundet färgämne) genom tvättning av hudbitarna med kranvattenstråle (upp till rumstemperatur) i ungefär 10 sekunder. Hudbitarna tas försiktigt bort från PTFE-rören och varje hudbit placeras i en burk (t.ex. en 20 ml scintillationsburk i glas) som innehåller destillerat vatten (8 ml). Brukarna omskakas varsamt under 5 minuter för att avlägsna ytterligare överskott (obundet färgämne). Därefter upprepas sköljningen. Hudbitarna tas bort, placeras i burkar som innehåller 5 ml 30-procentig (vikt i volym) natriumdodecylsulfat (SDS) i destillerat vatten och inkuberas över natten vid 60 °C.

Efter inkubationen avlägsnas hudbitarna och slängs. Den kvarvarande lösningen centrifugeras under 8 minuter vid 21 °C (relativ centrifugalkraft cirka 175 x g). Ett 1 ml prov av supernatanten späds ut i volymförhållandet 1:5 (t.ex. 1 ml + 4 ml) med 30-procentig (vikt i volym) SDS i destillerat vatten. Lösningens optiska densitet (OD) mäts vid 565 nm.

1.5.5.2 *Beräkning av färgämneshalten*

Halten av sulforhodamin B per hudbit beräknas utifrån OD-värdena (5) (färgämnets molära extinktionskoefficient vid 565 nm = 8,7 x $l0^4$; molekylvikt = 580). Färgämneshalten bestäms för varje hudbit med hjälp av en lämplig kalibreringskurva och därefter beräknas en medelhalt för alla hudbitarna.

2. **DATA**

Motståndsvärden (kΩ) och medelhalter av färgämne (µg/hudbit) ska där det lämpar sig för testämnet liksom för positiva och negativa kontroller rapporteras i tabellform (enskilda försöksdata och medelvärden ± standarddeviation), inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och enskilda värden.

▼B

2.1 TOLKNING AV RESULTAT

TER-medelvärdena godtas om parallella positiva och negativa kontrollvärden faller inom de godtagbara intervallen för den metod som används på testlaboratoriet. De godtagbara motståndsintervallen för metoden och anordningen som beskrivs ovan ges i följande tabell:

Kontroll	Ämne	Motståndsintervall (kΩ)
Positiv	10 M saltsyra	0,5–1,0
Negativ	Destillerat vatten	10–25

Medelhalterna för färgämnesbindning godtas på villkor att värdena för de parallella kontrollerna ligger inom de godtagbara intervallen för metoden. Föreslagna intervall för färgämneshalt för kontrollämnena för den metod och den anordning som beskrivs ovan ges nedan:

Kontroll	Ämne	Intervall för färgämneshalt (μg/hudbit)
Positiv	10 M saltsyra	40–100
Negativ	Destillerat vatten	15–35

Testämnet anses vara icke-korrosivt

i) om TER-medelvärdet för testämnet är högre än 5 kΩ eller

ii) TER-medelvärdet är lägre än eller lika med 5 kΩ och

— hudbiten inte har någon synlig skada och

— medelhalten av färgämne i hudbitarna ligger väl under medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl.

Testämnet anses vara korrosivt

i) om TER-medelvärdet är mindre än eller lika med 5 kΩ och hudbiten är uppenbart skadad eller

ii) TER-medelvärdet är lägre än eller lika med 5 kΩ och

— hudbiten inte uppvisar någon synlig skada men

— medelhalten av färgämne är större än eller lika med medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Test- och kontrollämnen:

— Kemiskt namn eller kemiska namn såsom IUPAC- eller CAS-namn och CAS-nummer, om dessa uppgifter är kända.

— Renhet och sammansättning av ämnet eller beredningen (i viktprocentandelar) och fysikaliskt tillstånd.

— Fysikalkemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, pH, stabilitet, vattenlöslighet, som är relevanta för studiens genomförande.

— Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning.

— Stabilitet, om denna är känd.

Försöksdjur:

— Stam och kön för använda djur.

— Djurens ålder då de användes som donatordjur.

— Ursprung, uppfödningsförhållanden, diet etc.

— Uppgifter om hudberedningen.

Försöksförhållanden:

— Kalibreringskurvor för testanordningen.

— Kalibreringskurvor för testet av färgämnesbindning.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet för TER-mätningar.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet för bestämning av färgämnesbindning, om detta är tillämpligt, om detta är tillämpligt.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandena.

— Beskrivning av eventuella utvärderingskriterier.

Resultat:

— Data i tabellform från TER- och färgämnesbindningsbestämning (om detta är tillämpligt) för enskilda djur och för enskilda hudprover.

— Beskrivning av observerade effekter.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (2001), Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

2. Testmethod B.4. Akut toxicitet: hudirriation/hudkorrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219–255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471–482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483–524.

6. OECD (1996), Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995), Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, s. 129–147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997), Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, s. 275–280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002), ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11. OECD (2002), Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, s. 507–512.

▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro:* results of an interlaboratory trial. Toxic. in Vitro 6, s. 191–194.

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998), An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, s. 709–720.

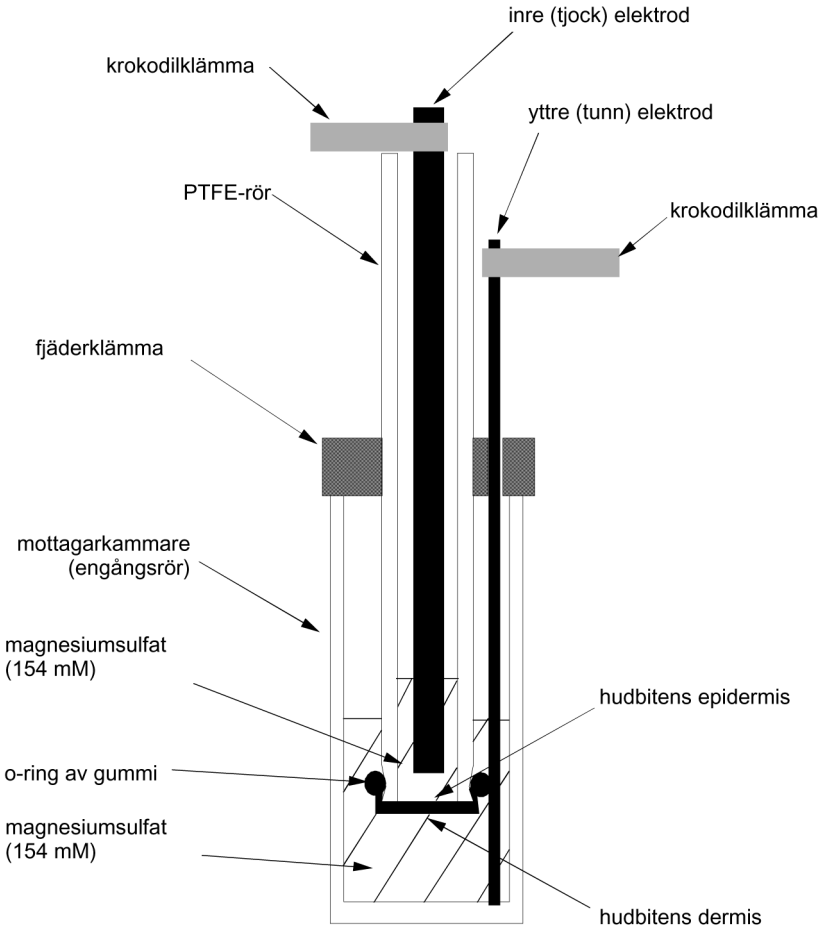
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997), The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, s. 845–852.

16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988), An In Vitro model for identifying skin-korrosivt chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, s. 7–17.

▼B

Figur 1

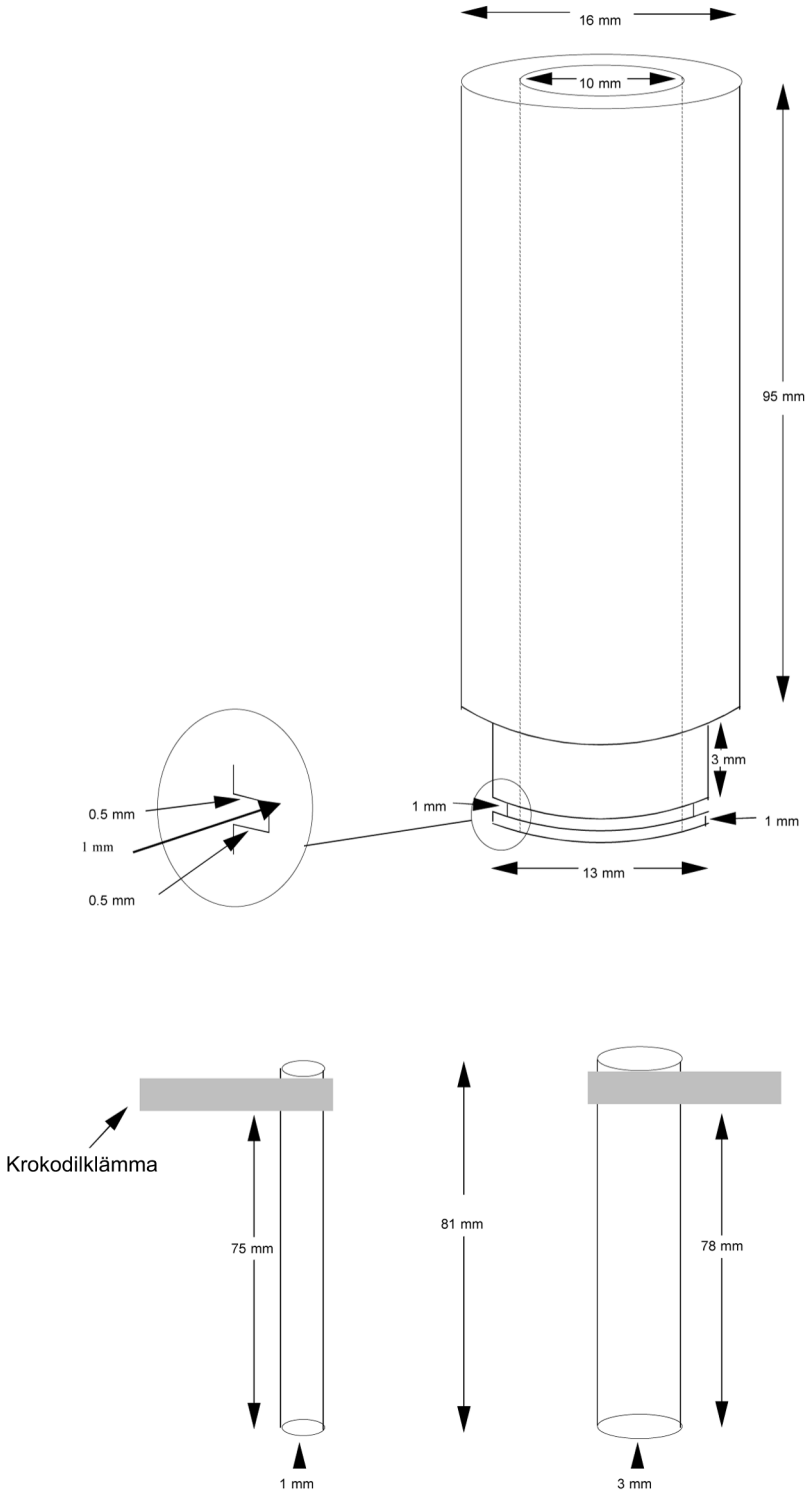
Anordning för TER-analys av råtthud



▼B

Figur 2

Mått på polytetrafluoretenrör (PFTE-rör), mottagarrör och elektroder



▼B

Kritiska faktorer för den anordning som visas ovan:

— PTFE-rörets innerdiameter.

— Elektrodernas längd jämfört med PTFE-rörets och mottagarrörets. Hudbiten ska inte vara i kontakt med elektroderna och en standardlängd av elektroden ska vara i kontakt med $MgSO_4$-lösningen.

— Mängden $MgSO_4$-lösning i mottagarröret ska ge ett visst djup i vätskan jämfört med nivån i PFTE-röret, såsom visas i figur 1.

— Hudbiten ska vara ordentligt fäst vid PFTE-röret, så att det elektriska motståndet är ett verkligt mått på hudens egenskaper.

▼B

B.40B ***IN VITRO-TEST* AV HUDKORROSIVITET: TEST MED MODELL AV HUMAN HUD**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 431 (2004).

1.1 INLEDNING

Hudkorrosivitet innebär att en irreversibel vävnadsskada uppstår i huden som en följd av att ett testmaterial [definierat enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS)] (1) appliceras. Denna metod bygger på ett förfarande som innebär att testmaterialets hudkorrosivitet inte testas på levande djur.

Bedömning av hudkorrosiviteten har normalt inneburit användning av försöksdjur (2). På grund av den smärta och det lidande som försöksdjuren utsätts för har översynen av testmetod B.4 gjorts på ett sådant sätt att bedömningen av hudkorrosiviteten går att göra med alternativa metoder *in vitro,* så att försöksdjur inte längre behöver användas.

Ett första steg mot att definiera alternativa testmetoder som kunde användas för testning av hudkorrosiviteten var att genomföra förvalideringsstudier (3). Efter detta gjordes en formell valideringsstudie (6)(7)(8) av *in vitro*-metoder för att bedöma hudkorrosiviteten (4)(5). Utfallet av dessa studier sammantaget med annan publicerad litteratur (9) ledde till rekommendationen att följande tester kan användas för bedömning av hudkorrosiviteten *in vivo* (10)(11)(12)(13): ett test där en modell av human hud används (denna metod) och bestämning av transkutant elektriskt motstånd (se testmetod B.40).

Enligt valideringsstudier gör tester med modeller av human hud (3)-(4)(5)(9) det möjligt att på ett tillförlitligt sätt skilja mellan kända hudkorrosiva ämnen och icke-korrosiva ämnen. Testprotokollet kan också ge en indikation för att skilja mellan mycket hudkorrosiva och mindre hudkorrosiva ämnen.

Testet enligt denna metod gör det möjligt att identifiera kemikalier och blandningar som är hudkorrosiva. Dessutom gör testet det möjligt att identifiera icke hudkorrosiva ämnen och blandningar med stöd av annan befintlig information (t.ex. pH, förhållandet mellan struktur och aktivitet, data som gäller människor och/eller djur) (1)(2)(13)(14). Testet ger ingen tillräcklig information om hudirritation, inte heller ger det möjlighet till den underklassificering som är möjlig enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1).

För en fullständig utvärdering av lokala hudeffekter efter en enda hudexponering rekommenderas den sekventiella teststrategi som finns som tillägg till testmetod B.4 (2) och som anges i det internationella systemet för klassificering och märkning (1). Denna teststrategi inbegriper *in vitro-tester* av hudkorrosiviteten (enligt den häri beskrivna metoden) och hudirritation innan tester på levande djur övervägs.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Hudkorrosion in vivo: innebär att en irreversibel skada uppstår i huden, det vill säga synlig nekros genom epidermis och ner i dermis efter att ett testämne har applicerats och fått verka i upp till fyra timmar. Korrosiva reaktioner kännetecknas av sår, blödning, blodiga sårskorpor och i slutet av observationsperioden på 14 dagar av missfärgning på grund av blekning av huden, håravfall på hela hudområden och ärrbildning. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Cellviabilitet: en parameter som är ett mått på en cellpopulations totala aktivitet (t.ex. cellulära mitokondriska dehydrogenasers förmåga att reducera det vitala färgämnet MTT). Denna förmåga är korrelerad till det totala antalet celler och till cellernas viabilitet, beroende på vilken slutpunkt som mäts och på försöksdesignen.

1.3 REFERENSÄMNEN

Tabell 1

Referenskemikalier

Namn	EINECS-nr	CAS-nr	
1,2-Diaminopropan	201-155-9	78-90-0	Starkt korrosiv
Akrylsyra	201-177-9	79-10-7	Starkt korrosiv
2-tert-butylfenol	201-807-2	88-18-6	Korrosiv
Kaliumhydroxid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrosiv
Svavelsyra (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrosiv
Oktansyra (kaprylsyra)	204-677-5	124-07-02	Korrosiv
4-Amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	Icke-korrosiv
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Icke-korrosiv
Fenetylbromid	203-130-8	103-63-9	Icke-korrosiv
Tetrakloretylen	204-825-9	27-18-4	Icke-korrosiv
Isostearinsyra	250-178-0	30399-84-9	Icke-korrosiv
4-(Metyltio)-benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	Icke-korrosiv

De flesta av kemikalierna i förteckningen har tagits från den förteckning över kemikalier som valdes för den internationella valideringsstudien ECVAM (4). Urvalet bygger på följande kriterier:

i) Lika många korrosiva som icke-korrosiva ämnen.

ii) Kommersiellt tillgängliga ämnen som täcker de flesta relevanta kemikalieklasser.

iii) Medtagande av såväl starkt korrosiva som mindre korrosiva ämnen för att göra det möjligt att särskilja ämnen på grundval av hudkorrosiviteten.

▼B

iv) Val av kemikalier som kan hanteras i ett laboratorium utan att utgöra någon annan allvarlig risk utöver hudkorrosiviteten.

1.4 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet appliceras på ytan av en tredimensionell modell av human hud som består minst av en rekonstruerad epidermis med funktionellt hornlager. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att efter fastställda exponeringsperioder framkalla en sänkning av cellernas viabilitet (vilket kan fastställas t.ex. med MTT-reduktionsbestämning (15)) under definierade tröskelvärden. Principen för bestämningen följer hypotesen om att kemikalier är korrosiva om de kan penetrera hornlagret genom diffusion eller erosion och är tillräckligt cytotoxiska för att orsaka celldöd i underliggande cellskikt.

1.4.1 **Förfarande**

1.4.1.1 *Modeller av human hud*

Modeller av human hud kan konstrueras eller erhållas från kommersiella källor (t.ex. EpiDerm™- och EPISKIN™-modellerna) (16)(17)(18)(19) eller utvecklas eller konstrueras på försökslaboratoriet (20)(21). Det är vedertaget att användning av human hud är föremål för nationella och internationella etiska hänsyn och begränsningar. Alla nya modeller ska valideras (minst i den omfattning som beskrivs i 1.4.1.1.2). Modeller av human hud som används för detta test måste uppfylla följande villkor:

1.4.1.1.1 Allmänna villkor för modellen:

Epitelet ska konstrueras av humana keratinocyter. Flera lager av viabla epitelceller ska finnas under ett fungerande hornlager. Hudmodellen kan också ha ett lager med en stromal komponent. Hornlagret ska bestå av flera skikt och ha den lipidprofil som krävs för att barriärfunktionen ska räcka för att motstå snabb penetrering av cytotoxiska markörer. Modellens inneslutningsegenskaper ska vara sådana att ämnen inte ska kunna passera runt hornlagret till den viabla vävnaden. Om testkemikalier kan passera runt hornlagret blir modelleringen av hudexponering dålig. Hudmodellen får inte vara kontaminerad med bakterier (inbegripet mykoplasma) eller svamp.

1.4.1.1.2 Funktionella villkor för modellen:

Viabiliteten kvantifieras normalt genom användning av MTT eller andra färgämnen som omvandlas metaboliskt. I dessa fall ska den optiska densiteten (OD) för extraherat (löst) färgämne från den negativa kontrollvävnaden vara minst 20 gånger större än OD för enbart extraktionslösningsmedlet (se (22) för en översikt). Den negativa kontrollvävnaden ska vara stabil i kultur (ge motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under hela exponeringstiden under försöket. Hornlagret ska vara tillräckligt robust för att stå emot snabb penetrering av vissa cytotoxiska markörer (t.ex. 1-procentig Triton X-100). Denna egenskap kan uppskattas på grundval av den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 procent (ET_{50}) (denna tid är t.ex. > 2 timmar för EpiDerm™- och EPISKIN™-modellerna). Vävnaden ska vara reproducerbar över tiden och helst mellan laboratorier. Dessutom ska den kunna användas för att förutsäga den korrosiva potentialen hos referenskemikalier (se tabell 1) då den används enligt det valda försöksprotokollet.

▼B

1.4.1.2 *Applicering av test- och kontrollämnen*

Två vävnadsreplikat används för varje behandling (exponeringstid), även för kontrollerna. Ämnen i vätskeform måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka hudens yta (minst 25 µl/cm^2). Ämnen i fast form måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka huden och därefter måste ämnet fuktas med avjoniserat eller destillerat vatten för att säkerställa god kontakt med huden. I vissa fall måste ämnen i fast form pulveriseras före appliceringen. Appliceringsmetoden måste vara lämplig för testämnet (se hänvisning 5). I slutet av exponeringsperioden ska testämnet omsorgsfullt tvättas bort från hudytan med en lämplig buffert eller med 0,9-procentig NaCl.

Parallella positiva och negativa kontroller ska användas i varje studie för att säkerställa att försöksmodellen fungerar adekvat. Föreslagna ämnen för positiv kontroll är isättika eller 8N KOH. Föreslagna ämnen för negativ kontroll är 0,9-procentig NaCl eller vatten.

1.4.1.3 *Mätning av cellernas viabilitet*

Endast kvantitativa, validerade metoder får användas för att mäta cellernas viabilitet. Vidare måste viabilitetsmåttet vara förenligt med användning av den tredimensionella vävnadskonstruktionen. Ospecifik bindning av färgämne får inte störa viabilitetsmätningen. Proteinbindande färgämnen och sådana som inte genomgår metabolisk omvandling (t.ex. neutralrött) är därför olämpliga. Den oftast använda bestämningsmetoden är MTT-reduktion [3-(4,5-dimetylthiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid; EINECS-nummer 206-069-5, CAS-nummer 298-93-1)] , som har visat sig ge exakta och reproducerbara resultat (5), men även andra metoder kan användas (t.ex. 0,3-1 mg/ml) vid en lämplig inkubationstemperatur under 3 timmar. Den utfällda blå formazanprodukten extraheras sedan med lösningsmedel (isopropanol) och formazanhalten mäts genom OD-bestämning vid en våglängd mellan 540 och 595 nm.

Kemisk inverkan av testämnet på färgämnet kan likna inverkan av cellulär metabolism och leda till en falsk bedömning av viabiliteten. Detta har visats inträffa då ett testämne inte avlägsnas helt från huden genom sköljning (9). Om testämnet påverkar färgämnet direkt måste ytterligare kontroller användas för att upptäcka och korrigera för dessa testämnens störning av viabilitetsmätningarna (9)(23).

2. **DATA**

För varje vävnad ska OD-värden och beräknade procentvärden för cellviabilitet rapporteras i tabellform såväl för testämne som för positiva och negativa kontroller, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och enskilda värden

▼B

2.1 TOLKNING AV RESULTAT

De OD-värden som erhållits för varje testprov kan användas för att beräkna en procentuell viabilitet i förhållande till den negativa kontrollen, som sätts till 100 %. Tröskelvärdet för cellviabilitet som skiljer korrosiva ämnen från icke-korrosiva (eller som skiljer mellan olika korrosiva klasser) eller det statistiska förfarande eller de statistiska förfaranden som används för att utvärdera resultaten och för att identifiera korrosiva ämnen måste definieras klart och dokumenteras. Dessutom ska lämpligheten visas. Generellt fastställs dessa tröskelvärden vid optimeringen av försöket under en förvalideringsfas och bekräftas under en valideringsstudie. Ett exempel är förutsägbarheten för korrosivitet associerad till EpiDerm^{TM}-modellen (9).

Testämnet anses vara korrosivt för huden

i) om viabiliteten efter 3 minuters exponering är mindre än 50 % eller

ii) om viabiliteten efter 3 minuters exponering är större än eller lika med 50 % och viabiliteten efter 1 timmes exponering är mindre än 15 %.

Testämnet anses vara icke-korrosivt för huden

i) om viabiliteten efter 3 minuters exponering är större än eller lika med 50 % och viabiliteten efter 1 timmes exponering är större än eller lika med 15 %.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Test- och kontrollämne:

— Kemiskt namn eller kemiska namn såsom IUPAC- eller CAS-namn och CAS nummer, om dessa uppgifter är kända.

— Renhet och sammansättning av ämnet eller beredningen (i viktprocentandelar) och fysikaliskt tillstånd.

— Fysikalkemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, pH, stabilitet, vattenlöslighet, som är relevanta för studiens genomförande.

— Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Stabilitet, om denna är känd.

Motivering av hudmodellen och det använda försöksprotokollet.

Försöksförhållanden:

— Cellsystem

— Kalibreringsinformation för mätanordningar som används för att mäta cellviabilitet (t.ex. spektrofotometer).

▼B

— Fullständiga underbyggande uppgifter om den specifika hudmodell som används, inbegripet validitet.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

— Testdoser

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen.

— Beskrivning av utvärderingskriterier.

Resultat:

— Data i tabellform för enskilda testprover.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion av resultaten.

Slutsats.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (2001), Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testmetod B.4. Akut toxicitet: hudirriation/hudkorrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, s. 219–255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, s. 471–482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, s. 483–524.

6. OECD (1996), Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995), Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, s. 129–147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997), Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000), The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp., s. 371–401.

10. ECVAM (1998), ECVAM News & Views. ATLA 26, s. 275–280.

11. ECVAM (2000), ECVAM News & Views. ATLA 28, s. 365–67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), (2002), ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD (2002), Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st — 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

15. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, s. 55–63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., (1994), New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, s. 889–891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., (2000), Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. s. 203, 211–225.

18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994), The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: s. 133–140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991), In vitro and post -transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193:310-319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992), The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, s. 163–171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994), Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, s. 747–756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995), A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, s. 69–84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVitro 15, s. 57–93.

▼B

B.41 3T3 NRU-FOTOTOXICITETSTEST *IN VITRO*

1. METOD

Denna testmetod motsvarar OECD TG 432 (2004).

1.1 INLEDNING

Fototoxicitet definieras såsom toxisk respons som framkallas när ett ämne appliceras på kroppen och responsen sedan antingen utlöses eller ökar (tydligt vid låga dosnivåer) efter exponering för ljus eller toxisk respons som framkallas genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* används för att identifiera den fototoxiska potentialen hos ett testämne vilken induceras av den exciterade kemikalien efter exponering för ljus. Testet ger en utvärdering av foto-cytotoxiciteten genom att mäta den relativa minskningen av viabilitet hos celler som exponeras för kemikalien i närvaro respektive i frånvaro av ljus. Ämnen som identifieras med detta test är sannolikt fototoxiska *in vivo* efter administrering till organismen och fördelning i huden eller efter applicering på hudens yta.

Många typer av kemikalier har rapporterats ge upphov till fototoxiska effekter (1)(2)(3)(4). Deras gemensamma egenskap är förmågan att absorbera ljusenergi inom solljusets våglängdsområde. Enligt fotokemins första lag (Grotthaus-Drapers lag) är tillräcklig absorption av ljuskvanta förutsättningen för en fotoreaktion. Innan man planerar biologisk testning av en kemikalie bör man därför fastställa den berörda kemikaliens absorptionsspektrum avseende UV/synligt ljus enligt OECD:s testriktlinjer 101. Om den molära extinktions- eller absorptionskoefficienten ligger under 10 liter × mol-$^{-1}$ × cm-1 har kemikalien troligen ingen fotoreaktiv potential och behöver sannolikt inte testas med 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* eller annat biologiskt test av skadliga fotokemiska effekter (1)(5) (bilaga 1).

3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* utvärderades nyligen med avseende på tillförlitlighet och relevans (6)(7)(8)(9). 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* visades ha förutsägbarhet vad gäller akuta fototoxiska effekter på djur och människa *in vivo.* Testet är inte utformat för att förutsäga andra skadliga verkningar som kan uppstå genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, t.ex. fotogenotoxicitet, fotoallergi eller fotokarcinogenitet. Testet är inte heller avsett att användas för bedömning av fototoxisk potential. Det har inte heller utformats för att förutsäga indirekta mekanismer kopplade till fototoxicitet, effekter av metaboliter av testämnet eller effekten av blandningar.

Metaboliserande system är ett allmänt krav för alla *in vitro-test* som används för förutsägelse av genotoxisk och karcinogen potential, men när det gäller fototoxicitet finns hittills bara några få exempel när metabolisk omvandling krävs för att ett fototoxin ska verka *in vivo* eller *in vitro.* Det är därför varken nödvändigt eller vetenskapligt motiverat att det aktuella testet genomförs med ett system som har metabolisk aktivering.

▼B

1.2 DEFINITIONER

strålning: Intensiteten hos ultraviolett (UV) eller synligt ljus som når en yta, uttryckt i W/m^2 eller mW/cm^2.

ljusdos: Den mängd (= intensitet x tid) ultraviolett (UV) eller synlig strålning som når en yta, uttryckt i Joule (= W x s) per ytenhet, t.ex. J/m^2 eller J/cm^2.

uv-ljusets våglängdsområde: Den uppdelning som rekommenderas av CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) är: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) och UVC (100-280 nm). Även andra uppdelningar förekommer – gränsen mellan UVB och UVA sätts ofta vid 320 nm och UVA kan uppdelas i UV-A1 och UV-A2 med en gräns vid cirka 340 nm.

cellviabilitet: En parameter för att mäta en cellpopulations totala aktivitet (t.ex. upptag av det vitala färgämnet neutralrött i cellens lysosomer). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet celler och deras vitalitet.

relativ cellviabilitet: Cellviabiliteten uttryckt i förhållande till negativa kontroller (med lösningsmedel) som har tagits fortlöpande under hela testförfarandet (+ UV eller – UV), utan behandling med testkemikalie.

PIF *(fotoirritationsfaktor):* En faktor som fås genom jämförelse mellan två cytotoxiska koncentrationer (EC_{50}) av testkemikalien som ger samma effekt i frånvaro (- UV) respektive närvaro (+ UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

EC_{50}: Den koncentration av testkemikalien som minskar cellviabiliteten med 50 %.

MPE (Mean Photo Effect): Ett mått som har härletts från matematisk analys av de koncentrations-responskurvor som erhålls i frånvaro (- UV) respektive närvaro (+ UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

fototoxicitet: Akut toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* bygger på en jämförelse av en kemikalies toxicitet då den testas i närvaro och i frånvaro av en icke-cytotoxisk dos av simulerat solljus. Cytotoxiciteten i detta test uttrycks som en koncentrationsberoende minskning av upptaget av det vitala färgämnet neutralrött vid mätning 24 timmar efter behandling med testkemikalien och påföljande bestrålning (10). Neutralrött är ett svagt katjoniskt färgämne som lätt tränger igenom cellmembranen genom icke-diffusion och ackumuleras intracellulärt i lysosomer. Förändringar i ytan av det känsliga lysosommembranet gör lysosomerna sköra och ger andra förändringar som gradvis blir irreversibla. Sådana förändringar orsakade av verkan av xenobiotika ger minskat upptag och minskad bindning av neutralrött. Därmed går det att skilja mellan viabla, skadade och döda celler, vilket är grunden för detta test.

▼B

Balb/c 3T3-celler hålls i kultur under 24 timmar för monolayerbildning. Två 96-hålsplattor per testkemikalie förinkuberas i en timme med åtta olika koncentrationer av testämnet. Därefter exponeras den ena av de två plattorna för en icke-cytotoxisk ljusdos medan den andra plattan hålls i mörker. Sedan byter man ut båda plattornas behandlingsmedium mot kulturmedium och efter ytterligare 24 timmars inkubering bestäms cellviabiliteten med neutralröttupptag. Cellviabiliteten uttrycks som en procentandel jämfört med obehandlade kontroller med lösningsmedel och beräknas för varje testkoncentration. Därefter uppskattas den fototoxiska potentialen genom jämförelse av den koncentrationsrespons som erhålls i närvaro och i frånvaro av strålning, i regel på nivån EC_{50}, dvs. den koncentration som minskar cellviabiliteten med 50 % jämfört med de obehandlade kontrollproverna.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Celler*

En etablerad musfibroblastcellinje, Balb/c 3T3, klon 31, antingen från ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) eller från ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK) användes för valideringsstudien, och det rekommenderas därför att sådana celler erhålls från en välrenommerad cellbank. Andra celler eller cellinjer kan användas med samma testförfarande, förutsatt att odlingsbetingelserna anpassas till cellernas specifika behov, men motsvarigheten måste demonstreras.

Cellerna ska regelbundet kontrolleras med avseende på mykoplasmaförorening och får endast användas om ingen sådan påvisas (11).

Det är viktigt att Balb/c 3T3-cellernas UV-känslighet kontrolleras regelbundet enligt det kvalitetskontrollförfarande som beskrivs i denna metod. Eftersom cellernas UVA-känslighet kan öka med antalet passager ska Balb/c 3T3-celler med lägsta möjliga passagenummer användas, helst under 100 (se avsnitt 1.4.2.2.2 och bilaga 2).

1.4.1.2 *Media och odlingsbetingelser*

Lämpliga näringslösningar och inkuberingsbetingelser bör användas för vanliga cellpassager och under testförfarandet. För Balb/c 3T3-celler innebär detta t.ex. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kompletterat med 10 % serum från nyfödd kalv, 4 mM glutamin, penicillin (100 IE) och streptomycin (100 µg/ml) samt inkubering i fuktig atmosfär vid 37 °C och 5–7,5 % CO_2 beroende på bufferten (se avsnitt 1.4.1.4, andra stycket.). Det är särskilt viktigt att man med cellodlingsbetingelserna kan säkerställa en cellcykeltid inom det normala historiska intervallet för de celler eller den cellinje som används.

1.4.1.3 *Beredning av kulturer*

Celler från djupfrysta stamkulturer sås ut i näringslösningen i lämplig täthet och subkultiveras minst en gång innan de används i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*.

▼B

För fototoxicitetstestet sås testcellerna ut i näringslösningen med sådan täthet att odlingarna inte växer samman före avslutat test, dvs. när cellviabiliteten bestäms 48 timmar efter utsådden. För Balb/c 3T3-celler som odlas på 96-hålsplattor rekommenderas tätheten 1×10^4 celler per hål.

För varje testkemikalie sås celler ut på samma sätt på två separata 96-hålsplattor som därefter parallellt används genom hela testförfarandet under identiska odlingsförhållanden, med undantag av den tidsperiod då den ena plattan bestrålas (+ UVA/synligt ljus) och den andra hålls i mörker (– UVA/synligt ljus).

1.4.1.4 *Beredning av testämne*

Testämnena måste ha beretts omedelbart före användningen, om man inte med stöd av stabilitetsdata kan visa att ämnena är lagringsbeständiga. Det rekommenderas att alla hantering och inledande behandling av cellerna görs under ljusbetingelser som inte kan ge fotoaktivering eller nedbrytning av testämnet före bestrålning.

Testkemikalierna ska lösas upp i buffrade saltlösningar, t.ex. EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) eller fysiologiskt balanserade buffertlösningar som inte får innehålla proteinkomponenter, ljusaborberande komponenter (t.ex. pH-indikatorfärger och vitaminer) som kan störa bestrålningsresultatet. Eftersom cellerna under bestrålningen hålls utanför CO_2-inkubatorn under cirka 50 minuter, är det viktigt att undvika alkalisering. Om svaga buffertar som EBSS används kan detta uppnås genom att cellerna inkuberas vid 7,5 % CO_2. Om cellerna inkuberas vid endast 5 % CO_2 bör en starkare buffert väljas.

Testkemikalier med begränsad vattenlöslighet ska lösas upp i lämpligt lösningsmedel. Om lösningsmedel används måste detta förekomma i en konstant volymkoncentration i alla odlingar, dvs. både i de negativa kontrollerna och i alla koncentrationer av testkemikalien, och lösningsmedlet måste vara icke-cytotoxiskt vid denna koncentration. Testkemikalierna bör väljas så att utfällning och grumling i lösningarna undviks.

Som lösningsmedel rekommenderas dimetylsulfoxid (DMSO) och etanol (ETOH). Andra lösningsmedel med låg cytotoxicitet kan vara lämpliga men måste före användning utvärderas med avseende på specifika egenskaper, t.ex. reaktionsbenägenhet med testkemikalien, dämpning av den fototoxiska verkan eller benägenhet att fånga upp radikaler och/eller kemisk stabilitet i lösningsmedlet.

Vortex-blandning och/eller ultraljudsbehandling och/eller uppvärmning till lämplig temperatur kan användas för att underlätta upplösningen, förutsatt att detta inte påverkar testkemikaliens stabilitet.

▼B

1.4.1.5 *Bestrålningsbetingelser*

1.4.1.5.1 Ljuskälla

Valet av lämplig ljuskälla i kombination med lämplig filtrering är den viktigaste faktorn vid testning av fototoxicitet. I regel förknippas UVA och de synliga våglängdsområdena med fototoxiska reaktioner *in vivo* (3)(12), medan UVB har mindre relevans men är mycket cytotoxisk – cytotoxiciteten ökar 1 000-faldigt när våglängden minskar från 313 till 280 nm (13). Kriterierna för val av lämplig ljuskälla måste inbegripa kravet att ljuskällan emitterar våglängder som absorberas av testkemikalien (absorptionsspektrum) och att ljusdosen (den dos som uppnås inom skälig tid) är tillräcklig för detektion av kända fotocytotoxiska kemikalier. Dessutom får de våglängder och doser som används inte vara otillbörligt skadliga för testsystemet, vilket inbegriper värmeemission (infraröda området).

Det optimala är att använda simulerat solljus från en solsimulator. Fördelningen av stråldosen från den filterförsedda solsimulatorn ska vara nära den i utomhusljus som ges i (14). I solsimulatorer används både xenonbåglampor och (dopade) kvicksilver-metallhalidbåglampor (15). Fördelen med de senare är att de emitterar mindre värme och är billigare, men ljusets likhet med solljus är mindre än för xenonbåglampor. Eftersom alla solsimulatorer emitterar betydande mängder UVB bör de förses med lämpliga filter för att minska de mycket cytotoxiska UVB-våglängderna. Alla plastmaterial för cellodling innehåller UV-stabilisatorer. Därför bör spektret mätas genom samma typ av lock till 96-hålsplattor som de som används vid bestämningen. Oavsett vilka åtgärder som vidtas för att dämpa delar av spektret genom filtrering eller genom ofrånkomlig inverkan från utrustningen får det spektrum som registreras under filtren inte avvika från standardiserat utomhusdagsljus (14). Ett exempel på bestrålningsfördelning för den filterförsedda solsimulator som användes i valideringsstudien av 3T3-NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* ges i (8)-(16). Se även figur 1 i bilaga 2.

1.4.1.5.2 Dosimetri

Ljusets (strålningens) intensitet ska före varje fototoxicitetstest rutinmässigt kontrolleras med hjälp av en lämplig bredbands-UV-mätare. Intensiteten ska mätas genom samma typ av lock som används för de 96-hålsplattor som används för toxicitetsbestämningen. UV-mätaren måste ha kalibrerats mot källan och dess prestanda bör kontrolleras. För detta ändamål rekommenderas användning av en referensmätare, dvs. en annan, identiskt kalibrerad UV-mätare av samma typ. Helst ska man även då och då använda en spektroradiometer för att mäta den spektrala strålningen från den filtrerade ljuskällan och för att kontrollera bredbands-UV-mätarens kalibrering.

En dos på 5 J/cm^2 (UVA) fastställdes vara icke-toxisk för Balb/c 3T3-celler men tillräckligt stark för att excitera kemikalier så att de utlöste fototoxiska reaktioner (6)(17). För att erhålla 5 J/cm^2 inom 50 minuter ställdes t.ex. strålningen in på 1,7 mW/cm^2 (figur 2, bilaga 2). Om en annan cellinje eller en annan ljuskälla används måste strålningsdosen eventuellt justeras så att en dosregim kan väljas som inte är skadlig för cellerna men som räcker för att excitera vanliga fototoxiska ämnen. Tiden för ljusexponeringen beräknas på följande sätt:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestrålningsdos } (J/cm^2) \times 1000}{\text{bestrålning } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1J = 1\ Ws)$$

1.4.2 *Försöksförhållanden*

1.4.2.1 *Koncentrationer av testämne*

Koncentrationsområdena för en kemikalie som ska testas i närvaro (+ UVA) och i frånvaro (– UVA) av ljus ska först fastställas på lämpligt sätt i förberedande försök. Det kan vara lämpligt att testa lösligheten initialt och efter 60 minuter (eller den behandlingstid som ska användas) eftersom lösligheten kan förändras med tiden eller under loppet av exponeringen. För att undvika toxicitet på grund av olämpliga kulturbetingelser eller på grund av starkt sura eller basiska kemikalier ska pH för cellkulturerna med tillsatt testkemikalie ligga i området 6,5–7,8.

Den högsta koncentrationen av testämne bör ligga inom fysiologiska testbetingelser, dvs. så att osmotisk stress och pH-stress undviks. Beroende på testkemikalien kan det vara nödvändigt att beakta andra fysikalkemiska egenskaper som faktorer som begränsar den högsta testkoncentrationen. För relativt svårlösliga ämnen som inte är toxiska vid koncentrationer upp till mättnadspunkten ska den högsta möjliga koncentrationen testas. I regel ska utfällning av testkemikalien vid någon testkoncentration undvikas. Den maximala koncentrationen av ett testämne ska inte överstiga 1 000 μg/ml och osmolariteten ska inte överstiga 10 mmolar. En geometrisk spädningsserie med 8 testämneskoncentrationer och konstant utspädningsfaktor ska användas (se avsnitt 2.1, andra stycket).

Om information finns (från ett försök för att fastställa koncentrationsområde) om att testkemikalien inte är cytotoxisk upp till gränskoncentrationen i mörkerförsöket (– UVA) men är starkt cytotoxisk vid bestrålning (+ UVA) kan de koncentrationsområden som ska väljas för ljusförsöket (+ UVA) skilja sig från dem som har valts för mörkerförsöket för att kravet på adekvat datakvalitet ska uppfyllas.

1.4.2.2 *Kontroller*

1.4.2.2.1 Cellernas strålningskänslighet, fastställande av historiska data

Cellerna bör rutinmässigt (ungefär vid var femte passage) kontrolleras med avseende på känslighet för ljuskällan genom att deras viabilitet följs efter exponering för ökande stråldoser. Flera stråldoser, inbegripet nivåer betydligt över dem som används för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet, ska användas för denna bestämning. Doserna kvantifieras lättast genom mätningar av ljuskällans UV-del. Cellerna sås med den täthet som används för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* och bestrålas påföljande dag. Cellviabiliteten bestäms en dag senare med neutralröttupptag. Det ska visas att den resulterande högsta icke-cytotoxiska dosen (t.ex. vid 5 J/cm^2 (UVA) vid valideringsstudien) räckte för att klassificera referenskemikalierna (tabell 1) korrekt.

▼B

1.4.2.2.2 Strålningskänslighet, kontroll av det aktuella testet

Testet uppfyller kriterierna om de bestrålade negativkontrollerna med lösningsmedel uppvisar en viabilitet på över 80 % då de jämförs med obestrålade negativkontroller med lösningsmedel.

1.4.2.2.3 Lösningsmedelskontrollernas viabilitet

Den absoluta optiska densiteten (OD540 NRU) för neutralrött extraherat från lösningsmedelskontrollerna visar om de 1×10^4 cellerna som såtts per hål har tillvuxit med normal fördubblingstid under de två dagar bestämningen pågått. Ett test uppfyller godtagbarhetskriterierna om medelvärdet på OD540 NRU för de obehandlade kontrollerna är ≥ 0,4 (dvs. cirka tjugo gånger bakgrundsabsorbansen för lösningsmedlet).

1.4.2.2.4 Positivkontroll

En känd fototoxisk kemikalie ska testas samtidigt med varje 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro*. Klorpromazin (CPZ) rekommenderas. Följande godtagbarhetskriterier definierades för test av CPZ enligt standardprotokollet för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro:* bestrålad CPZ (+ UVA): EC_{50} = 0,1 till 2,0 μg/ml, obestrålad CPZ (– UV): EC_{50}= 7,0 till 90,0 μg/ml. Fotoirritationsfaktorn (PIF) ska vara > 6. Historisk prestanda för positivkontrollen ska följas.

Andra fototoxiska kemikalier som är lämpliga med tanke på de testade kemikaliernas kemikalieklass eller löslighetsegenskaper kan användas som parallella positivkontroller i stället för klorpromazin.

1.4.3 **Testförfarande (6)(7)(8)(16)(17)**

1.4.3.1 *Dag 1*

Dosera 100 μl näringslösning i de perifera hålen i en 96-håls mikrotitterplatta för vävnadsodling (= blindprov). Dosera 100 μl cellsuspension med 1 x $l0^5$ celler/ml i näringslösning (= 1x104 celler/hål) i de återstående hålen. Två plattor ska beredas för varje serie av enskilda testämneskoncentrationer, för lösningsmedel och för positivkontroller.

Inkubera cellerna i 24 timmar (se avsnitt 1.4.1.2) tills de bildar ett halvkonfluent monolayer. Denna inkuberingsperiod är tillräcklig för cellernas återhämtning och vidhäftning samt exponentiell tillväxt.

1.4.3.2 *Dag 2*

Dekantera näringslösningen från cellerna efter inkuberingen och tvätta två gånger med 150 μl av den buffertlösning som används för inkuberingen. Tillsätt 100 μl av buffertlösningen med lämplig koncentration av testkemikalie eller lösningsmedel (lösningsmedelskontroll). Använd 8 olika koncentrationer av testkemikalien. Inkubera cellerna med testämnet i mörker i 60 minuter (se avsnitt 1.4.1.2 och 1.4.1.4, andra stycket).

Från de två plattor som beretts för varje koncentrationsserie av testämne och kontroll väljs en, i regel slumpmässigt, för bestämning av cytotoxicitet (– UVA) (dvs. kontrollplattan), och en (behandlingsplattan) för bestämning av fotocytotoxicitet (+ UVA).

▼B

Utför bestämningens + UVA-del genom att bestråla cellerna vid rumstemperatur i 50 minuter genom locket på 96-hålsplattan med den högsta icke-cytotoxiska stråldosen (se även bilaga 2). Håll obestrålade plattor (– UVA) i en mörk låda i 50 minuter (= UVA-exponeringstiden).

Dekantera testlösningen och tvätta två gånger med 150 µl av den buffertlösning som används för inkuberingen, men utan testämnet. Ersätt bufferten med näringslösning och inkubera (se avsnitt 1.4.1.2) över natt (18–22 timmar).

1.4.3.3 *Dag 3*

1.4.3.3.1 U t v ä r d e r i n g m e d m i k r o s k o p

Cellerna ska undersökas i faskontrastmikroskop med avseende på tillväxt, morfologi och monolayerintegritet. Förändringar av cellernas morfologi och effekter på celltillväxten ska noteras.

1.4.3.3.2 T e s t m e d u p p t a g n i n g a v n e u t r a l r ö t t

Tvätta cellerna med 150 µl föruppvärmd buffert. Avlägsna tvättlösningen genom att klappa försiktigt. Tillsätt 100 µl av 50 µg/ml neutralrött (NR) (3-amino-7-dimetylamino-2-metylfenazinhydroklorid, Einecs-nummer 209-035-8; CAS-nummer 553-24-2; C.I. 50040) i medium utan serum (16) och inkubera enligt beskrivningen i avsnitt 1.4.1.2 i tre timmar. Avlägsna NR-mediet efter inkuberingen och tvätta cellerna med 150 µl buffert. Dekantera och avlägsna överskottet av buffert genom absorption eller centrifugering.

Tillsätt exakt 150 µl NR-desorptionslösning (färsk lösning av 49 delar vatten + 50 delar etanol + 1 del ättiksyra).

Skaka mikrotiterplattan varsamt på en skakmaskin i 10 minuter tills NR har extraherats ur cellerna och en homogen lösning har bildats.

Mät NR-extraktets optiska densitet vid 540 nm i en spektrofotometer och använd blindproven som referens. Spara data i lämpligt filformat för efterföljande analys.

2. **DATA**

2.1 KVALITET OCH KVANTITET AV DATA

Erhållna testdata bör ge möjlighet till meningsfull analys av den koncentrationsberoende respons som konstaterats i närvaro och i frånvaro av bestrålning och om möjligt den koncentration av testkemikalien som minskar cellviabiliteten till 50 % (EC_{50}). Om cytotoxicitet detekteras ska både koncentrationsområdet och intervallet för enskilda koncentrationer anpassas så att försöksdata kan sammanställas till en kurva.

För både klart positiva och klart negativa resultat (se avsnitt 2.3, första stycket), kan det räcka med huvudförsöket, underbyggt med ett eller flera preliminära försök för bestämning av område.

▼B

Om man får testresultat som är oklara eller kommer nära förutsägbarhetsmodellens gräns måste resultaten verifieras genom upprepat test (se även avsnitt 2.4, andra stycket). I sådana fall bör man överväga att variera försöksbetingelserna. Försöksbetingelser som kan varieras inbegriper koncentrationsområdet eller koncentrationsintervallet, förinkuberingstiden och bestrålningstiden. En kortare exponeringstid kan vara lämplig för kemikalier som är instabila i vatten.

2.2 **UTVÄRDERING AV RESULTATEN**

En fotoirritationsfaktor (PIF) eller ett MPE-värde (Mean Photo Effect) kan beräknas för utvärderingen av data.

Beräkning av måtten på fototoxicitet (se nedan) kräver att de diskreta värdena för koncentrationsrespons uppskattas med hjälp av en lämplig fullständig koncentrations-responskurva (försöksmodell). Kurvanpassningen till data görs i regel med icke-linjär regression (18). För att bedöma datavariabilitetens inverkan på den anpassade kurvan rekommenderas bootstrap-metoden.

En fotoirritationsfaktor (PIF) beräknas med hjälp av följande formel:

$$PIF = \frac{EC_{50}(-UVA)}{EC_{50}(+UVA)}$$

Om inget värde på EC_{50} i närvaro eller frånvaro av ljus kan beräknas, går det inte att beräkna någon PIF för testämnet. MPE (Mean Photo Effect) bygger på en jämförelse mellan de fullständiga koncentrations-responskurvorna (19). MPE definieras som det viktade medelvärdet över en representativ uppsättning fotoeffektvärden:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Fotoeffekten PE_c vid koncentrationen C definieras som produkten av responseffekten RE_c och doseffekten DE_c dvs. $PE_c = RE_c \times DE_c$. Responseffekten RE_c är skillnaden mellan observerade respons i frånvaro och i närvaro av ljus, dvs. $RE_c = R_c$ (– UVA) $–R_c$ (+ UVA). Doseffekten ges av

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

där C* representerar ekvivalenskoncentrationen, dvs. den koncentration där + UVA-responsen är lika stor som – UVA-responsen vid koncentrationen C. Om C* inte kan bestämmas därför att svarsvärdena på +UVA-kurvan systematiskt är högre eller lägre än R_C (– UVA) sätts doseffekten till 1. Viktningsfaktorerna w_i ges av det högsta responsvärdet, dvs. $w_i = MAX \{R_i (+ UVA), R_i (– UVA)\}$. Koncentrationsrastret C väljs så att samma antal punkter faller inom vart och ett av de koncentrationsintervall som definieras av de koncentrationsvärden som användes i försöket. Beräkningen av MPE begränsas till det maximala koncentrationsvärde vid vilket minst en av de två kurvorna ännu uppvisar ett responsvärde på minst 10 %. Om denna maximala koncentration är högre än den högsta koncentration som användes i + UVA-försöket sätts den återstående delen av + UVA-kurvan till responsvärdet ”0”. Beroende på om MPE-värdet är större än ett korrekt valt tröskelvärde (MPE_c=0,15) eller inte, klassificeras kemikalien som fototoxisk.

▼B

Ett programpaket för beräkning av PIF och MPE finns tillgängligt från (20).

2.3 TOLKNING AV RESULTATEN

Baserat på valideringsstudien (8) förutsäger PIF < 2 eller MPE < 0,1”ingen fototoxicitet”. PIF > 2 och <5 eller MPE > 0,1 och < 0,15 förutsäger ”sannolik fototoxicitet”. PIF > 5 eller MPE > 0,15 förutsäger ”fototoxicitet”.

Ett laboratorium som ska börja använda denna bestämningsmetod ska testa de referensmaterial som listas i tabell 1 innan man börjar testa ämnen för fototoxisk bestämning. PIF- eller MPE-värdena ska ligga nära dem som anges i tabell 1.

Tabell 1

Kemiskt namn	EINECS-nr	CAS-nr	PIF	MPE	Absorptions-topp	Lösnings-medel (1)
Amiodaron-HCl	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (axel)	etanol
Kloropromazin-HCl	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316nm	acetonitril
Antracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfyrin IX, Dinatrium	256-815-9	[50865-01-5]	>4 5,3	0,54–0,74	402 nm	etanol
L-Histidin		[7006-35-1]	no PIF	0,05–0,10	211nm	vatten
Hexaklorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317nm (axel)	etanol
Natriumlauryl-sulfat	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	Ingen absorption	vatten

(1) Lösningsmedel som används vid absorptionsmätning.

2.4 TOLKNING AV DATA

Om fototoxisk verkan observeras endast vid den högsta testkoncentrationen (särskilt för vattenlösliga testkemikalier), kan ytterligare faktorer behöva beaktas för bestämning av skadligheten. Dessa faktorer kan inbegripa data om hudabsorption och ackumulering av kemikalien i huden och/eller data från andra test, t.ex. test av kemikalien på djur- eller människohud *in vitro* eller på hudmodeller.

▼B

Om ingen toxicitet påvisas (+ UVA och – UVA) och om dålig löslighet begränsade de koncentrationer som kunde testas bör testämnets lämplighet för bestämningsmetoden ifrågasättas och verifierande testning bör övervägas, t.ex. en annan modell.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testämne:

— identifieringsdata, vanliga generiska namn och IUPAC- och CAS-nummer (i mån av tillgänglighet),

— fysikalisk form och renhetsgrad,

— fysikalisk-kemiska egenskaper av betydelse för studien,

— absorptionsspektrum för UV/synligt ljus,

— stabilitet och fotostabilitet (i mån av tillgänglighet).

Lösningsmedel:

— motivering av valet av lösningsmedel,

— testkemikaliens löslighet i det valda lösningsmedlet,

— procenthalten lösningsmedel i behandlingsmediet.

Celler:

— typ av celler och deras källa,

— frånvaron av mykoplasma,

— antalet cellpassager (i mån av tillgänglighet),

— cellernas strålningskänslighet, bestämd med den bestrålningsutrustning som använts för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro*.

Försöksförhållanden (1) – *inkubering före och efter behandlingen:*

— näringslösningens (kulturmediets) typ och sammansättning,

— inkuberingsförhållanden (CO_2-koncentration, temperatur, fuktighet),

— inkuberingens varaktighet (förbehandling, efterbehandling).

Försöksförhållanden (2) – *behandling med kemikalien:*

— motivering för valet av de koncentrationer som använts i närvaro och i frånvaro av bestrålning med ljus,

— om testkemikalien är begränsat löslig och om cytotoxicitet inte föreligger, motivering för den högsta koncentration som testats,

— typ och sammansättning hos behandlingsmediet (buffrad saltlösning),

— kemikaliebehandlingens varaktighet.

Försöksförhållanden (3) – *bestrålning:*

— motivering för valet av den ljuskälla som använts,

▼B

— tillverkare och typ av ljuskälla och radiometer,

— ljuskällans spektrala strålningsegenskaper,

— transmissions- och absorptionsegenskaper hos de filter som använts,

— radiometerns egenskaper och närmare uppgifter om kalibreringen,

— avstånd mellan ljuskälla och testsystem,

— UVA-bestrålning på detta avstånd, uttryckt i mW/cm^2,

— varaktigheten hos bestrålningen med UV/synligt ljus,

— UVA-dos (bestrålning x tid), uttryckt i J/cm^2,

— temperatur som använts för cellodlingarna under bestrålningen och för cellodlingar som parallellt hållits i mörker.

Försöksförhållanden (4) – *viabilitetstest med neutralrött (NR):*

— sammansättning hos NR-mediet,

— NR-inkuberingens varaktighet,

— inkuberingsförhållanden (CO_2-koncentration, temperatur, fuktighet),

— NR-extraktionsbetingelser (extraktionsmedel, varaktighet),

— våglängd som använts för spektrofotometrisk avläsning av optisk densitet för NR,

— annan våglängd (referens), om sådan har använts,

— spektrofotometerblindprovets innehåll, om blindprov har använts.

Resultat:

— cellviabilitet som erhållits vid varje koncentration av testkemikalien uttryckt som genomsnittlig procentandel jämfört med lösningsmedelskontrollernas viabilitet,

— koncentrations-responskurvor (testkemikaliekoncentration i förhållande till relativ cellviabilitet) som erhållits i parallella försök med + UVA och – UVA,

— analys av koncentrations-responskurvorna: om möjligt beräkning av EC_{50} (+ UVA) och EC_{50} (– UVA),

— jämförelse av de två koncentrations-responskurvorna som erhållits i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus, antingen genom beräkning av PIF (fotoirritationsfaktorn) eller genom beräkning av MPE (Mean-Photo-Effect)

— kriterier för godkännande av testet – parallell lösningsmedelskontroll:

— absolut viabilitet (optisk densitet hos neutralröttsextraktet) hos bestrålade och obestrålade celler,

— historiska data för negativ- och lösningsmedelskontroll – medelvärde och standardavvikelse,

— kriterier för godkännande av testet – parallell positivkontroll:

▼B

— EC_{50}(+ UVA) och EC_{50}(– UVA) och PIF/MPE för positivkontrollkemikalie,

— historiska data för positivkontrollkemikalie: EC50 (+ UVA) och EC_{50} (– UVA) och PIF/MPE, medelvärde och standardavvikelse.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In ”Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry” Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI–XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In ”The science of Photobiology” Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79–110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 ”Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water” Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793–796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th–31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In ”Dermatotoxicology”, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515–530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICAL REPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275.

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679–708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

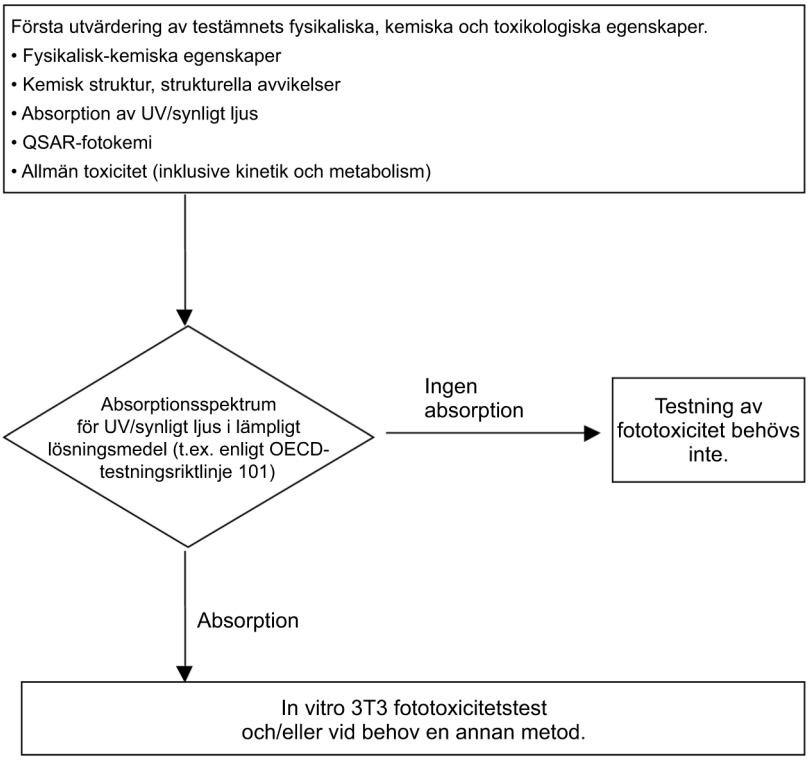
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

Bilaga 1

Rollen för 3T3 NRU-fototoxicitetstest vid ett sekventiellt tillvägagångssätt för fototoxicitetstestning av kemikalier

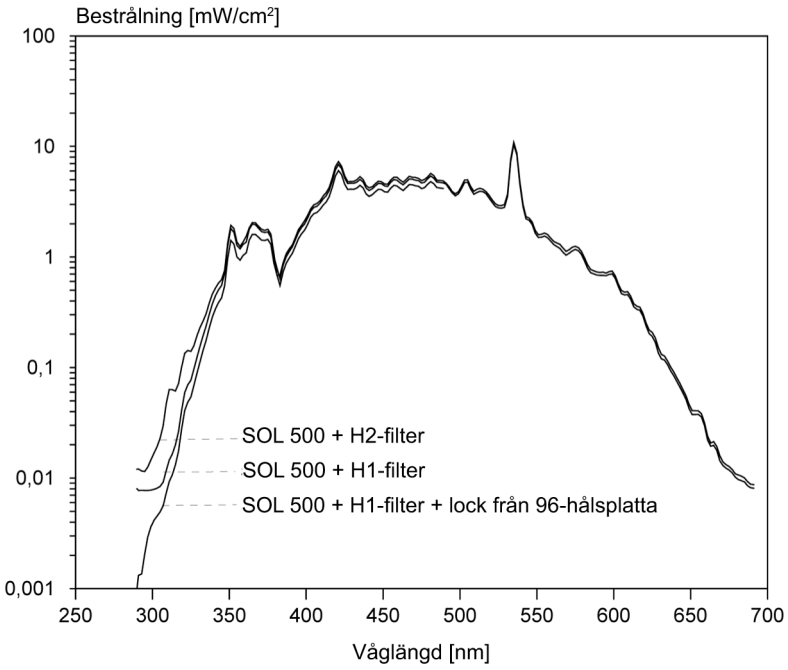


▼B

Bilaga 2

Figur 1

Spektral strålningsdistribution från en filtrerad solsimulator



(se avsnitt 1.4.1.5, andra stycket)

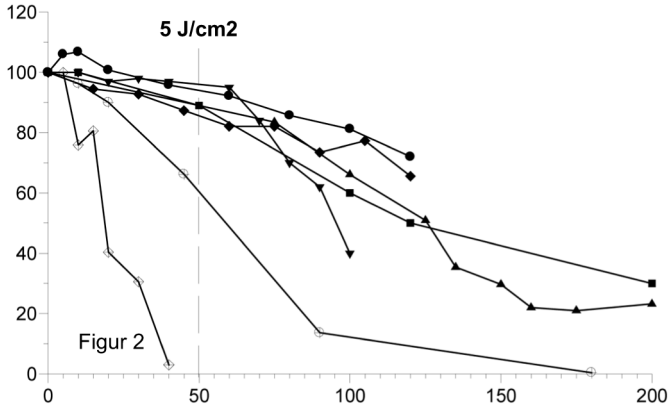
Figur 1 ger ett exempel på en godtagbar strålningsdistribution för en filtrerad solsimulator. Värdena kommer från den dopade metallhalidkälla som användes i valideringsstudien för 3T3 NRU-fototoxicitetstest (6)(8)(17). Effekten av två olika filter och den ytterligare filtreringsverkan från locket på 96-hålsplattan visas. H2-filtret användes endast med testsystem som tål en större mängd UVB (test med hudmodell och fotohemolystest med röda blodkroppar). I 3T3 NRU-fototoxicitetstestet användes H1-filtret. Figuren visar den ytterligare filtreringsverkan som plattlocket ger, huvudsakligen i UVB-området, som dock fortfarande lämnar tillräckligt med UVB i strålningsspektret för att excitera kemikalier som normalt absorberar i UVB-området, t.ex. amiodaron (se tabell 1).

▼B

Figur 2

Strålningskänslighet hos Balb/c 3T3-celler (mätt i UVA-området)

Cellviabilitet (% NR-upptag hos mörkerkontroller)



beströlningstid (minuter)

(10 min = 1 joule UVA/cm²)

(se avsnitt 1.4.1.5.2, andra stycket, 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Känslighet hos Balb/c 3T3-celler mot bestrålning med den solsimulator som användes i valideringsstudien av 3T3 NRU-fototoxicitetstestet, mätt i UVA-området. Figuren visar resultat erhållna på 7 olika laboratorier vid förvalideringsstudien (1). De två kurvorna med öppna symboler erhölls med åldrade celler (stort antal passager) som man hade varit tvungen att ersätta med nya celler. Kurvorna med symboler i fetstil visar celler med godtagbar strålningstolerans.

Den högsta icke-cytotoxiska stråldosen på 5 J/cm^2 erhölls från dessa data (vertikal streckad linje). Den horisontella streckade linjen visar dessutom den maximala godtagbara strålningseffekten som ges i stycke 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY)**

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder baserade på dem ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den ursprungliga testmetoden för bestämning av hudsensibilisering hos möss, LLNA-metoden (OECD:s testriktlinje 429, kapitel B.42 i denna bilaga), har antagits tidigare (1). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA-metoden och en granskning av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Den uppdaterade LLNA-metoden grundar sig på utvärderingen av experimentella och vetenskapliga uppgifter (12). Detta är den andra testmetoden som tas fram för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Den gamla testmetoden (dvs. OECD:s testriktlinje 406, kapitel B.6 i denna bilaga) omfattar test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (13). Jämfört med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) har LLNA fördelar när det gäller djurens välbefinnande. Den uppdaterade LLNA-testmetoden omfattar en uppsättning prestandastandarder (tillägg 1) som kan användas för att utvärdera valideringsstatus för nya och/eller modifierade testmetoder som är funktionellt och mekaniskt likartade med LLNA, enligt principerna i OECD:s riktlinjedokument nr 34 (14).

2. LLNA används för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos–responsbedömning. Här bör noteras att de ämnen som har milda till moderata sensibiliseringsegenskaper och som anses vara lämpliga som positivt kontrollämne för testmetoder med marsvin (dvs. B.6, OECD:s testriktlinje 406) (13), även är lämpliga för LLNA-metoden (6) (8) (15). Inom denna testmetod beskrivs också en variant som kallas reducerat LLNA-test (rLLNA), med upp till 40 procent färre djur (16) (17) (18). Denna variant kan användas när det finns lagstiftade krav på att bekräfta negativ förutsägelse för hudsensibiliserande potential, förutsatt att alla andra LLNA-protokollspecifikationer följs enligt beskrivningen av denna testmetod. Förutsägelsen av negativt resultat ska bygga på tillgänglig information enligt beskrivningen i punkt 4. För tillämpning av rLLNA krävs klara motiveringar och vetenskapliga belägg. Om det mot förmodan uppstår positiva eller tvetydiga resultat med rLLNA kan det krävas ytterligare testning för att tolka eller förtydliga resultaten. Varianten rLLNA bör inte användas för faroidentifiering av hudsensibiliserande testämnen i fall där dos–responsinformation behövs, t.ex. vid underklassificering för förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar och Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier.

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 2.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA är en alternativ metod för identifiering av hudsensibiliserande kemikalier. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA alltid ska användas i stället för test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13), utan att LLNA-metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse. Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Denna information omfattar ämnets

▼M3

identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Med stöd av denna information bör man överväga om LLNA-metoden är lämplig för ämnet (med tanke på att metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och använda informationen som hjälp vid valet av dos.

5. LLNA är en *in vivo*-metod, och av detta följer att man måste använda djur för att bedöma sensibilisering genom allergisk kontakt. Metoden ger dock möjligheter att minska antalet djur. Dessutom ger LLNA möjlighet till bättre behandling av djuren (mindre smärta och lidande) vid test avseende sensibilisering genom allergisk kontakt. LLNA baserar sig på observationer av immunologiska händelser som stimuleras av kemikalier under sensibiliseringens induktionsfas. Till skillnad från test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13) kräver LLNA inte framkallning av provokationsinducerade dermala hypersensitivitetsreaktioner. Dessutom behöver adjuvant inte användas, vilket är fallet vid maximeringstest på marsvin (13). LLNA är därför en mindre plågsam metod för djuren. Trots LLNA-metodens fördelar jämfört med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 bör man vara medveten om att LLNA har vissa begränsningar. Det kan därför i vissa fall vara nödvändigt att använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (13) (t.ex. falska negativa fynd med LLNA för vissa metaller eller falska positiva fynd för vissa hudirriterande ämnen [såsom vissa ytaktiva kemikalier] (19) (20) eller testämnets löslighet). Därutöver gäller att kemiska klasser eller ämnen vars funktionella grupper har påvisats agera som potentiella störfaktorer (21) kan göra det nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13). På grund av den begränsade valideringsdatabasen, som primärt bestod av växtskyddsmedelsformuleringar, är det mer sannolikt att LLNA i jämförelse med test på marsvin ger positivt resultat för dessa typer av testämnen (22). Vid testning av formuleringar kan man dock överväga att även använda liknande ämnen med kända resultat som referensämnen för att påvisa att LLNA-metoden fungerar tillfredsställande (se punkt 16). När dessa identifierade begränsningar räknas bort bör LLNA gå att använda för testning av alla ämnen, utom om ett ämne förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA-metodens exakthet.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara ≥ 3 för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. De förfaranden som beskrivs här grundar sig på radioaktiv märkning *in vivo* för mätning av ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna. Det går dock också att använda andra slutpunkter för bedömning av antalet prolifererande celler, förutsatt att kraven enligt prestandastandarderna uppfylls till fullo (tillägg 1).

▼M3

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. I testet används unga vuxna mushonor av stammen CBA/Cirka eller CBA/J som inte har fått ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (23), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (öronmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har synliga hudskador.

Beredning av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel så att alla extraherbara beståndsdelar för testning fås ut före appliceringen på mössens öron. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet har tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne och att responsen har välkarakteriserad styrka. Användning av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet att bedöma reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Även vissa tillsynsmyndigheter kräver att positiv kontroll används för varje testning och därför uppmuntras användarna att tillfråga relevanta myndigheter innan testning med LLNA-metoden genomförs. Likaså uppmuntras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur i fall där myndigheterna inte godkänner periodiska positiva kontroller (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) större än 3 jämfört med den negativa kontrollgruppen. Den positiva kontrollkemikaliens dos ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte

▼M3

för kraftig (dvs. SI > 20 är ett för högt värde). Rekommenderade ämnen är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS nr 101-86-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym) och 5-procentig merkaptobensotiazol (CAS nr 149-30-4) i *N,N*-dimetylformamid (se tillägg 1, tabell 1). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller ovan angivna kriterier användas, förutsatt att tillbörlig motivering ges.

12. Trots att parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen – detta gäller laboratorier som regelbundet genomför LLNA (dvs. minst en gång i månaden) och har en etablerad historisk databas över positiva kontroller som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från dem. Tillräcklig kvalitet hos LLNA kan framgångsrikt påvisas genom enhetliga positiva resultat med den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (kortare än ett år).

13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas vid ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.

14. Man bör vara medveten om att beslut om att testa positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningsresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska testningarna av positiv kontroll. Om t.ex. falska negativa resultat fås vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet med positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga att använda färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att detta är gångbart (12).

15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 [volym/volym]), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även krävs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (24). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat vehikelkontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.

16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av testämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:

— Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.

— Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Stödjande data från LLNA.

— Stödjande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

▼M3

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Det ska finnas minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet. Det ska också finnas en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord periodisk kontroll, i enlighet med laboratoriets principer rörande punkterna 11–14). Man bör överväga flera doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.

18. Doserna och vehikeln bör väljas på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna (3) och (5). Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör beaktas när man väljer de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (3) (25). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt med ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).

19. Vehikeln får inte störa eller snedvrida testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet och därmed högsta möjliga koncentration samtidigt som lösningen/suspensionen ska vara lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (19) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att se till att hydrofila testämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubiliserande ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.

20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i vehikelkontrollgruppen (se punkt 35). Möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen finns endast när data samlas in individuellt per djur (12). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas individuellt. Vissa tillsynsmyndigheter kan godkänna poolade djurdata och då kan man välja mellan att samla in djurdata individuellt eller poolat.

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns information som grund för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör man göra ett preliminärt screeningtest för att definiera den lämpliga dosnivån för LLNA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att få vägledning för valet av högsta dosnivå i huvudundersökningen, i fall där information saknas om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.

▼M3

22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som huvudundersökningen, utom att proliferationen i lymfnoderna inte utvärderas och dosgruppen kan ha lägre antal djur. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 6). På varje mus observeras båda öronens hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (25). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen) och på dag 6. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 6 genom vägning av en öronbit som stansats ut efter skonsam avlivning. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom gradering ≥ 3 för hudrodnad och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningsdagarna (26) (27). Den högsta dos som väljs för huvudundersökningen blir nästa lägre dos i den preliminära screeningens koncentrationsserie (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Gradering av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag hudrodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. För identifiering av irriterande ämnen med LLNA har man utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (26) (27) också använt statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Det kan dock uppstå statistiskt signifikanta ökningar av örontjocklek som är mindre än 25 %, men dessa har inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (30) (32) (33) (34).

24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (35) (36) när de används som del av en helhetsbedömning och kan således ge indikation om den högsta dosnivå som ska användas i huvudundersökningen: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, minskning av kroppsvikten med mer än 5 % från dag 1 till dag 6 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt (37).

▼M3

Huvudundersökningens försöksschema

25. Försöksschemat är upplagt enligt följande:

— *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikt samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera 25 µl lämpligt utspätt testämne, ren vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen utförd positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer när det gäller punkterna 11–15) på båda öronens baksida.

— *Dagarna 2 och 3:* Upprepa applicering enligt dag 1.

— *Dagarna 4 och 5:* Ingen behandling.

— *Dag 6:* Registrera varje djurs vikt. Injicera 250 µl steril fosfatbuffrad saltlösning (PBS) som innehåller 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritierad (^{3}H)-metyltymidin i alla test- och kontrolldjur via svansvenen. Alternativt kan 250 µl steril PBS som innehåller 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jododeoxiuridin och 10^{-5}M fluorodeoxiuridin injiceras i alla testdjur via svansvenen. Avliva djuren skonsamt efter fem timmar. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje öra och behandla dem tillsammans i PBS för varje djur (metoden med individuellt djur), eller skär bort lymfnoderna från varje öra och poola dem i PBS för varje behandlingsgrupp (metoden med poolad behandlingsgrupp). Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (12). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

Beredning av cellsuspensioner

26. En suspension med enskilda celler bestående av lymfnodsceller (LNC) bilateralt utskurna från individuella djur eller från poolade behandlingsgrupper bereds genom försiktig mekanisk sönderdelning med hjälp av ett nät av rostfritt stål (200 mesh) eller annan godkänd teknik för beredning av en suspension med enskilda celler. Lymfnodscellerna tvättas två gånger med ett överskott PBS och DNA fälls ut med 5-procentig triklorättiksyra (TCA) vid 4 °C under 18 timmar (3). Fällningen återupplöses i 1 ml TCA och överförs till skintillationskärl med 10 ml skintillationsvätska för ^{3}H-räkning eller överförs direkt till gammaräkningsrör för ^{125}I-räkning.

Bestämning av cellproliferationen (radioaktivt innehåll)

27. Innehållet av ^{3}H-metyltymidin bestäms genom β-skintillationsräkning såsom sönderfallet per minut (DPM). Innehållet av ^{125}I-jododeoxiuridin bestäms genom ^{125}I-räkning och uttrycks även som DPM. Beroende på vilken metod som har valts uttrycks innehållet som DPM/djur (metod med individuella djur) eller DPM/behandlingsgrupp (metod med poolning).

Reducerat LLNA (rLLNA)

28. I situationer där det finns lagstiftade krav på att bekräfta negativ förutsägelse för hudsensibiliserande potential kan man använda rLLNA (16) (17) (18), dvs. ett protokoll med färre djur, förutsatt att alla andra LLNA-protokollspecifikationer följs enligt beskrivningen för denna testmetod. För användning av rLLNA krävs klara motiveringar och vetenskapliga belägg. Om resultaten är positiva eller tvetydiga kan det krävas ytterligare testning för att tolka eller förtydliga dem.

▼M3

29. Minskningen av antalet dosgrupper är den enda skillnaden mellan LLNA och rLLNA och den medför att man inte får information om dos-responsförhållande. Därför ska rLLNA inte användas om sådan information krävs. På samma sätt som med flerdos-LLNA ska testämneskoncentrationen för rLLNA vara den högsta koncentration som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller lokal hudirritation hos mössen (se punkt 18).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

30. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt, med individuella registreringar för varje mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion så att berörda djur kan avlivas (37).

Kroppsvikt

31. Enligt det som anges i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid testets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

32. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som stimulationsindex. När metoden med individuella djur används erhålls stimulationsindex genom att genomsnittligt DPM/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt DPM/djur för lösningsmedels-/vehikelkontrollgruppen. Värdet på genomsnittligt stimulationsindex för vehikelkontrollgrupperna är då 1. När poolning används erhålls stimulationsindex genom att dividera det poolade radioaktiva innehållet för varje testämnesgrupp med innehållet i den poolade vehikelkontrollgruppen, och resultatet är det genomsnittliga stimulationsindexet.

33. Ett resultat anses vara positivt när stimulationsindex $\geq$ 3. Man kan dock även använda dosresponsens styrka samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränsresultat ska anses vara positivt (4)(5)(6).

34. Vid behov kan de erhållna resultaten förtydligas ytterligare genom en granskning av testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig lokal hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna dos–responsförhållandet. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (7).

35. När radioaktivitetsdata samlas in för enskilda möss kan dessa data användas för en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden av dos–responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos–responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell vehikelkontrollgrupp). De statistiska analyserna kan t.ex. innehålla linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos–responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanförliggande värden).

▼M3

DATA OCH RAPPORTERING

Data

36. Data ska sammanställas i tabellform. När metoden med individuella djur används anges DPM-värden per individuellt djur, gruppens medelvärde för DPM per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella vehikelkontrollgruppen. När metoden med poolning används anges medel-/medianvärdet för DPM och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testrapport

37. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollämnen:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer om dessa är kända, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel:

— Identifieringsdata (renhet, koncentration [om tillämpligt], volym som har använts).

— Motivering för val av vehikel.

Testdjur:

— CBA-mössens ursprung.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antal djur och deras ålder.

— Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.

— Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).

— Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.

— Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll:

— Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, inklusive information om testämne, koncentration och vehikel.

— Testningslaboratoriets data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och negativa kontroller.

▼M3

— Om försöket inte omfattade parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat:

— Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd avlivning, såväl som medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.

— Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.

— En tabell med individuella värden per mus (metoden med individuella djur) eller medelvärde/medianvärde (metoden med poolning) och värden på stimulationsindex för varje behandlingsgrupp.

— Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för DPM per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp när metoden med individuella djur används.

— Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen djuren emellan både i testämnesgruppen och i kontrollgruppen när metoden med individuella djur används.

— Förhållandet mellan dos och respons.

— Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten:

— En kort kommentar om resultaten, dos–responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Kimber, I. och Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. och Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. och Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

(5) Chamberlain, M. och Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. och Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. och Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. och Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49–59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258–273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274–286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249–257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09–7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. och Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. och Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, april 2007. Finns på: http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication No 09–6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99–4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. och Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. och Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication No 10–7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 7:e uppl. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Finns på: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. *Toxicol*., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. och Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. och Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. och Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. och Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. och Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

Tillägg 1

Prestandastandarder för bedömning av föreslagna liknande eller modifierade LLNA-testmetoder för hudsensibilisering

INLEDNING

1. Syftet med prestandastandarder är att tillhandahålla en grund när man fastställer att nya testmetoder, både äganderättsligt skyddade (dvs. metoder med upphovsrätt, varumärke eller registrering) och allmänt tillgängliga metoder, är tillräckligt exakta och tillförlitliga för specifika testningsändamål. Dessa prestandastandarder, som grundar sig på validerade och godtagna testmetoder, kan användas för att utvärdera tillförlitligheten och exaktheten hos andra liknande metoder (vardagligt kallade ”me too”-test) som grundar sig på liknande vetenskapliga principer och som mäter eller förutser samma biologiska eller toxikologiska effekt (14).

2. Innan man antar modifierade metoder (dvs. föreslagna potentiella förbättringar av en godkänd testmetod) krävs en utvärdering för att fastställa de föreslagna ändringarnas inverkan på testets prestanda och i vilken utsträckning sådana förändringar påverkar den tillgängliga informationen för de andra komponenterna i valideringsprocessen. Beroende på de föreslagna ändringarnas antal och karaktär, genererade data och stödjande dokumentation för ändringarna, bör de antingen vara föremål för samma valideringsprocess som gäller för nya testmetoder eller, där det är lämpligt, för en begränsad bedömning av tillförlitlighet och relevans med användning av etablerade prestandastandarder (14).

3. När liknande eller modifierade metoder föreslås för användning inom denna testmetod bör deras tillförlitlighet och exakthet utvärderas med hjälp av kemikalier som representerar hela skalan av LLNA-utfall. För att omotiverad användning av djur ska undvikas rekommenderas starkt att de som utvecklar modeller först konsulterar lämpliga myndigheter innan valideringsstudier inleds enligt de prestandastandarder och den vägledning som anges i denna testmetod.

4. Dessa prestandastandarder baserar sig på de harmoniserade prestandastandarderna, US-ICCVAM (Förenta staterna), EC ECVAM (EG) och JaCVAM (Japan) (12), för utvärdering av validiteten hos liknande eller modifierade versioner av LLNA. Prestandastandarderna består av testmetodens grundläggande komponenter, rekommenderade referenskemikalier samt de standarder för exakthet och tillförlitlighet som en föreslagen metod minst måste uppfylla.

I. **Testmetodens grundläggande komponenter**

5. För att se till att liknande eller modifierade LLNA-metoder är funktionellt och mekaniskt analoga med LLNA och mäter samma biologiska verkan, måste testmetodprotokollet innehålla följande komponenter:

— Testämnet ska appliceras på mössens båda öron.

— Proliferationen av lymfocyter ska mätas i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras.

— Proliferationen av lymfocyter ska mätas under hudsensibiliseringens induktionsfas.

▼M3

— Den högsta dosen som väljs för ett testämne ska vara den högsta koncentrationen som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation hos mössen. För positiva referenskemikalier ska den högsta dosen vara minst lika hög som LLNA EC3-värdena för motsvarande referenskemikalier (se tabell 1) utan att det uppstår systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation hos mössen.

— Varje försök ska omfatta en parallell vehikelkontrollgrupp och, där det är lämpligt, en parallell positiv kontrollgrupp.

— Varje dosgrupp ska omfatta minst fyra djur.

— Insamlingen av data kan ske på individuell eller poolad grund.

Om något av dessa kriterier inte uppfylls kan dessa prestandastandarder inte användas för validering av en liknande eller modifierad metod.

II. **Minimiförteckning över referenskemikalier**

6. I de harmoniserade prestandastandarderna US-ICCVAM, EC-ECVAM och JaCVAM (12) anges 18 referenskemikalier som minst måste användas och 4 alternativa referenskemikalier (dvs. ämnen som ger antingen falska positiva eller falska negativa resultat i LLNA, jämfört med resultat från människor och marsvin [B.6 eller OECD:s testriktlinje 406] (13) och som därför ger möjlighet att påvisa samma eller bättre prestanda än LLNA) som ingår i prestandastandarderna för LLNA. För kemikalierna användes följande urvalskriterier:

— Förteckningen över referenskemikalier representerar de typer av ämnen som typiskt testas för sin hudsensibiliseringspotential och den responsskala som kan mätas eller förutses med LLNA.

— Ämnena har en väldefinierad kemisk struktur.

— LLNA-data från test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13) och (där det är möjligt) data från människor finns att tillgå för varje ämne.

— Ämnena kan enkelt införskaffas på marknaden.

De rekommenderade referenskemikalierna förtecknas i tabell 1. När de föreslagna referenskemikalierna används i ett försök ska de utvärderas i den vehikel som de förtecknas med i tabell 1. I situationer där ett förtecknat ämne inte finns att tillgå kan man använda andra ämnen som uppfyller urvalskriterierna, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.

▼M3

Tabell 1

Rekommenderade referenskemikalier för prestandastandarder för LLNA

Nummer	Kemikalie (1)	CAS-nummer	Form	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Faktisk EC3-skala	LLNA vs GP	LLNA vs människa
1	5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on (CMI)/2-metyl-4-isotiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/2682-20-4	Vätska	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Fast	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenylendiamin	106-50-3	Fast	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Koboltklorid	7646-79-9	Fast	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Vätska	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobensotiazol	149-30-4	Fast	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Vätska	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Vätska	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Vätska	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Fenylbensoat	93-99-2	Fast	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	Kanelalkohol	104-54-1	Fast	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinylurea	39236-46-9	Fast	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	Metylmetakrylat	80-62-6	Vätska	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	Klorbensen	108-90-7	Vätska	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Vätska	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Nummer	Kemikalie (1)	CAS-nummer	Form	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Faktisk EC3-skala	LLNA vs GP	LLNA vs människa
16	Mjölksyra	50-21-5	Vätska	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Metylsalicylat	119-36-8	Vätska	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Salicylsyra	69-72-7	Fast	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Alternativa ämnen för att påvisa bättre prestanda jämfört med LLNA										
19	Natriumlaurylsulfat	151-21-3	Fast	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	Etylenglykoldimetakrylat	97-90-5	Vätska	MEK	28	1	14–56	NC	+/–	+/+
21	Xylen	1330-20-7	Vätska	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ (**)	+/–
22	Nickelklorid	7718-54-9	Vätska	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Förkortningar: AOO = aceton:olivolja (4:1, volym/volym), CAS-nummer = Chemical Abstracts Service-nummer, DMF = *N,N*-dimetylformamid, DMSO = dimetylsulfoxid, DNCB = 2,4-dinitroklorbensen, EC3 = uppskattad koncentration som krävs för att få stimulationsindex 3, Fast = fast ämne, GP = testresultat från marsvin (dvs. B.6 eller OECD:s testriktlinje 406) (13), HCA = hexylkanelaldehyd, LLNA = resultat från murint lokalt lymfnodtest (dvs. B.42 eller OECD:s testriktlinje 429) (1), MEK = metyletylketon, NA = inte tillämpligt eftersom stimulationsindex < 3, NC = ej beräknat eftersom data erhölls från ett enskilt försök, Veh = testvehikel, Vätska = ämne i vätskeform.

(*) Antas inte vara sensibiliserande för människor eftersom inga resultat från kliniska lapptest kunde fås fram, ämnet ingår inte som en allergen i lapptest och inga rapporter om sensibilisering hos människa kunde fås fram.

(**) GP-data finns inte att tillgå.

(1) Kemikalierna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

(2) Eftersom olika vehiklar potentiellt kan påverka LLNA-testprestanda bör endast den rekommenderade vehikeln för respektive referenskemikalie användas (24) (32).

(3) Medelvärde i fall där flera EC3-värden fanns att tillgå. För negativa ämnen (dvs. med stimulationsindex < 3) anges den högsta testade koncentrationen.

(4) Antalet LLNA-försök från vilka data erhållits.

(5) Kommersiellt tillgängligt som Kathon CG (CAS-nummer 55965-84-9), som är en 3:1-blandning av CMI and MI. De relativa koncentrationerna för varje komponent varierar från 1,1 % till 1,25 % (CMI) och 0,3 % till 0,45 % (MI). De inaktiva komponenterna är magnesiumsalter (21,5 % till 24 %) och kopparnitrat (0,15 % till 0,17 %), och den återstående formuleringen är 74–77 % vatten. Kathon CG fås från Sigma-Aldrich och Rohm and Haas (numera Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Definierad tillförlitlighet och standarder för exakthet**

7. Exaktheten hos en liknande eller modifierad LLNA-metod ska vara samma som eller högre än för prestandastandarderna för LLNA när utvärderingen görs med det minsta tillåtna antalet (18) referenskemikalier. Den nya eller modifierade metoden bör ge korrekt klassificering enligt en ja-/nej-beslutsväg. Det kan dock hända att den nya eller modifierade metoden inte ger korrekt klassificering av alla de kemikalier som minst måste användas. Om t.ex. ett av de svaga sensibiliserande ämnena klassificeras fel, kan en motivering för felklassificeringen och lämpliga tilläggsuppgifter (t.ex. testresultat som ger korrekt klassificering för andra ämnen med liknande fysikaliska, kemiska och sensibiliserande egenskaper) anses påvisa likvärdiga prestanda. Under sådana omständigheter utvärderas valideringsstatus för den nya eller modifierade LLNA-testmetoden från fall till fall.

Reproducerbarhet inom laboratoriet

8. För bestämning av reproducerbarheten inom ett laboratorium ska en ny eller modifierad LLNA-metod utvärderas med ett sensibiliserande ämne som är väl karakteriserat i LLNA. Prestandastandarderna för LLNA grundar sig därför på hur resultaten varierar mellan upprepade testningar av hexylkanelaldehyd. För bedömning av tillförlitligheten inom laboratoriet bör värden för uppskattad koncentrationströskel (ECt) för hexylkanelaldehyd härledas vid fyra separata tillfällen med minst en vecka mellan testningarna. Reproducerbarheten inom laboratoriet anses vara godtagbar om varje hexylkanelaldehydtest ger ECt-värden mellan 5 % och 20 %, vilket representerar skalan 0,5–2,0 gånger det medelvärde för EC3 som specificeras för hexylkanelaldehyd (10 %) i LLNA (se tabell 1).

Reproducerbarhet mellan laboratorier

9. För bestämning av reproducerbarheten mellan laboratorier bör en ny eller modifierad LLNA-metod utvärderas med två sensibiliserande ämnen som är väl karakteriserade i LLNA. Prestandastandarderna för LLNA grundar sig på variationerna i resultat från testning av hexylkanelaldehyd och 2,4-dinitroklorbensen (DNCB) i olika laboratorier. ECt-värdena bör tas fram genom enskilda fristående försök i minst tre separata laboratorier. Reproducerbarheten mellan laboratorier anses vara godtagbar om varje laboratorium får ECt-värden som är 5–20 % för hexylkanelaldehyd och 0,025–0,1 % för 2,4-dinitroklorbensen, vilket representerar skalan 0,5–2,0 gånger det EC3-medelvärde som specificeras för hexylkanelaldehyd (10 %) och 2,4-dinitroklorbensen (0,05 %) i LLNA (se tabell 1).

▼M3

Tillägg 2

Definitioner

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (14).

Referensämne: Sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) En eller flera enhetliga och tillförlitliga källor. ii) Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas. iii) Kända fysikalisk-kemiska egenskaper. iv) Stödjande data om kända effekter. v) Känd styrka inom det avsedda responsområdet.

Uppskattad koncentrationströskel (ECt): Uppskattad testämneskoncentration som krävs för att ge ett stimulationsindex som tyder på positiv respons.

Uppskattad koncentration tre (EC3): Uppskattad testämneskoncentration som krävs för att ge värdet tre för stimulationsindex.

Falskt negativt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod trots att ämnet i själva verket är positivt eller aktivt.

Falskt positivt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod trots att ämnet i själva verket är negativt eller icke-aktivt.

Fara: Potentialen för skadliga verkningar på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (14).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll.

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för en testmetod som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. En sådan testmetod kan vara en kandidat för jämförande validering. Kallas även ”liknande testmetod” (14).

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde (”outlier”) är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

▼M3

Prestandastandarder (PS): Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är funktionellt och mekaniskt likartad. Dessa standarder omfattar i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande och iii) de liknande nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som den föreslagna testmetoden bör påvisa när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (14).

Äganderättsligt skyddad testmetod: En testmetod vars tillverkning och distribution begränsas genom patent, upphovsrätter, varumärken och dylikt.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Referenskemikalier: Kemikalier som valts för användning i valideringsprocessen och för vilka responsen i *in vitro*- eller *in vivo*-referenstestsystem eller på de berörda arterna är känd. Kemikalierna bör vara representativa för de kemikalieklasser som testmetoden är avsedd för och bör representera hela skalan av respons som kan förväntas för de kemikalier som testas med metoden, från stark till svag till negativ. Det kan krävas olika uppsättningar referenskemikalier för valideringsprocessens olika skeden och för olika testmetoder och testanvändningar (14).

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods exakthet (konkordans) (14).

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (14).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Validerad testmetod: En testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (14).

▼B

B.43 **TEST AVSEENDE NEUROTOXICITET PÅ GNAGARE**

1. **METOD**

Denna metod motsvarar OECD TG 424 (1997).

Med testmetoden fås information som bekräftar eller ytterligare karakteriserar en kemikalies förmåga att framkalla neurotoxicitet hos vuxna djur. Testmetoden kan kombineras med tidigare metoder för toxicitetstest med upprepad dos eller den kan användas separat. Det rekommenderas att OECD:s vägledning om strategier och metoder rörande testning av neurotoxicitet (se hänvisning 1) används som hjälp när man utformar försök som baserar sig på denna testmetod. Detta är särskilt viktigt när man överväger modifikationer av testmetodens normala observationer och förfaranden. OECD:s vägledning är avsedd som hjälp vid valet av alternativa testförfaranden som kan behövas i specifika omständigheter.

Metoden omfattar inte bedömningen av utvecklingsneurotoxicitet.

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper är det viktigt att ta hänsyn till kemikaliens förmåga att framkalla neurotoxiska verkningar. Redan i metoden för test avseende systemisk toxicitet med upprepad dos ingår observationer avsedda att påvisa förmågan att framkalla neurotoxicitet. Med hjälp av föreliggande testmetod kan man få ytterligare information om eller bekräfta de neurotoxiska verkningar som har observerats vid undersökning av systemisk toxicitet med upprepad dos. För vissa klasser av kemikalier kan en analys av förmågan att framkalla neurotoxicitet tyda på att det är lämpligare att använda föreliggande metod direkt, och inte bygga på indikationer på neurotoxicitet från undersökningar av systemisk toxicitet med upprepad dos. En sådan analys kan omfatta exempelvis följande:

— des signes de neurotoxicité ou des lésions neuropathologiques sont observés dans des études de toxicité autres que des études de toxicité systémique à dose répétée, ou

— Strukturellt släktskap eller annan information som länkar kemikalien i fråga till ämnen med känd neurotoxicitet.

Det kan även finnas andra tillfällen då det är lämpligt att använda föreliggande testmetod (se hänvisning 1).

Metoden har utformats så att den kan anpassas till särskilda behov att bekräfta en kemikalies specifika histopatologiska och beteenderelaterade neurotoxicitet, eller ge en möjlighet att karakterisera och kvantifiera neurotoxisk respons.

▼B

Tidigare likställdes neurotoxicitet med neuropati som inbegriper neuropatologiska skador eller neurologiska funktionsstörningar såsom förlamning, paralys eller tremor. Även om neuropati är en betydande manifestation av neurotoxicitet, vet man numera att det finns många andra tecken på nervsystemtoxicitet (förlust av motorisk koordination, sensoriska brister, inlärnings- och minnesstörningar), vilka inte alltid kommer fram vid undersökning av neuropati eller andra slags studier.

Syftet med föreliggande testmetod är att få fram betydande neurobeteenderelaterade och neuropatologiska verkningar hos vuxna gnagare. Trots att beteenderubbningar, även i frånvaron av morfologiska ändringar, kan tyda på skadliga verkningar på organismen, är dock inte alla beteenderubbningar specifika för nervsystemet. Alla observerade ändringar bör därför utvärderas tillsammans med korrelativa histopatologiska, hematologiska eller biokemiska data samt data om andra typer av systemisk toxicitet. Den testmetod som beskrivs här och vars syfte är att karakterisera och kvantifiera neurotoxisk respons inbegriper specifika histopatologiska och beteenderelaterade förfaranden som ytterligare kan kompletteras med elektrofysiologiska och/eller biokemiska undersökningar (se hänvisning 1, 2, 3 och 4).

Neurotoxiska ämnen kan verka på flera olika mål inom nervsystemet och genom flera olika mekanismer. Så länge som det inte finns ett enda system med vars hjälp alla ämnen kunde testas på djupet med avseende på neurotoxicitet, kan det vara nödvändigt att använda andra *in vivo*- eller *in vitro*-test som är specifika för den typ av neurotoxicitet som observeras eller förväntas.

Föreliggande testmetod kan även, i kombination med OECD:s vägledning om strategier och metoder rörande testning av neurotoxicitet (se hänvisning 1), användas som grund för test där man vill ytterligare karakterisera eller öka känsligheten hos dosresponskvantifieringen, och på så sätt få en bättre uppskattning av nivån för inga påvisbara skadliga verkningar eller bekräfta en kemikalies kända eller misstänkta skadliga verkningar. Man kan exempelvis utforma test för identifiering och utvärdering av de neurotoxiska mekanismerna eller test vars resultat kompletterar tillgängliga data från tidigare grundläggande observationer rörande neurobeteende och neuropatologi. Sådana test behöver inte ge samma resultat som kan fås med de standardförfaranden som rekommenderas i föreliggande metod, till den del dessa data redan finns och inte kan anses vara nödvändiga för tolkning av resultaten.

Detta neurotoxicitetstest ger, fristående eller som del av en kombination, följande möjligheter:

— Identifiera om nervsystemet påverkas permanent eller tillfälligt av den kemikalie som testas.

— Bidra till karakteriseringen av de nervsystemrubbningar som hör samman med exponering för kemikalien, och skapa en förståelse för de underliggande mekanismerna.

▼B

— Bestämma dos- och tid-responsförhållanden i syfte att uppskatta en nivå där inga verkningar kan påvisas (och som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för kemikalien).

Vid test enligt denna metod används oral tillförsel av testämnet. Det kan vara lämpligare med andra tillförselvägar (exempelvis via huden eller inandning). I förekommande fall måste då eventuellt de rekommenderade förfarandena modifieras. Överväganden om valet av tillförselväg ska basera sig på profilen för exponering på människor och tillgänglig toxikologisk eller kinetisk information.

1.2 DEFINITIONER

Skadlig verkning: Varje sådan behandlingsrelaterad avvikelse från normaltillståndet som minskar organismens förmåga att överleva, föröka sig eller anpassa sig till omgivningen.

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), vikten testämne per viktenhet försöksdjur (exempelvis mg/kg) eller en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: Ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

Neurotoxicitet: En skadlig förändring i nervsystemets struktur eller funktion till följd av exponering för ett kemiskt, biologiskt eller fysikaliskt ämne.

Neurotoxiskt ämne: Varje kemiskt, biologiskt eller fysikaliskt ämne som har förmågan att framkalla neurotoxicitet.

NOAEL: Förkortning för ”no-observed-adverse-effect level” (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Detta är den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs oralt i ett urval doser till flera grupper med laboratoriegnagare. I regel behövs upprepade doser. Doseringsschemat kan gälla subakut toxicitet (28 dagar), subkronisk toxicitet (90 dagar) eller kronisk toxicitet (1 år eller längre). Förfarandet som beskrivs här kan även användas för undersökning av akut neurotoxicitet. Djuren testas i syfte att få fram eller karakterisera beteenderelaterade och/eller neurologiska rubbningar. Under observationsperioderna görs bedömning av ett antal beteenden som kan påverkas av neurotoxiska ämnen. Efter avslutat test tas en undergrupp per kön från varje grupp för perfusion *in situ,* och snitt av hjärna, ryggrad och perifera nerver prepareras och undersöks.

Om testet görs fristående i syfte att påvisa neurotoxicitet eller karakterisera neurotoxiska verkningar, kan de djur som inte har använts för perfusion och efterföljande histopatologi (se tabell 1) användas för specifika undersökningar av neurobeteende, neuropatologi, neurokemi eller elektrofysiologi. Resultaten från sådana undersökningar kan komplettera data som fås med den föreliggande metodens standardundersökningar (se hänvisning 1). Tilläggsundersökningar kan vara till särskilt stor nytta i fall där empiriska observationer eller de förväntade verkningarna tyder på att en kemikalies neurotoxicitet är av en specifik typ eller har ett specifikt mål. Alternativt kan de återstående djuren användas för bedömningar som bygger på metoderna för toxicitetstest med upprepad dos på gnagare.

▼B

När test enligt denna metod kombineras med test enligt andra metoder måste djurens antal vara tillräckligt för att observationskraven ska uppfyllas för båda testerna.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Rekommenderad gnagare är råtta. Om testet utförs med andra gnagare bör detta motiveras. Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Doseringen bör i regel inledas så snart som möjligt efter avvänjningen, helst inte senare än vid sex veckors ålder och under alla omständigheter innan djuren fyllt nio veckor. När testet kombineras med andra test måste denna faktor eventuellt anpassas. Vid testets början får variationen i vikt mellan de använda djuren inte överstiga ±20 % av vardera könets medelvikt. Om ett kortvarigt test med upprepad dos utförs som inledning till ett långtidstest måste djur från samma stam och ursprung användas vid båda testerna.

1.4.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Periodiska höga ljud bör minimeras. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Om tillförseln görs genom fodret, kan valet av foder kan påverkas av behovet att säkerställa en lämplig blandning med testämnet. Djuren kan inhysas individuellt eller i burar med små grupper av samma kön.

1.4.3 **Förberedelse av djuren**

Friska unga djur fördelas slumpvis i behandlings- och kontrollgrupper. Burarna placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Djuren förses med individuell märkning och hålls i sina burar under minst 5 dagar före försökets start så att de får acklimatisera sig till laboratoriets betingelser.

1.4.4 **Tillförselväg och beredning av doserna**

Denna testmetod är särskilt avsedd för oral tillförsel av testämnet. Den orala tillförseln kan göras genom sond, foder, dricksvatten eller kapsyler. Om andra tillförselvägar används (exempelvis via huden eller inandning) måste eventuellt de förfaranden som rekommenderas enligt metoden modifieras. Överväganden om valet av tillförselväg ska basera sig på profilen för exponering på människor och tillgänglig toxikologisk eller kinetisk information. Motivering bör ges för valet av tillförselväg liksom även en redogörelse för eventuella modifikationer av testmetodens förfaranden.

▼B

Vid behov kan testämnet upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljesuspension (exempelvis majsolja) och därefter eventuell lösning eller suspension i andra vehiklar. Vehikelns toxiska egenskaper måste vara kända. Dessutom bör hänsyn tas till följande egenskaper hos vehikeln: Verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet till den del dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på testdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.5 FÖRFARANDEN

1.5.1 **Djurens antal och kön**

När testet utförs fristående bör minst 20 djur (10 honor och 10 hanar) användas i varje dos- och kontrollgrupp med tanke på utvärderingen av detaljerade kliniska och funktionella observationer. Minst fem hanar och fem honor som har valts ut bland dessa tio hanar och tio honor bör vid testets slut perfuseras *in situ* och användas för detaljerad neurohistopatologi. Om endast ett begränsat antal djur i en given dosgrupp observeras med avseende på tecken på neurotoxiska verkningar bör man överväga att införliva dessa djur i det urval som perfuseras. Om testet utförs i kombination med toxicitetstest med upprepad dos, bör djurens antal vara tillräckligt för att båda testernas syfte ska uppnås. Minimiantalet djur per grupp för olika testkombinationer anges i bilaga 1. Om man planerar avlivningar under testets gång eller återhämtningsgrupper för observation av reversibilitet, varaktighet eller fördröjd start för de toxiska verkningarna efter doseringen, eller om man planerar tilläggsobservationer, bör antalet djur ökas i syfte att säkerställa tillgången till nödvändigt antal djur för observation och histopatologi.

1.5.2 **Doserings- och kontrollgrupp**

I regel bör minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp användas. Om analys av tillgängliga data tyder på att inga verkningar förväntas vid en upprepad dos på 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag, kan ett gränstest utföras. Om det inte finns lämpliga data att tillgå kan ett inledande test utföras som hjälp för bestämning av doserna. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används för tillförsel av testämnet bör kontrollgruppen få vehikeln i den största volym som används.

1.5.3 **Tillförlitlighetskontroll**

Testningslaboratoriet bör redogöra för laboratoriets kompetens att utföra försöket samt för känsligheten hos de förfaranden som används. Redogörelsen bör ge belägg för förmågan att detektera och kvantifiera förändringar i de olika ändpunkter som rekommenderas för observation (autonoma tecken, sensorisk reaktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet). Information om kemikalier som orsakar olika typer av neurotoxisk respons och som kan användas som positivkontrollämnen finns i hänvisning 2–9. Historiska data kan användas förutsatt att testförfarandena till väsentliga delar förblir desamma. Periodisk uppdatering av historiska data rekommenderas. Om det testande laboratoriet gör ändringar av testförloppet eller testets förfaranden bör laboratoriet lägga fram nya data som ger belägg på förfarandenas fortsatta känslighet.

▼B

1.5.4 **Val av dos**

Dosnivåerna bör väljas med hänsyn tagen till alla tillgängliga tidigare data om observerad toxicitet och kinetik för testämnet och närbesläktade material. Den högsta dosnivån bör väljas så att den framkallar neurotoxiska verkningar eller tydliga systemiska toxiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad respons kan påvisas, och samtidigt så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) kan observeras på den lägsta dosnivån. Dosnivåerna bör väljas så att primära toxiska verkningar på nervsystemet kan särskiljas från verkningar som härrör från systemisk toxicitet. Det är ofta optimalt med 2–3 intervall, och tillägg av en fjärde testgrupp är ofta att föredra framför användning av mycket breda intervall (exempelvis mer än faktorn 10) mellan dosnivåerna. Hänsyn bör tas till en eventuellt existerande skälig uppskattning av exponering på människor.

1.5.5 **Gränstest (limit test)**

Om ett test med en dosnivå på minst 1 000 mg per kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga neurotoxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Om det är sannolikt att människor kommer att utsättas för exponering måste eventuellt en högre dosnivå (oralt) användas vid gränstestet. För andra former av tillförsel, såsom inandning eller applicering på huden, kan testämnets fysikalkemiska egenskaper ofta utnyttjas för att indikera och begränsa den maximala exponeringsnivån. För ett test avseende akut toxicitet oralt bör gränstestets dos vara minst 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Tillförsel av doser**

Djuren doseras dagligen med testämnet, 7 dagar i veckan under minst 28 dagar. Om doseringen görs 5 dagar i veckan eller under en kortare period bör detta motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på testdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt. I fråga om vattenlösningar får dock volymer på upp till 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkningar vid högre koncentrationer bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

För ämnen som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i mängder som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. När ett ämne tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tid varje dag, och vid behov justeras dosen så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett test med upprepad dos används som inledning till ett långtidstest måste samma foder användas vid båda testningarna. Om det inte är möjligt med en engångsdos vid test avseende akut toxicitet, kan dosen tillföras i mindre delar över en period som inte överskrider 24 timmar.

▼B

1.6 OBSERVATIONER

1.6.1 **Frekvens för observationer och tester**

Vid test med upprepad dos bör observationsperioden vara lika lång som doseringsperioden. Vid test avseende akut toxicitet bör djuren observeras i ytterligare 14 dagar efter doseringsperiodens slut. För djur i satellitgrupper som inte exponeras under en period efter behandlingen, bör observationerna även täcka denna period.

Observationerna bör göras tillräckligt ofta för att maximera sannolikheten för upptäckt av beteenderelaterade och/eller neurologiska avvikelser. Observationerna bör helst göras vid samma tid varje dag, med hänsyn tagen till när man förväntar sig de starkaste verkningarna efter doseringen. En översikt av frekvensen för kliniska och funktionella observationer finns i tabell 2. Om kinetiska eller andra data från tidigare studier tyder på avvikande tidpunkter för observationer, prov eller förlängda observationsperioder, bör schemat anpassas så att maximal information erhålls. Motivering bör ges för alla ändringar av schemat.

1.6.1.1 *Observationer av allmänt hälsotillstånd och mortalitet/morbiditet*

Alla djur bör observeras omsorgsfullt minst en gång per dag med avseende på hälsotillstånd och minst två gånger per dag med avseende på morbiditet och mortalitet.

1.6.1.2 *Detaljerade kliniska observationer*

Detaljerade kliniska observationer bör göras på alla djur som har valts ut för detta ändamål (se tabell 1), en gång före den första exponeringen (för att få en jämförelsegrund per djur) och därefter med olika tidsintervall beroende på testets varaktighet (se tabell 2). Detaljerade kliniska observationer av återhämtningen i satellitgrupper bör göras i slutet återhämtningsperioden. De kliniska observationerna bör göras utanför buren på en standardarena. Observationerna bör registreras omsorgsfullt med hjälp av ett poängsystem som inbegriper kriterier eller poängskalor för varje mätning. Testningslaboratoriet bör tydligt ange vilka kriterier eller skalor som har använts. Det är viktigt att säkerställa att variationerna i testbetingelserna är minimala (inte systematiskt relaterade till behandlingen) och att observationerna görs av en kompetent person som inte känner till den aktuella behandlingen.

Det rekommenderas att observationerna genomförs på ett strukturerat sätt där väldefinierade kriterier (inbegripet definition av området för normal) systematiskt tillämpas på varje djur vid varje observationstidpunkt. Området för normal bör dokumenteras på tillbörligt sätt. Alla observerade tecken bör registreras. I tillämplig mån bör även omfattningen av de observerade tecknen registreras. De kliniska observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster och/eller andning genom munnen, alla ovanliga tecken rörande urinering eller defekation samt missfärgning av urinen).

▼B

Registreringarna bör även omfatta all ovanlig respons rörande kroppsställning, aktivitetsnivå (exempelvis minskad eller ökad utforskning av standardarenan) och rörelsekoordinationen. Förändringar i gång (exempelvis vaggande gång, ataxi), kroppsställning (exempelvis kutad rygg) och respons på hantering, placering eller andra omgivningsstimuli, liksom eventuella kloniska eller toniska rörelser, konvulsioner eller skälvningar, stereotypier, (exempelvis överdrivet putsande, ovanliga huvudrörelser, upprepat cirklande) eller bisarrt beteende (exempelvis bitning eller överdrivet slickande, självstympning, bakåtgång, utstötning av ljud) eller aggressioner bör registreras.

1.6.1.3 *Funktionella observationer*

Liksom i fråga om de kliniska observationerna bör funktionella observationer göras en gång före exponeringen och därefter med tillbörlig frekvens på alla djur som har valts ut för detta ändamål (se tabell 1). Frekvensen för de funktionella observationerna beror även på testets varaktighet (se tabell 2). Utöver de observationsperioder som anges i tabell 2 bör satellitgrupper för återhämtning bli föremål för funktionella observationer så nära avlivningen som möjligt. De funktionella observationerna bör omfatta sensorisk reaktion på olika slags stimuli, exempelvis hörsel-, syn- och djupsensoriska stimuli (se hänvisning 5, 6 och 7), bedömning av greppstyrka (se hänvisning 8) och bedömning av motorisk aktivitet (se hänvisning 9). Den motoriska aktiviteten bör mätas med automatiserad utrustning som kan detektera både minskningar och ökningar av aktiviteten. Om något annat definierat system används bör detta vara kvantitativt och dess känslighet och tillförlitlighet bör påvisas. Alla apparater bör testas med avseende på tillförlitlighet över tiden och enhetliga resultat från olika apparater. Närmare uppgifter om lämpliga förfaranden finns i respektive hänvisning. Om det inte finns några data (exempelvis struktur-aktivitet, epidemiologiska data, tidigare toxikologiska test) som tyder på förmågan att framkalla neurotoxiska verkningar, bör man överväga att införliva mer specialiserade observationer av sensorisk och motorisk funktion eller inlärning och minne, för att undersöka dessa eventuella verkningar närmare. Mer information om specialiserade observationer och hur de görs finns i hänvisning 1.

Undantagsvis kan djur som uppvisar så svåra tecken på toxicitet att de i betydande mån skulle störa de funktionella observationerna utelämnas från dessa. Om djur utelämnas från de funktionella observationerna bör detta motiveras.

1.6.2 **Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion**

Vid test som varar upp till 90 dagar bör alla djur vägas minst en gång per vecka och foderkonsumtionen bör mätas (vattenkonsumtionen i de fall då testämnet tillförs i vattnet) minst varje vecka. Vid långtidstest bör alla djur vägas minst en gång per vecka under de första 13 veckorna och därefter minst var fjärde vecka. Foderkonsumtionen (vattenkonsumtionen i de fall då testämnet tillförs i vattnet) bör mätas minst varje vecka under de första 13 veckorna och därefter ungefär var tredje månad, utom om förändringar i hälsotillstånd eller kroppsvikt motiverar ett annat schema.

▼B

1.6.3 **Oftalmologi**

Vi test som varar längre än 28 dagar bör djuren, innan testämnet tillförs och vid testets slut, undersökas oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men minst djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om ögonförändringar upptäcks, eller om kliniska tecken motiverar det, bör alla djur undersökas. Vid långtidstest bör oftalmologisk undersökning göras även när testet varat 13 veckor. Oftalmologisk undersökning behöver inte göras om det redan finns tillgång till data från tidigare gjorda test av liknande varaktighet och vid liknande dosnivåer.

1.6.4 **Hematologi och klinisk biokemi**

När testet avseende neurotoxicitet utförs i kombination med test avseende systemisk toxicitet med upprepad dos, bör hematologiska undersökningar och klinisk-biokemiska bestämningar göras enligt det som gäller för testet avseende systemisk toxicitet. Provtagningen bör göras på sådant sätt att alla potentiella verkningar på det neurologiska beteendet minimeras.

1.6.5 **Histopatologi**

Den neuropatologiska undersökningen bör utformas så att den kompletterar och utökar de observationer som har gjorts under testets *in vivo*-fas. Vävnad från minst fem djur per kön och grupp (se tabell 1 och nästa avsnitt) bör fixeras *in situ* med hjälp av allmänt erkänd perfusions- och fixeringsteknik (se kapitel 5 i hänvisning 3 och kapitel 50 i hänvisning 4). Alla observerade betydande förändringar bör registreras. Om testet utförs fristående i syfte att påvisa neurotoxicitet eller karakterisera neurotoxiska verkningar, kan återstoden av djuren användas för specifika undersökningar av neurobeteende (se hänvisning 10 och 11), neuropatologi (se hänvisning 10, 11, 12 och 13), neurokemi (se hänvisning 10, 11, 14 och 15) eller elektrofysiologi (se hänvisning 10, 11, 16 och 17) i den mån sådana undersökningar kan komplettera de förfaranden och undersökningar som beskrivs i denna metod. Återstoden kan även utnyttjas för att få fler djur för de histopatologiska undersökningarna. Dessa tilläggsförfaranden kan vara särskilt motiverade i fall där empiriska observationer eller förväntade verkningar tyder på att en kemikalies neurotoxicitet är av en specifik typ eller har ett specifikt mål (se hänvisning 2 och 3). Alternativt kan återstoden av djuren användas för rutinmässiga patologiska bedömningar enligt det som beskrivs i metoden för test med upprepad dos.

All vävnad som inbäddats i paraffin bör färgas med ett standardförfarande (såsom hematoxylin och eosin), och därefter undersökas i mikroskop. Om tecken på perifer neuropati observeras eller misstänks, bör plastinbäddade prover av perifer nervvävnad undersökas. De kliniska tecknen kan också ge indikationer på ytterligare objekt som bör undersökas eller på behovet att använda speciella färgningsförfaranden. Vägledning om ytterligare undersökningsobjekt finns i hänvisning 3 och 4. Det kan också vara motiverat med vissa specialfärgmedel i syfte att påvisa specifika typer av patologiska förändringar (se hänvisning 18).

▼B

Representativa snitt av centrala och perifera nervsystemet bör undersökas histologiskt (se kapitel 5 i hänvisning 3 och kapitel 50 i hänvisning 4). De områden som i regel ska undersökas inbegriper framhjärnan, centrum av storhjärnan, inbegripet ett snitt genom hippocampus, mitthjärnan, lillhjärnan, hjärnbryggan, förlängda märgen, ögat med synnerv och näthinna, ryggraden vid nacken och ländryggen, dorsala rotganglier, dorsala och ventrala rotfibrer, proximala ischiasnerven, proximala tibialnerven (vid knät) och tibialnervens vadmuskelförgrening. De snitt som görs av ryggraden och perifera nerver bör inbegripa diagonala, transversala och längsgående snitt. Uppmärksamhet bör fästas vid nervsystemets vaskulatur. Likaså bör man undersöka ett skelettmuskelprov, särskilt vadmuskeln. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid sådana punkter i centrala och perifera nervsystemet som har cellulär och fibrös struktur och mönster och som man vet att särskilt påverkas av neurotoxiska ämnen.

Vägledning om neuropatologiska förändringar som typiskt uppstår efter exponering av toxiska ämnen finns i hänvisning 3 och 4. För vävnadsproverna rekommenderas en stegvis undersökning där snitt från djuren i högdosgruppen först jämförs med snitt från djuren i kontrollgruppen. Om inga neuropatologiska förändringar kan iakttas i proverna från dessa grupper behövs inga ytterligare analyser. Om neuropatologiska förändringar kan iakttas i högdosgruppen bör prover av alla potentiellt påverkade vävnader från mellandos- och lågdosgruppen kodas och undersökas.

Om tecken på neuropatologiska förändringar kan iakttas vid den kvalitativa undersökningen bör en tilläggsundersökning göras på nervsystemets alla regioner som uppvisar sådana förändringar. Snitt från djuren i alla dosgrupper, från alla potentiellt påverkade regioner bör kodas och undersökas randomiserat av personer som inte känner till koden. Frekvens och allvarlighetsgrad bör registreras för alla skador. Efter bedömning av alla regioner från alla dosgruppers djur avtäcks koderna, och en statistisk analys genomförs för utvärdering av förhållandet mellan dos och respons. För varje skada bör man beskriva exempel på olika allvarlighetsgrader.

De neuropatologiska fynden bör utvärderas med hänsyn tagen till resultaten från observationer och mätningar av beteende, liksom även till övriga data från tidigare och parallella tester av det berörda ämnets systemiska toxicitet.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla data sammanfattas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp eller kontrollgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testets gång eller som avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande inbegripet avlivningstidpunkterna, antalet djur som visat tecken på toxicitet, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador samt skadornas typ och allvarlighetsgrad.

▼B

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Alla fynd bör utvärderas med avseende på förekomst, allvarlighetsgrad och korrelationen mellan neurobeteenderelaterade och neuropatologiska verkningar (även neurokemiska eller elektrofysiologiska verkningar, om tilläggsundersökningar ingår) samt alla andra skadliga verkningar som har observerats. Om möjligt bör de numeriska resultaten utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna bör fastställas vid utformningen av testet.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Testämne:

— Fysikalisk natur (inbegripet isomerism, renhet och fysikalkemiska egenskaper).

— Identifieringsdata.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för valet av vehikel.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsbetingelser, acklimatisering, foder och dylikt.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

— Utförliga uppgifter om testämnets sammansättning och beredning av fodret, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.

— Specifikation av de tillförda doserna, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda materialets fysikaliska form.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Motivering för val av dosnivåer.

— Motivering för tillförselväg och exponeringens varaktighet.

— Omräkning av testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos (mg per kg kroppsvikt och dag), om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Observation och testförfaranden:

— Uppgifter om hur djuren i de olika grupperna varje grupp har valts ut för perfusionsundergrupperna.

— Uppgifter om poängsättningssystem, inbegripet kriterier och poängskalor för varje mätning inom de detaljerade kliniska observationerna.

▼B

— Uppgifterna om de funktionella observationerna rörande sensorisk reaktivitet på olika slags sti muli (exempelvis hörsel, syn och djupsensoriska), bedömning av greppstyrka, bedömning av motorisk aktivitet (inbegripet uppgifter om den automatiska utrustning som använts) och övriga förfaranden som använts.

— Uppgifter om oftalmologiska undersökningar och, i förekommande fall, hematologiska undersökningar och klinisk-biokemiska test med relevanta basvärden.

— Uppgifter om specifika neurobeteenderelaterade, neuropatologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska förfaranden.

Resultat:

— Kroppsvikt och förändringar i kroppsvikt, inbegripet kroppsvikten vid avlivningen.

— Foderkonsumtion och vattenkonsumtion, enligt det som är relevant.

— Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet eller mortalitet.

— Art, grad och varaktighet (tidpunkten för när de sätter in och hur de därefter utvecklas) för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte).

— En detaljerad beskrivning av resultaten från alla funktionella observationer.

— Obduktionsfynd.

— En utförlig beskrivning av alla neurobeteenderelaterade, neuropatologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska fynd, i tillämpliga fall.

— Data om absorption och metabolism, om sådana finns tillgängliga.

— Statistisk behandling av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten:

— Information om dosrespons.

— Vilken betydelse eventuella andra toxiska verkningar har för en slutsats rörande testämnets neurotoxiska förmåga.

— Nivå där inga skadliga verkningar observeras (NOAEL).

Slutsatser:

— Ett specifikt uttalande om testämnets övergripande neurotoxicitet kan gärna ingå.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. ”OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods”, OECD, Paris (under beredning).

2. ”Test Guidline for a Developmental Neurotoxicitu Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals” (under beredning).

3. World Health Organization (WHO) (1986), ”Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals”.

4. P.S. Spencer och H.H. Schaumburg (1980), ”Experimental and Clinical Neurotoxicology”, red. P.S. Spencer och H.H. Schaumburg, *Williams and Wilkins,* Baltimore/London.

▼B

5. D.E. och R.B. Wallace (1980), ”Utility of the Neurological Examination in Rats”, *Acta Neurobiol. Exp.,* 40, 999–1003.

6. S.C. Gad (1982), ”A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology”, J. *Toxicol. Environ. Health,* 9, 691–704.

7. V.C. Moser, K.M. McDaniel och P.M. Phillips (1991), ”Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz”, *Toxic. Appl. Pharmacol.,* 108, 267–283.

8. O.A. Meyer, H.A. Tilson, W.C. Byrd och M.T. Riley (1979), ”A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice”, *Neurobehav. Toxicol., 1,* 233–236.

9. K.M. Crofton, J.L. Haward, V.C. Moser, M.W. Gill, L.W. Reirer, H.A. Tilson och R.C. MacPhail (1991), ”Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments”, *Neurotoxicol. Teratol.,* 13, 599–609.

10. H.A. Tilson och C.L. Mitchell (red.) (1992), ”Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series”, *Raven Press,* New York.

11. L.W. Chang (red.) (1995), ”Principles of Neurotoxicology”, *Marcel Dekker,* New York.

12. B. Broxup (1991), ”Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment”, J. *Amer. Coll. Toxicol.,* 10, 689–695

13. V.C. Moser, D.C. Anthony, W.F. Sette och R.C. MacPhail (1992), ”Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats”, *Fund. Appl.Toxicol.,* 18, 343–352.

14. J.P. O'Callaghan (1988), ”Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity”, *Eurotoxicol. Teratol.,* 10, 445–452.

15. J.P. O'Callaghan och D.B. (1988), ”Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins”,J. *Pharmacol. Exp.* Ther., 244, 368–378.

16. D.A. Fox, H.E. Lowndes och G.G. Birkamper (1982), ”Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology”, *Nervous System Toxicology,* red. C. L. Mitchell, *Raven Press,* New York, 299–335.

17. B.L. Johnson (1980), ”Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing”, *Experimental and Clinical Neurotoxicology.* red. P.S. Spencer och H. H. Schaumburg, *Williams and Wilkins Co.,* Baltimore/London, 726–742.

18. J.D. Bancroft och A. Steven (1990), ”Theory and Pratice of Histological Techniques, Chapter 17”, *Neuropathological Techniques,* red. Lowe, James och Cox, Gordon, Churchill Livingstone.

▼B

Tabell 1

Minimiantalet djur per grupp när test avseende neurotoxicitet utförs dels fristående, dels i kombination med andra test

	OLIKA UTFÖRANDEN AV TEST AVSEENDE NEUROTOXICITET			
	Separat test	I kombination med 28-dagarstest	I kombination med 90-dagarstest	I kombination med test avseende kronisk toxicitet
Sammanlagt antal djur per grupp	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor	15 hanar och 15 honor	25 hanar och 25 honor
Antalet djur som valts ut för funktionella observationer inbegripet detaljerade kliniska observationer	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor
Antalet djur som valts ut för perfusion *in situ* och neurohistopatologi	5 hanar och 5 honor	5 hanar och 5 honor	5 hanar och 5 honor	5 hanar och 5 honor
Antalet djur som valts ut för observationer vid toxicitetstest med upprepad dos, vid test av subkronisk eller kronisk toxicitet, för hematologisk undersökning, klinisk-biokemisk undersökning, histopatologi och dylikt, enligt respektive vägledning		5 hanar och 5 honor	10 hanar † och 10 honor †	20 hanar † och 20 honor †
Tilläggsobservationer, i förekommande fall	5 hanar och 5 honor			

† Inbegriper 5 djur som valts ut för funktionella observationer och detaljerade kliniska observationer som en del av testet avseende neurotoxicitet.

▼B

Tabell 2

Frekvens för kliniska och funktionella observationer

Typ av observationer		Testets varaktighet			
		Akut	28-dagars	90-dagars	Kronisk
För alla djur	Allmänt hälsotillstånd	Dagligen	Dagligen	Dagligen	Dagligen
	Mortalitet/morbiditet	Två gånger per dag	Två gånger per dag	Två gånger per dag	Två gånger per dag
I djur som valts ut för funktionella observationer	Detaljerade kliniska observationer	— Före den första exponeringen — Inom 8 timmar från dosering, vid uppskattad tidpunkt för högsta verkan — På dag 7 och 14 efter dosering	— Före den första exponeringen — Därefter en gång per vecka	— Före den första exponeringen — En gång under den första eller andra exponeringsveckan — Därefter en gång per månad	— Före den första exponeringen — En gång vid den första exponeringsmånadens slut — Därefter var tredje månad
	Funktionella observationer	— Före den första exponeringen — Inom 8 timmar från dosering, vid uppskattad tidpunkt för högsta verkan — På dag 7 och 14 efter dosering	— Före den första exponeringen — Under den första behandlingsveckan, så nära exponeringsperiodens slut som möjligt	— Före den första exponeringen — En gång under den första eller andra exponeringsveckan — Därefter en gång per månad	— Före den första exponeringen — En gång vid den första exponeringsmånadens slut — Därefter var tredje månad"

▼B

B.44 **HUDABSORPTION: *IN VIVO*-METOD**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 427 (2004).

1.1 INLEDNING

Exponering för många kemikalier sker i huvudsak genom huden, medan de flesta toxikologiska studier som görs med försöksdjur gäller oral administrering. Den *in vivo*-studie av hudabsorption som beskrivs i dessa riktlinjer ger den koppling som behövs för att kunna extrapolera från orala studier vid säkerhetsbedömning efter dermal exponering.

Ett ämne måste passera ett stort antal cellager i huden innan det når blodcirkulationen. För de flesta ämnen är *stratum corneum,* hornlagret som består av döda celler, det hastighetsbestämmande lagret. Permeabiliteten genom huden beror både på hur lipofil kemikalien är och hur tjockt epidermis yttersta lager är samt på faktorer som ämnets molekylvikt och koncentration. I regel har rått- och kaninhud högre permeabilitet än human hud, medan hudpermeabiliteten hos marsvin och apor ligger närmare människans.

Metoderna för att mäta perkutan absorption kan indelas i två kategorier, *in vivo* och *in vitro. In vivo*-metoden kan ge god information om hudabsorption hos olika arter av försöksdjur. Under senare tid har *in vitro*-metoder utvecklats. I dessa används transport över hela eller delar av tvärsnitt av djurhud eller human hud till en vätskereservoar. *In vitro*-metoden beskrivs i en separat testmetod (1). Man bör konsultera OECD:s riktlinjer för genomförande av hudabsorptionsstudier (2) som ett stöd för valet av lämpligaste metod under givna betingelser, eftersom de innehåller detaljerade uppgifter om lämpligheten hos både *in vivo*- och *in vitro*-metoder.

Den *in vivo*-metod som beskrivs i denna metod gör det möjligt att bestämma testämnets penetration genom huden in till organismen. Tekniken har haft bred användning under många år (3)(4)(5)(6)(7). I många fall kan hudabsorptionsstudier *in vitro* vara lämpliga, men det kan finnas lägen där endast en *in vivo*-studie kan ge de data som krävs.

Fördelar med *in vivo*-metoden är att den utnyttjar fysiologiskt och metaboliskt intakta system och en art som är vanlig i många toxicitetsstudier samt att den kan modifieras för användning med andra arter. Nackdelarna är att levande djur används, behovet av att använda radioaktivmärkt material för att göra det lättare att få tillförlitliga resultat, svårigheter att fastställa den tidiga absorptionsfasen och skillnader i permeabilitet mellan den föredragna artens (råtta) hud och mänsklig hud. Djurhud är i regel mer permeabel och kan därför ge en överskattning av den humana hudabsorptionen (6)(8)(9). Frätande/korrosiva ämnen bör inte testas på levande djur.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Oabsorberad dos: representerar det som tvättas bort från hudytan efter exponering och eventuellt finns kvar på det icke-tättslutande täckmaterialet, inbegripet eventuell dos som kan visas avdunsta från huden under exponeringen.

Absorberad dos *(in v*ivo)*:* innefattar det som finns i urinen, i tvättvatten från buren, i avföring, i utandningsluften (om detta mäts), i blod, i vävnader (om sådana tas till vara) och i det återstående kadavret efter avlägsnande av huden på appliceringsstället.

Absorberbar dos: representerar det som finns på eller i huden efter tvätt.

1.3 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet, som helst ska vara radioaktivmärkt, appliceras på djurets rakade hud i en eller flera lämpliga doser i form av en representativ beredning som är i bruk. Testberedningen får vara i kontakt med huden under en bestämd tidsperiod under ett lämpligt täckmaterial (icke-tättslutande, halvtättslutande eller tättslutande) för att förhindra att djuret äter av testberedningen. I slutet av exponeringstiden tas täckmaterialet bort och huden rengörs med lämpligt rengöringsmedel. Täckmaterial och tvättmaterial behålls för analys och ett nytt täckmaterial appliceras. Före, under och efter exponeringsperioden hålls djuren i individuella metabolismburar och exkrementer och utandningsluft från dessa perioder samlas upp för analys. Insamlingen av utandningsluft kan uteslutas om det finns tillräckliga data som visar att inga eller få flyktiga radioaktiva metaboliter bildas. Varje studie omfattar i regel flera grupper av djur som exponeras för testberedningen. En grupp avlivas i slutet av exponeringsperioden. Andra grupper avlivas efter fastställda tidsintervall därefter (2). I slutet av provtagningstiden avlivas de återstående djuren, blod samlas in för analys, huden på applikationsstället avlägsnas för analys och kadavret analyseras med avseende på outsöndrat material. Proverna analyseras med lämpliga medel och graden av hudabsorption uppskattas (6)(8)(9).

1.4 BESKRIVNING AV METODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Råtta är den art som oftast används, men även hårlösa stammar och arter som har hudabsorptionhastigheter som mer liknar människans kan användas (3)(6)(7)(8)(9). Unga vuxna, friska djur av samma kön (hankön är standard) av rutinmässigt använda laboratoriestammar ska användas. I början av studien bör djurens viktvariation inte överstiga ± 20 % av medelvikten. Exempelvis är hanråttor på 200 g – 250 g lämpliga, särskilt i övre delen av viktintervallet.

▼B

1.4.2 **Djurens antal och kön**

En grupp på minst fyra djur av ett kön ska användas för varje testberedning och varje schemalagd avslutningstid. Varje djurgrupp avlivas efter olika tidsintervall, t.ex. i slutet av exponeringstiden (i regel efter 6 eller 24 timmar) och vid de efterföljande tidpunkterna (t.ex. 48 och 72 timmar). Om data finns tillgängliga som visar betydande skillnader i dermal toxicitet mellan hanar och honor ska det känsligare könet väljas. Om inga sådana data finns kan någondera könet användas.

1.4.3 **Inhysning och diet**

Temperaturen i försöksdjursrummet ska vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa luftfuktigheten ska vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 % annat än vid rengöring, men målet ska vara att hålla 50–60 %. Artificiell belysning ska användas, med en sekvens på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Konventionella laboratoriedieter kan användas och föda ska finnas fritt tillgänglig tillsammans med obegränsat med dricksvatten. Under studien och helst även under acklimatiseringen ska djuren inhysas enskilt i metabolismburar. Eftersom spill av föda och vatten skulle äventyra resultaten ska risken för spill minimeras.

1.4.4 **Förberedelse av djuren**

Djuren märks för att möjliggöra identifiering av individerna och hålls i sina burar i minst fem dagar innan studien inleds för att de ska acklimatisera sig till laboratoriebetingelserna.

Efter acklimatiseringsperioden, och ungefär 24 timmar före dosering, rakas ett hudområde på djuren runt hals och rygg. Eftersom permeabilitetsegenskaperna för skadad hud skiljer sig från dem hos intakt hud bör man undvika att skada huden. Efter rakning och ungefär 24 timmar innan testämnet appliceras på huden (se avsnitt 1.4.7) ska hudytan torkas av med aceton för att avlägsna sebum. En kompletterande tvätt med tvål och vatten rekommenderas inte, eftersom eventuella tvålrester kan främja absorption av testämne. Området måste vara tillräckligt stort för att det ska gå att göra en tillförlitlig beräkning av den absorberade mängden testkemikalie per cm^2 hud, helst minst 10 cm^2. Detta område är praktiskt möjligt att ha på råttor med kroppsvikten 200–250 g. Efter förberedelsen återförs djuren till metabolismburarna.

1.4.5 **Testämne**

Testämnet är den entitet vars penetrationsegenskaper ska studeras. Helst ska testämnet vara radioaktivmärkt.

1.4.6 **Testberedningen**

Beredningen av testämne (t.ex. rent, utspätt eller formulerat material innehållande testkemikalien som appliceras på huden) ska vara detsamma (eller en rimlig ersättning) som det som människor eller andra målarter kan exponeras för. Alla avvikelser från den beredning som ”är i bruk” måste motiveras. Vid behov löses eller suspenderas testämnet i en lämplig vehikel. För andra vehikler än vatten ska absorptionsegenskaper och potentiella interaktioner vara kända.

▼B

1.4.7 **Applicering på huden**

Ett appliceringsställe med en viss yta definieras på hudytan. En känd mängd av testberedningen appliceras sedan jämnt på detta ställe. Mängden ska normalt efterlikna den potentiella exponering människor utsätts för, i regel 1–5 mg/cm^2 för ett fast ämne och upp till 10 µl/cm^2 för vätskor. Alla andra mängder ska motiveras av de förväntade användningsbetingelserna, studiens syfte eller testberedningens fysikaliska egenskaper. Efter applicering ska det behandlade stället skyddas från putsning. Ett exempel på en typisk anordning visas i figur 1. Normalt skyddas appliceringsstället med ett täckmaterial som inte är tättslutande (t.ex. ett permeabelt skydd av nylonväv). För mycket små mängder bör dock appliceringsstället täckas tätt. Om avdunstning av halvflyktiga testämnen minskar upptagshastigheten av testämnet i oacceptabel omfattning (se även avsnitt 1.4.10, första stycket) måste det avdunstade ämnet fångas i ett träkolsfilter som täcker appliceringsanordningen (se figur 1). Det är viktigt att anordningen inte skadar huden och inte heller absorberar eller reagerar med testberedningen. Djuren återförs till individuella metabolismburar för uppsamling av exkrementer.

1.4.8 **Varaktighet för exponering och provtagning**

Exponeringens varaktighet är tidsintervallet mellan applicering och avlägsnande av testberedningen genom tvätt av huden. Exponeringsperioden ska vara relevant, i regel 6 eller 24 timmar, i förhållande till den förväntade humana exponeringstiden. Efter exponeringsperioden hålls djuren i metabolismburarna fram till den schemalagda avslutningen. Djuren ska observeras med regelbundna intervall med avseende på tecken på toxicitet/onormala reaktioner under hela studieperioden. I slutet av exponeringsperioden ska den behandlade huden granskas så att man kan hitta eventuella synliga tecken på irritation.

Metabolismburarna ska tillåta separat uppsamling av urin och avföring under hela studien. De ska också tillåta uppsamling av ^{14}C-koldioxid och flyktiga ^{14}C-kolföreningar för analys vid produktion som överstiger 5 %. Urin, avföring och infångningsvätskor (t.ex. med ^{14}C-koldioxid och flyktiga ^{14}C-föreningar) ska samlas upp enskilt från varje grupp vid varje provtagningstillfälle. Om det finns tillräckliga data för att man ska kunna utgå ifrån att inga eller mycket lite flyktiga radioaktiva metaboliter bildas går det att använda öppna burar.

Exkrementer samlas upp under exponeringsperioden, upp till 24 timmar efter den initiala hudkontakten och sedan dagligen till och med försökets sista dag. Tre extra uppsamlingsintervall räcker i regel, men syftet med testberedningen eller befintliga kinetiska data kan ge vid handen att andra eller ytterligare tidpunkter är lämpliga för studien.

I slutet av exponeringsperioden tas skyddsanordningen bort från varje djur och sparas separat för analys. Den behandlade huden på alla djur ska tvättas minst 3 gånger med rengöringsmedel med lämpliga svabbar. Det är viktigt att undvika att kontaminera andra delar av kroppen. Rengöringsmedlet ska vara representativt för normal hygien, t.ex. en tvållösning i vatten. Slutligen ska huden torkas. Alla svabbar och allt tvättvatten ska sparas för analys. Ett nytt täckmaterial appliceras för att skydda det behandlade stället på djur som ingår i grupper med senare provtagningstidpunkter innan de återförs till sina enskilda burar.

▼B

1.4.9 **Avslutningsförfaranden**

För varje grupp ska de enskilda djuren avlivas på den schemalagda tidpunkten och blodprov tas för analys. Skyddsanordningen eller täckmaterialet avlägsnas för analys. Huden från appliceringsstället och en motsvarande yta av odoserad, rakad hud tas från varje djur för separat analys. Appliceringsstället kan delas upp för att skilja hornlagret från underliggande epidermis så att mer information erhålls om testkemikaliens fördelning. Bestämningen av fördelningen under en viss tid efter exponeringsperioden bör ge en indikation om vad som händer med eventuell testkemikalie i hornlagret. För att underlätta uppdelningen av huden (efter att djuret har genomgått sluttvätt och avlivats) tas alla skyddsanordningar bort. Huden på appliceringsstället, med en omgivande ring av hud, skärs ut från råttan och nålas upp på en platta. En remsa häftande tejp appliceras på hudytan med ett varsamt tryck och tejpen tas bort tillsammans med en del av hornlagret. Tejpremsor appliceras successivt tills tejpen inte längre fäster vid hudytan, då hela hornlagret har avlägsnats. För varje djur kan remsorna slås samman i en enda behållare. Till denna behållare sätts en vävnadsnedbrytare för att lösa upp hornlagret. Eventuell potentiell målvävnad kan avlägsnas för separat mätning innan det återstående kadavret analyseras med avseende på absorberad kadaverdos. De enskilda kadavren ska sparas för analys. Vanligen räcker en analys av totalinnehållet. Målorgan kan avlägsnas för separat analys (om andra studier tyder på att detta bör göras). Urin i blåsan vid den schemalagda tidpunkten för avlivning ska läggas till de tidigare uppsamlade urinproven. Efter uppsamling av exkrementer från metabolismburarna vid den schemalagda avlivningstiden ska burarna och tillhörande infångningsanordningar tvättas med lämpligt lösningsmedel. Även annan potentiellt kontaminerad utrustning ska analyseras.

1.4.10 **Analys**

Adekvat återvinning av radioaktiviteten (dvs. ett medelvärde på 100 ± 10 % av all radioaktivitet) ska uppnås i alla studier. Återvinning utöver detta intervall måste motiveras. Mängden av den administrerade dosen i varje prov analyseras med lämpliga vedertagna förfaranden.

De statistiska beräkningarna ska inbegripa ett mått på variansen för replikaten för varje applicering.

2. **DATA**

Följande mätningar ska göras för varje djur, vid varje provtagningstillfälle för testkemikalien och/eller metaboliter. Utöver individdata ska data grupperade efter provtagningstidpunkter rapporteras som medelvärden:

— Kvantitet i skyddsanordningen.

— Kvantitet som kan avlägsnas från huden.

— Kvantitet i/på huden som inte kan tvättas bort från denna.

▼B

— Kvantitet i blodprover.

— Kvantitet i exkrementer och i utandningsluft (om sådana data finns).

— Återstående kvantitet i kadavret och i eventuella organ som har avlägsnats för separat analys.

Kvantiteten av testämnet och/eller metaboliter i exkrementer, utandningsluft, blod och kadaver gör det möjligt att bestämma den totala mängd som har absorberats vid varje tidpunkt. Även en beräkning av mängden testkemikalie som absorberats för varje cm^2 hud som exponerats för testämnet kan göras.

3. RAPPORTERING

3.1 FÖRSÖKSRAPPORT

Testrapporten måste avspegla de krav som ställs enligt försöksprotokollet, inbegripet en motivering för det använda testsystemet. Rapporten ska innehålla följande information:

Testämne:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer, om detta är känt; källa; renhet (radiokemisk renhet); kända orenheter; satsnummer).

— Fysikaliskt tillstånd, fysikalkemiska egenskaper (t.ex. pH, flyktighet, löslighet, stabilitet, molekylvikt och log P_{ow}).

Testberedning:

— Formulering och motivering av användning.

— Detaljerade uppgifter om testberedningen, applicerad mängd, uppnådd koncentration, vehikel, stabilitet och homogenitet.

Försöksdjur:

— Använd stam/art.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Källa för djuren, inhysningsbetingelser osv.

— De enskilda djurens vikt då försöket påbörjas.

Försöksförhållanden:

— Detaljerade uppgifter om administrering av testberedningen (appliceringsställe, bestämningsmetoder, tättslutande/icketättslutande täckmaterial, volym, extraktion, detektion).

— Detaljerade uppgifter om födo- och vattenkvalitet.

Resultat:

— Eventuella tecken på toxicitet.

— Absorptionsdata i tabellform (uttryckt som hastighet, mängd eller procentandel).

▼B

— Uppgifter om total återvinning från försöket.

— Tolkning av resultaten, jämförelse med tillgängliga data för hudabsorption av testföreningen.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

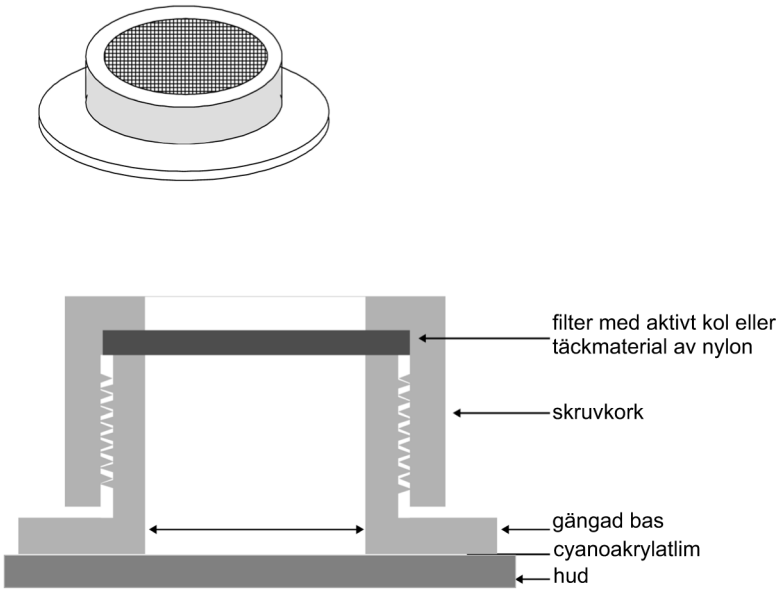
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

Figur 1

Ett exempel på en typisk anordning som används för att definiera och skydda appliceringsstället på huden vid hudabsorptionsstudier *in vivo*.



▼B

B.45. **HUDABSORPTION: *in vitro*-METOD**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 428 (2004).

1.1 INLEDNING

Denna metod har utformats för att ge information om absorption av ett testämne som appliceras på utskuren hud. Den kan antingen kombineras med metoden för hudabsorption *in vivo* (1) eller genomföras separat. Det rekommenderas att OECD:s riktlinjedokument för genomförande av hudabsorptionsstudier (2) konsulteras som ett stöd för utformningen av studier som bygger på denna metod. Riktlinjedokumentet har tagits fram för att underlätta urvalet av *in vitro*-förfaranden för användning under särskilda betingelser, för att garantera att de resultat som erhålls med denna metod blir tillförlitliga.

Metoderna för att mäta hudabsorption och dermal leverans kan indelas i två kategorier: *in vivo* och *in vitro*. *In vivo*-metoder för hudabsorption är väl etablerade och ger farmakokinetisk information i ett urval av djurarter. En *in vivo*-metod beskrivs separat i en annan testmetod (1). *In vitro*-metoder har också använts under många år för att testa hudabsorption. Formella valideringsstudier av *in vitro*-metoder som omfattas av denna testmetod har inte gjorts, men OECD-experter enades 1999 om att tillräckligt med data hade utvärderats för att stödja *in vitro*-metoden (3). Detaljerade uppgifter som ytterligare stödjer detta, inbegripet ett betydande antal direktjämförelser av *in vitro*- och *in vivo*-metoder, finns i riktlinjedokumentet (2). Det finns ett antal monografier som innehåller översikter över detta ämne och ger en detaljerad bakgrund till användningen av en *in vitro*-metod (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). *In vitro*-metoder mäter diffusionen av kemikalier in i och genom huden till en vätskereservoar, och det går använda icke-viabel hud för att mäta endast diffusion eller färsk, metaboliskt aktiv hud för att samtidigt mäta diffusion och metabolism i huden. Sådana metoder har särskilt funnit användning för att jämföra leveransen av kemikalier in i och genom huden från olika formuleringar och kan också ge användbara modeller för hudabsorption hos människa.

In vitro-metoden är inte alltid tillämplig för alla situationer och för alla kemikalieklasser. Den kan gå att använda för en initial kvalitativ utvärdering av hudpenetrationen. I vissa fall kan det vara nödvändigt att följa upp denna utvärdering med *in vivo*-data. Riktlinjedokumentet (2) bör konsulteras för ytterligare information om situationer där *in vitro*-metoden skulle vara lämplig. Mer detaljerade uppgifter som stöd för beslutet finns i (3).

Denna metod presenterar allmänna principer för att mäta hudabsorption och leverans av ett testämne med hjälp av utskuren hud. Hud från många däggdjursarter, inbegripet människa, kan användas. Hudens permeabilitetsegenskaper bibehålls efter utskärning, eftersom den huvudsakliga diffusionsbarriären är det icke-viabla hornlagret, *stratum corneum;* aktiv transport genom huden har inte påvisats. Huden har visats kunna metabolisera vissa kemikalier under hudabsorption (6), men denna process är inte hastighetsbegränsande med avseende på faktisk absorberad dos, även om den kan påverka naturen hos det material som kommer in i blodbanan.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Oabsorberad dos: representerar det som tvättas bort från hudytan efter exponering och eventuellt finns kvar på det icke-tättslutande täckmaterialet, inbegripet eventuell dos som kan visas avdunsta från huden under exponeringen.

Absorberad dos *(in vitro)*: massan av testämne som når mottagarvätskan eller den systemiska cirkulationen inom en given tidsperiod.

Absorberbar dos *(in vitro)*: representerar det som finns kvar på eller i huden efter tvättning.

1.3 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet, som kan vara radioaktivmärkt, appliceras på ytan av ett hudprov som skiljer två kammare åt i en diffusionscell. Kemikalien finns kvar på huden under en fastställd tid och under fastställda betingelser innan den avlägsnas med ett lämpligt rengöringsförfarande. Mottagarvätskan provtas vid tidpunkter under hela försöket och analyseras med avseende på testkemikalie och/eller metaboliter.

Om metaboliskt aktiva system används kan metaboliter av testkemikalien analyseras med lämpliga metoder. I slutet av försöket kvantifieras fördelningen av testkemikalien och dess metaboliter, om sådana förekommer.

Under lämpliga betingelser, såsom beskrivs i denna metod och i riktlinjedokumentet (2), mäts absorptionen av en testkemikalie under en given tidsperiod genom analys av en mottagarvätska och av den behandlade huden. Det testämne som återstår i huden ska betraktas som absorberat om det inte kan visas att absorptionen kan bestämmas utifrån enbart värden för receptorvätskan. Analys av övriga komponenter (material som tvättas bort från huden och som finns kvar i hudlagren) gör ytterligare utvärdering av data möjlig, inbegripet total fördelning av testämne och procentandel återvunnet testämne.

Resultat för relevanta referenskemikalier ska finnas tillgängliga och överensstämma med publicerad litteratur om den använda metoden för att visa testsystemets prestanda och tillförlitlighet på det laboratorium som genomför försöket. Detta krav kan uppfyllas genom att en lämplig referenskemikalie (helst ett ämne vars lipofilicitet ligger nära testämnets) testas samtidigt med testämnet eller genom att adekvata historiska data tillhandahålls för ett antal referensämnen med olika lipofilicitet (t.ex. koffein, bensoesyra och testosteron).

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Diffusionscell**

En diffusionscell består av en givarkammare och en mottagarkammare mellan vilka huden placeras (ett exempel på en typisk utformning finns i figur 1). Cellen ska ge en god förslutning runt huden, möjliggöra enkel provtagning och en god blandning av den mottagarlösning som är i kontakt med hudens undersida samt god temperaturkontroll av cellen och dess innehåll. Diffusionsceller av både statisk typ och genomflödestyp är godtagbara. Normalt lämnas givarkammaren öppen under exponering för en begränsad dos av en testberedning. Vid applicering av en obegränsad dos och i vissa fall även av begränsade doser kan givarkammaren inneslutas.

▼B

1.4.2 **Mottagarvätska**

Föredraget används en fysiologiskt anpassad mottagarvätska, även om andra vätskor kan användas om detta är motiverat. Mottagarvätskans exakta sammansättning ska anges. Det ska visas att testkemikaliens löslighet i mottagarvätskan är rimlig så att vätskan inte fungerar som en barriär för absorption. Mottagarvätskan får inte heller skada hudberedningen. I ett genomflödessystem får flödeshastigheten inte förhindra diffusion av testämnet in i mottagarvätskan. I ett statiskt system ska vätskan vara under ständig omrörning och provtas regelbundet. Om metabolism studeras måste receptorvätskan kunna hålla huden viabel under hela försöket.

1.4.3 **Hudberedningar**

Människo- eller djurhud kan användas. Användning av human hud begränsas är föremål för nationella och internationella etiska hänsynstaganden och begränsningar. Viabel hud är att föredra, men icke-viabel hud kan användas om det kan visas att den inte är skadad. Både epidermala membran (separerade med hjälp av enzymer, värme eller kemikalier) eller hud med anpassad tjocklek (i regel 200–400 μm tjock) preparerad med dermatom är godtagbara. Hud med full tjocklek kan användas, men alltför tjock hud (cirka > 1 mm) bör undvikas, om inte detta särskilt krävs för bestämning av testkemikalien i hudlagren. Valet av art, anatomisk placering och preparationsteknik måste motiveras. Godtagbara data för minst fyra replikat per testberedning krävs.

1.4.4 **Hudberedningens integritet**

Huden måste prepareras korrekt. Olämplig hantering kan leda till att hornlagret skadas. Därför måste man kontrollera att den preparerade huden inte är skadad. När hudmetabolism undersöks ska den nyutskurna huden användas så snart som möjligt och under betingelser som är kända för att främja metabolisk aktivitet. Som en allmän vägledning kan sägas att nyutskuren hud ska användas inom 24 timmar, men den godtagbara lagringsperioden kan variera beroende på vilket enzymsystem som är involverat i metaboliseringen och på lagringstemperaturen (13). När hudberedningar har lagrats före användning ska det finnas belägg för att barriärfunktionen är bibehållen.

1.4.5 **Testämne**

Testämnet är den entitet var penetrationsegenskaper studeras. Helst ska testämnet vara radioaktivmärkt.

1.4.6 **Testberedning**

Beredningen av testämne (t.ex. rent, utspätt eller formulerat material innehållande testkemikalien som appliceras på huden) ska vara detsamma (eller en rimlig ersättning) som det som människor eller andra målarter kan exponeras för. Alla avvikelser från den beredning som ”är i bruk” måste motiveras.

▼B

1.4.7 **Testämneskoncentration och testämnesformuleringar**

Normalt används mer än en koncentration av testämnet så att den övre gränsen för potentiell human exponering ligger inom koncentrationsintervallet. Likaledes bör man överväga att testa ett urval av typiska formuleringar.

1.4.8 **Applicering på huden**

Under normala betingelser för human exponering för kemikalier är doserna vanligen begränsade. Därför ska en applicering som efterliknar human exponering användas, normalt 1–5 mg/cm^2 hud för ett fast ämne och upp till 10 µl/cm^2 för en vätska. Mängden ska motiveras av de förväntade användningsbetingelserna, studiens syften och testberedningens fysikaliska egenskaper. Exempelvis kan appliceringen på hudytan vara obegränsad om stora volymer per enhetsyta appliceras.

1.4.9 **Temperatur**

Passiv diffusion av kemikalier (och därmed deras hudabsorption) påverkas av temperaturen. Diffusionskammaren och huden ska hållas vid en konstant temperatur som ligger nära den normala hudtemperaturen på 32 ºC ± 1 ºC. Olika cellutföranden kräver olika temperatur på vattenbad eller uppvärmningsblock för att säkerställa att mottagarvätskan/huden hålls vid sin fysiologiska norm. Fuktigheten ska helst ligga mellan 30 och 70 %.

1.4.10 **Varaktighet för exponering och provtagning**

Huden kan exponeras för testberedningen under hela försökets gång eller under kortare tider (t.ex. för att efterlikna en särskild typ av human exponering). Överflödig testberedning ska tvättas bort från huden med lämpligt rengöringsmedel och tvättvattnet ska samlas upp för analys. Förfarandet för att avlägsna testberedningen beror på de förväntade användningsbetingelserna och ska motiveras. En provtagningsperiod på 24 timmar krävs normalt för att tillåta adekvat karakterisering av absorptionsprofilen. Eftersom hudens integritet kan börja försämras efter 24 timmar bör provtagningstidpunkterna normalt inte ligga efter 24 timmar. För testämnen som tränger igenom huden snabbt kan detta vara onödigt, men för testämnen som tränger igenom huden långsamt kan längre tider krävas. Provtagningsfrekvensen för mottagarvätska ska vara sådan att det går att återge testämnets absorptionsprofil grafiskt.

1.4.11 **Avslutningsförfaranden**

Alla testsystemets komponenter ska analysers och återvinningen bestämmas. Detta inbegriper givarkammaren, tvättvattnet från hudberedningen, hudberedningen samt mottagarvätska och mottagarkammare. I vissa fall kan huden delas upp i den exponerade hudytan och hudytan under cellens fläns samt i hornlager-, epidermis- och dermisfraktioner för separat analys.

1.4.12 **Analys**

Adekvat återvinning av radioaktiviteten ska uppnås i alla studier (målet bör vara ett medelvärde på 100 ± 10 % av radioaktiviteten, och alla avvikelser ska motiveras). Mängden testämne i mottagarvätskan och hudberedningen samt i tvättvätskan från hudyta och apparatur ska analyseras med lämplig teknik.

▼B

2. **DATA**

Analysen av mottagarvätskan, fördelningen av testkemikalien i testsystemet och absorptionsprofilen med tid ska presenteras. Då begränsade doser används ska den mängd som tvättas bort från huden, den mängd som finns i huden (och i de olika hudlagren om detta har analyserats) samt den mängd som finns i mottagarvätskan (hastighet samt mängd eller procentandel av applicerad dos) beräknas. Hudabsorption uttrycks ibland endast som data för mottagarvätskan. Om testämnet finns kvar i huden i slutet av försöket kan dock den mängden behöva inkluderas i den totala absorberade mängden (se stycke 66 i hänvisning 3). Om en obegränsad dos har använts vid exponeringen kan det gå att beräkna en permeabilitetskonstant (Kp) med hjälp av erhållna data. Under de senare betingelserna är procentandelen absorberat testämne inte av betydelse.

3. **RAPPORTERING**

3.1 FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten måste avspegla de krav som ställs enligt försöksprotokollet, inbegripet en motivering för det använda testsystemet. Rapporten måste innehålla följande information:

Testämne:

— Fysikaliskt tillstånd, fysikalkemiska egenskaper (minst molekylvikt och log P_{ow}) och renhet (radiokemisk renhet).

— Identifieringsdata (t.ex. satsnummer).

— Löslighet i mottagarvätskan.

Testberedning:

— Formulering och motivering för användningen.

— Homogenitet.

Försöksförhållanden:

— Källor till huden och ursprungsplacering på kroppen, lagringsbetingelser före användning, eventuell förbehandling (rengöring, antibiotikabehandling osv.), mätningar av hudens integritet, metabolisk status, motivering av användningen.

— Cellutformning, mottagarvätskans sammansättning, mottagarvätskans flödeshastighet eller provtagningstider och provtagningsförfaranden.

— Detaljerade uppgifter om testberedningen och kvantifiering av applicerad dos.

— Exponeringens varaktighet.

— Detaljerade uppgifter om avlägsnande av testberedningen från huden, t.ex. tvätt av huden.

— Detaljerade uppgifter om analys av huden och eventuella delningsmetoder som har använts för att påvisa fördelning i huden.

▼B

— Förfaranden för tvätt av cell och utrustning.

— Analysmetoder, extraktionstekniker, detektionsgränser och validering av analysmetoder.

Resultat:

— Total återvinning från försöket (applicerad dos ≡ tvättvatten från huden + huden + mottagarvätskan + tvättvatten från cellen).

— Återvinning från varje cell och varje kammare i tabellform.

— Absorptionsprofil.

— Absorptionsdata i tabellform (uttryckt som hastighet, mängd eller procentandel).

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Testmetod B.44. Hudabsorption: *in vivo*-metod.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237–241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191–205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et* al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

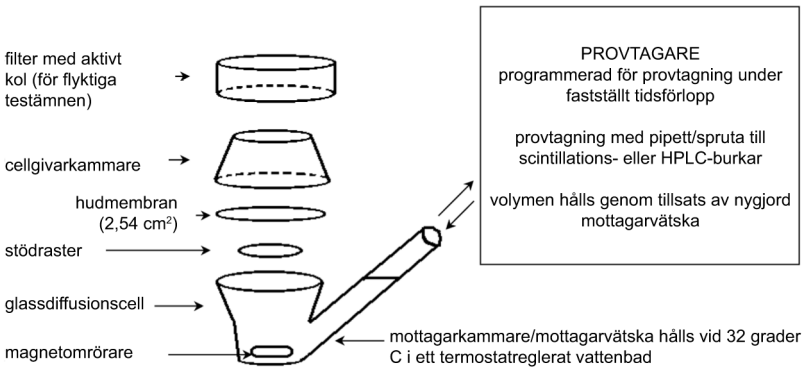
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Figur 1

Ett exempel på en typisk utformning av en statisk diffusionscell för perkutana absorptionsstudier *in vitro*.



▼M3

B.46. *IN VITRO*-HUDIRRITATION: TESTMETOD MED REKONSTRUERAD HUMAN HUD

INLEDNING

1. Hudirritation betyder att det uppstår reversibel skada på huden efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar, enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (FN:s GHS) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) (1) (3). Denna testmetod innebär ett *in vitro*-förfarande som kan användas för identifiering av faror med irriterande kemikalier (ämnen och blandningar) enligt FN:s GHS och EU:s CLP-kategori 2 (1) (2) (3). I EU och andra regioner som inte har antagit FN:s frivilliga GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) kan testmetoden även användas för att identifiera icke-klassificerade kemikalier, dvs. ”ingen kategori” enligt FN:s GHS och CLP-förordningen (1) (3). Testmetoden kan användas för att fastställa kemikaliers hudirriterande verkan som ett fristående ersättningstest för *in vivo*-testning för hudirritation som en del av en strategi för stegvis testning (4 och kapitel B.4 i denna bilaga).

2. Bedömningen av hudirritation har vanligtvis inneburit användning av laboratoriedjur (OECD:s testriktlinje 404, kapitel B.4 i denna bilaga) (4). På grund av frågor rörande djurens välbefinnande reviderades metod B.4 år 2004 och med den kan man fastställa hudkorrosion/hudirritation genom att tillämpa en stegvis teststrategi med validerade *in vitro*- och *ex vivo*-metoder, och på så sätt undvika smärta och lidande hos djur. Tre validerade *in vitro*-testmetoder har antagits som OECD:s testriktlinjer 430, 431 och 435 (5) (6) (7) och två av dem som kapitel B.40 och B.40a i denna bilaga, för att användas för korrosivitetsdelen i den stegvisa teststrategin i B.4 eller OECD:s testriktlinje 404 (4).

3. Denna testmetod gäller hudirritation som en slutpunkt för människa. Den baserar sig på rekonstruerad human hud (RhE) där produkten (användning av icke-transformerade keratinocyter i epidermis med humant ursprung som cellkälla och användning av representativ vävnad och cytoarkitektur) har mycket liknande biokemiska och fysiologiska egenskaper som den humana överhuden (epidermis). Denna testmetod omfattar också en uppsättning prestandastandarder (tillägg 2) för bedömning av liknande och modifierade RhE-baserade metoder som utvecklats av EC-ECVAM (8), i enlighet med principerna i OECD:s riktlinjedokument nr 34 (9).

4. Det finns tre validerade metoder som följer denna testmetod. Förvalidering, optimering och valideringsstudier har genomförts för en *in vitro*-metod (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) med användning av en RhE-modell som finns kommersiellt tillgänglig som EpiSkin™ (utsedd till validerad referensmetod). Två andra kommersiellt tillgängliga *in vitro*-hudirritationsmetoder enligt RhE-modellen har enligt prestandastandardbaserad validering visat liknande resultat som den validerade referensmetoden (21) – metoderna är EpiDerm™ SIT (EPI-200) och SkinEthic™ RHE (22).

▼M3

5. Innan en föreslagen liknande eller modifierad *in vitro*-metod enligt RhE-modell annan än den validerade referensmetoden, EpiDerm™ SIT (EPI-200) eller SkinEthic™ RHE, kan användas för lagenliga ändamål bör metodens tillförlitlighet, relevans (exakthet) och begränsningar för den föreslagna användningen bestämmas för att säkerställa att metoden kan anses vara liknande den validerade referensmetoden, i enlighet med kraven i prestandastandarder som anges i denna testmetod (tillägg 2). Det är också rekommendabelt att studera OECD:s bakgrundsdokument rörande *in vitro*-hudirritationstestning innan man utvecklar och validerar en liknande eller modifierad *in vitro*-metod enligt RhE-modell och lämnar in den för godkännande (23).

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

7. En begränsning av testmetoden, såsom det påvisas i valideringsstudien (16), är att man inte kan klassificera kemikalier för FN:s frivilliga GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) (1). När metoden används som ett partiellt ersättningstest kan det krävas uppföljande *in vivo*-testning för att få en fullständig bild av hudirritationspotentialen (4 och kapitel B.4 i denna bilaga). Användningen av human hud är föremål för nationella och internationella etiska överväganden och begränsningar.

8. Denna testmetod hänför sig till *in vitro*-hudirritationskomponenten i den stegvisa testningsstrategin för B.4 (OECD:s testriktlinje 404) om hudkorrosion/hudirritation (4). Den ger inte tillräcklig information om hudkorrosion, men här bör noteras att B.40a (OECD:s testriktlinje 431) om hudkorrosion baserar sig på samma RhE-testsystem, om än med användning av ett annat protokoll (kapitel B.40a). Denna metod baserar sig på RhE-modeller med användning av humana keratinocyter, som därför representerar *in vitro*-målorganet hos den art det gäller. Metoden täcker dessutom direkt det inledande steget hos den inflammatoriska kaskaden/funktionsmekanismen (cellskada och vävnadsskada som leder till lokaliserat trauma) som inträffar vid irritation *in vivo*. En omfattande mängd olika kemikalier har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod och valideringsstudiens empiriska databas uppgick till totalt 58 kemikalier (16) (18) (23). Tillämpligheten omfattar fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller icke-vattenbaserade och de fasta ämnena kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Fasta ämnen ska alltid när det är möjligt malas ned till fint pulver före appliceringen, och ingen annan beredning behövs. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (24). Det är tänkbart att de kan testas med RhE-teknik, men den aktuella testmetoden ger inte möjlighet att testa gaser och aerosoler. Det bör också noteras att mycket färgstarka kemikalier kan störa cellviabilitetsmätningarna och för dem krävs användning av anpassade kontrollgrupper för korrigering (se punkterna 24–26).

9. En enda testomgång med tre vävnadsbitar bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att klassificeringen är otvetydig. I fall av gränsresultat, såsom icke-konkordanta mätningar av vävnadsbitarna och/eller genomsnittlig procentuell viabilitet lika med 50 ± 5 %, bör man överväga en andra testomgång, och en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna är diskordanta.

▼M3

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Testkemikalien appliceras lokalt på en tredimensionell RhE-modell som består av icke-transformerade epidermala keratinocyter av humant ursprung som har odlats till att bilda en starkt differentierad modell av human hud i flera lager. Den består av ordnade lager: basalt lager, taggcellslager och granulärt lager samt ett hornlager i flera skikt som innehåller intercellulära lamellager som representerar de huvudsakliga lipidklasser som motsvarar dem som förekommer *in vivo*.

11. Kemiskt inducerad hudirritation, som manifesterar sig som hudrodnad och ödem, är resultatet av en rad händelser som börjar med penetration av hornlagret (*stratum corneum*) och skador på de underliggande lagren av keratinocyter. De döende keratinocyterna avger mediatorer som inleder den inflammatoriska kaskaden som påverkar cellerna i huden, särskilt stroma- och endotelceller. Utvidgningen och den ökade permeabiliteten hos endotelcellerna ger upphov till den observerade hudrodnaden och det observerade ödemet (24). Den RhE-baserade metoden mäter kaskadens initierande händelser.

12. I RhE-modeller mäts cellviabiliteten genom enzymatisk omvandling av det vitala färgämnet MTT [(3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått, CAS-nummer 298-93-1)], till ett blått formazansalt som mäts kvantitativt efter det att vävnaderna har extraherats (25). Irriterande kemikalier identifieras genom deras förmåga att minska cellviabiliteten under definierade gränsvärden (dvs. ≤ 50 % för kategori 2 enligt FN:s GHS och CLP-förordningen). Beroende på den rättsliga ram inom vilken resultaten från denna testmetod används, kan kemikalier som ger cellviabilitet ovanför den definierade tröskelnivån anses vara icke-irriterande (dvs. > 50 %, ingen kategori).

KVALITETSDEMONSTRATION

13. Före rutinanvändning av någon av de tre validerade testmetoderna enligt denna testmetod bör laboratorierna påvisa sin tekniska kvalitet med användning av de tio referenskemikalier som förtecknas i tabell 1. För liknande metoder som utvecklas enligt denna testmetod eller för modifikationer av någon av de tre validerade metoderna bör de prestandastandardskrav som beskrivs i tillägg 2 till denna testmetod uppfyllas innan metoden används för lagstadgad testning.

14. Som en del av kvalitetsförfarandet rekommenderas att användarna efter mottagande av vävnaden verifierar dess barriäregenskaper enligt specifikationerna från RhE-modelltillverkaren. Detta är särskilt viktigt om vävnader transporteras över långa sträckor eller om transporten tar lång tid. När en metod har etablerats på ett framgångsrikt sätt och kvaliteten hos metodanvändningen har påvisats, behöver sådana verifikationer inte göras rutinmässigt. När en metod används rutinmässigt rekommenderas dock att bedömningen av barriäregenskaperna görs med jämna mellanrum.

Tabell 1

Referenskemikalier ([1])

Kemikalie	CAS-nummer	*In vivo* -gradering ([2])	Fysikaliskt tillstånd	Kategori enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen
naftalenättiksyra	86-87-3	0	Fast ämne	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Vätska	Ingen kat.

▼M3

Kemikalie	CAS-nummer	*In vivo* -gradering ([2])	Fysikaliskt tillstånd	Kategori enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen
metylstearat	112-61-8	1	Fast ämne	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	Vätska	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) ([3]) ([4])
hexylsalicylat	6259-76-3	2	Vätska	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) ([3]) ([4])
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Vätska	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Vätska	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % vattenlösning)	1310-58-3	3	Vätska	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Fast ämne	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vätska	Kat. 2

([1]) Dessa referenskemikalier är en underuppsättning av de referenskemikalier som användes i valideringsstudien.
([2]) *In vivo*-gradering enligt B.4 och OECD:s testriktlinje 404 (4).
([3]) I denna testmetod betraktas FN:s valfria GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) (1) som ”ingen kategori”.
([4]) FN:s valfria GHS-kategori 3 är inte tillämplig enligt CLP-förordningen.

FÖRFARANDE

15. Nedan följer en beskrivning av komponenterna och förfarandena för en RhE-metod för bedömning av hudirritation. En RhE-modell bör rekonstrueras, och den kan beredas i laboratoriet eller anskaffas på kommersiell väg. Det finns operativa standardförfaranden för EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) och SkinEthic™ RhE att tillgå (26) (27) (28). Testningen ska genomföras enligt nedan angivna beskrivning.

RhE-testmetod, komponenter

Allmänna betingelser

16. Icke-transformerade humana keratinocyter ska användas för rekonstruktion av epitelvävnaden. Flera lager av viabla epitelceller (basala lager, taggcellslager och granulära lager) ska finnas under ett funktionellt hornlager. Hornlagret ska bestå av flera skikt och innehålla den väsentliga lipidprofilen för att ge en funktionell barriär som är tillräckligt robust för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörer (t.ex. natriumdodekylsulfat eller Triton X-100). Barriärfunktionen bör påvisas och kan bedömas antingen genom bestämning av den koncentration vid vilken markören minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC_{50}) efter en fast exponeringstid eller genom att bestämma den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % (ET_{50}) vid applicering av en viss fastställd koncentration av markören. RhE-modellens inneslutningsegenskaper ska förhindra att material kan passera runt hornlagret till den viabla vävnaden, vilket kan leda till en bristande modellering av hudexponeringen. RhE-modellen får inte vara förorenad med bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

▼M3

Funktionella betingelser

Viabilitet

17. För bestämning av viabiliteten används MTT-test (25). Användare av RhE-modellen bör se till att varje sats uppfyller de definierade kriterierna för negativ kontroll. Extraktionsmedlets optiska densitet (OD) bör vara tillräcklig låg, dvs. under 0,1. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för den negativa kontrollens OD-värden (i betingelserna för testmetoden för hudirritation) fastställs av RhE-modellens utvecklare/leverantör, och godkända värden för de tre validerade metoderna anges i tabell 2. Det bör finnas dokumenterat att de vävnader som behandlas med den negativa kontrollen är stabila i odlingar (ger motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod.

Tabell 2

Godkända OD-värden för den negativa kontrollen

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Barriärfunktion

18. Hornlagret och dess lipida sammansättning ska vara tillräcklig för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörkemikalier, t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt uppskattningar genom IC_{50} eller ET_{50} (tabell 3).

Morfologi

19. Histologisk undersökning av RhE-modellen bör göras för att påvisa att strukturen motsvarar human hud (inklusive flerskiktat hornlager).

Reproducerbarhet

20. Resultaten av testning med positiv kontrollkemikalie och negativ kontroll bör påvisa reproducerbarhet över tiden.

Kvalitetskontroll

21. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör säkerställa och påvisa att varje sats RhE-modell som används uppfyller de fastställda produktkriterierna, där kriterierna för *viabilitet* (punkt 17), *barriärfunktion* (punkt 18) och *morfologi* (punkt 19) är de viktigaste. Dessa data bör ges till metodanvändarna så att de kan införliva informationen i testrapporten. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för IC_{50} eller ET_{50} ska fastställas av utvecklaren/leverantören av RhE-modellen (eller en forskare om en intern modell används). Endast resultat som har producerats med kvalificerade vävnader kan godkännas för tillförlitlig beräkning av irritationsklassificering. Som exempel visas godkända värden för de tre validerade metoderna i tabell 3.

▼M3

Tabell 3

Exempel på kriterier för kvalitetskontroll för leverans av en sats

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin™ (SM) (18 timmars behandling med SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET_{50} = 4,8 timmar	ET_{50} = 8,7 timmar
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 timmar	ET_{50} = 9,0 timmar

Applicering av test- och kontrollkemikalier

22. Minst tre vävnadsbitar ska användas per testkemikalie och för kontrollerna i varje omgång. För vätskor och fasta ämnen appliceras en tillräcklig mängd av testkemikalien så att hudens yta täcks med ett jämnt lager så att en infinit dos undviks. Dosen ska vara minst 25 µl/cm^2 eller 25 mg/cm^2. För fasta ämnen fuktas hudens yta med avjoniserat eller destillerat vatten före appliceringen för att förbättra kontakten mellan testkemikalien och hudens yta. När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Vid slutet av exponeringsperioden tvättas testämnet omsorgsfullt bort från hudens yta med buffrad vattenlösning eller 0,9-procentig NaCl. Beroende på vilken av de tre validerade RhE-metoderna som används varierar exponeringsperioden mellan 15 och 60 minuter och inkubationstemperaturen mellan 20 och 37 °C. Dessa exponeringsperioder och temperaturer optimeras för varje RhE-metod och beror på metodernas olika karaktär. Närmare beskrivning finns i de operativa standardförfarandena för metoderna (26) (27) (28).

23. Negativa kontroller (NC) och positiva kontroller (PC) ska användas parallellt vid varje testomgång för att visa att viabiliteten (med NC), barriärfunktionen och den resulterande känsligheten (med PC) hos vävnaderna ligger inom fastställda godkända historiska värden. För den positiva kontrollen föreslås 5-procentig vattenlösning av natriumdodekylsulfat. För den negativa kontrollen föreslås vatten eller fosfatbuffrad saltlösning.

Mätning av cellernas viabilitet

24. Den viktigaste faktorn i testningsförfarandet är att viabilitetsmätningarna inte utförs omedelbart efter exponeringen för testkemikalien, utan först efter att de sköljda vävnaderna har haft en tillräckligt lång inkubationstid i färskt medium efter behandlingen. Under denna period kan vävnaderna antingen återhämta sig från svagt irriterande effekter eller utveckla tydliga cytotoxiska effekter. Vid testoptimeringsfasen (11) (12) (13) (14) (15) påvisades att en inkubationstid på 42 timmar efter behandlingen är optimal.

25. MTT-metoden är en validerad kvantitativ metod som ska användas i denna testmetod för att mäta cellviabiliteten. Den kan användas på en tredimensionell vävnadsmodell. Vävnadsprovet placeras i en MTT-lösning av lämplig koncentration (t.ex. 0,3–1 mg/ml) i 3 timmar. Den kondenserade blå formazanprodukten extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, sur isopropanol) och koncentrationen av formazan mäts genom bestämning av OD vid 570 nm med ett filterbandpass på högst ± 30 nm.

▼M3

26. Testkemikaliens optiska egenskaper eller kemiska verkan på MTT kan störa bestämningen, vilket leder till en felaktig uppskattning av viabiliteten (testkemikalien kan förhindra eller vända färgutvecklingen, men kan även vara orsaken till den). Detta kan ske när en specifik testkemikalie inte avlägsnas fullständigt från vävnaden genom sköljning eller när den penetrerar överhuden. Om testkemikalien reagerar direkt på MTT (dvs. MTT-reduktion sker), är naturfärgad eller färgas under behandlingen av vävnaden, bör ytterligare kontroller göras så att man kan upptäcka och korrigera för testkemikaliens störande inverkan på tekniken för mätning av viabiliteten. Detaljerad beskrivning hur direkt MTT-reduktion och störningar av färgämnen kan korrigeras finns i de operativa standardförfarandena för de tre validerade metoderna (26) (27) (28).

Kriterier för godkännande

27. För varje metod där giltiga RhE-modellsatser används (se punkt 21) ska de vävnader som behandlats med negativ kontroll visa ett OD-värde som avspeglar kvaliteten på vävnader som har följt alla transport- och mottagningsförfaranden och alla protokollprocesser. Kontrollernas OD-värden bör inte ligga under de historiskt fastställda gränserna. Likaså bör vävnader som behandlats med den positiva kontrollkemikalien (5-procentig vattenlösning av natriumdodekylsulfat) avspegla deras förmåga att ge respons på en irritationsframkallade kemikalie i testmetodens betingelser (26) (27) (28). Lämpliga mått för variationerna mellan vävnadsbitarna bör fastställas (om t.ex. standardavvikelser används bör de ligga inom det ensidiga toleransintervall på 95 % som beräknats enligt historiska data, och för den validerade referensmetoden bör standardavvikelsen ligga under 18 %).

Tolkning av resultaten och förutsägbarhetsmodell

28. De OD-värden som erhålls för varje testkemikalie kan användas för att beräkna procentuell viabilitet jämfört med den negativa kontrollen, som fastställs till 100 %. Det procentuella viabilitetsgränsvärdet skiljer irriterande testkemikalier från icke-klassificerade testkemikalier, och det eller de statistiska förfarande(n) som används för att utvärdera resultaten och identifiera irriterande ämnen ska vara klart definierade och dokumenterade och ska vara bevisat lämpliga. Gränsvärdena för förutsägelse av irritation anges nedan.

— Testkemikalien anses vara irriterande för huden enligt kategori 2 i FN:s GHS eller CLP-förordningen om vävnadsviabiliteten efter exponering och efterföljande inkubation är mindre än eller lika med (≤) 50 %.

— Beroende på den rättsliga ram inom vilken resultaten från denna testmetod används, kan testkemikalien anses vara icke-irriterande för huden enligt ”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen om vävnadsviabiliteten efter exponeringen och efterföljande inkubation är mer än (>) 50 %.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

29. För varje omgång ska data från enskilda vävnadsbitar (t.ex. OD-värden och data om beräknad procentuell cellviabilitet för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform, i tillämpliga fall även data från upprepade försök. Dessutom ska medelvärden ± standardavvikelser för varje omgång rapporteras. Observerade interaktioner med MTT-reagenser och färgade testkemikalier ska rapporteras för varje testad kemikalie.

▼**M3**

Testrapport

30. Testrapporten ska innehålla följande information:

Test- och kontrollkemikalier:

— Kemikaliens namn – CAS-namn och -nummer, EG-namn och -nummer, om kända.

— Kemikaliens renhet och sammansättning (i procent per vikt).

— Fysikaliska/kemiska egenskaper som är relevanta för utförandet av undersökningen (t.ex. fysiskt tillstånd, stabilitet och flyktighet, pH-värde och vattenlöslighet, om kända).

— Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Lagringsförhållanden.

Motivering för den RhE-modell och det protokoll som använts.

Testbetingelser:

— Cellsystem.

— Fullständig stödjande information för den specifika RhE-modell som använts, inklusive modellens prestanda. Informationen ska omfatta men inte vara begränsad till följande:

  i) Viabilitet.

  ii) Barriärfunktion.

  iii) Morfologi.

  iv) Reproducerbarhet och förutsägbarhet.

  v) Kvalitetskontroller av modellen.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

— Använda testdoser, exponeringens varaktighet och inkubationstid efter behandlingen.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. Dessa ska omfatta men inte vara begränsade till följande:

  i) Uppgifter om huruvida kvalitetskontrolldata är godtagbara med avseende på historiska uppgifter om respektive använd sats.

  ii) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa kontrollvärdena är godtagbara med avseende på positiva och negativa medelvärden och värdeområden.

— Beskrivning av använda utvärderingskriterier, inklusive motivering för valet av förutsägbarhetsmodellens gränsvärde(n).

— Hänvisningar till historiska kontrolldata.

▼M3

Resultat:

— Data i tabellform för enskilda testkemikalier för varje omgång och varje vävnadsmätning.

— Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

HÄNVISNINGAR

(1) UN (2009), *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS*), Third revised edition, UN New York and Geneva. Finns på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the ”Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards”, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(3) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. och Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. och Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

▼**M3**

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. och Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. och Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. och Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. och Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109–129.

(16) Spielmann, H., mailto: Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto: Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. och Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559–601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. och Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. och Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351–358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html

(24) Welss, T., Basketter, D.A. och Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, *Toxicol. in Vitro* 18, 231–243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. och Maibach, H.I. (1995), *Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis*, sidorna 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugoåttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (EUT L 225, 21.8.2001, s. 1).

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. och Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1–4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. och Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal*in vivo* data, ALTEX, 14, 359–365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. och Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109–116.

▼M3

Tillägg 1

Definitioner

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (9).

Cellviabilitet: En parameter för att mäta den totala aktiviteten hos en cellpopulation, t.ex. förmågan hos cellulära mitokondriella dehydrogenaser att reducera det vitala färgämnet MTT (3–(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet levande celler och/eller cellernas vitalitet.

Konkordans: Ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och en aspekt av relevans. Termen används omväxlande med exakthet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa (9).

ET_{50}: Uppskattas genom bestämning av den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % vid applicering av markörkemikalien vid en specificerad, fast koncentration; se även IC_{50}.

CLP-förordningen (Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar): Genom denna förordning genomförs i Europeiska unionen (EU) FN:s GHS-system för klassificering och märkning av kemikalier (ämnen och blandningar) (3).

GHS (det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier – Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): Ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

IC_{50}: Kan uppskattas genom bestämning av den koncentration vid vilken en markörkemikalie minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC_{50}) efter en fast exponeringstid; se även ET_{50}.

Infinit dos: Den mängd applicerad testkemikalie som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka hudens yta med ett jämnt lager.

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för en testmetod som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. En sådan testmetod kan vara en kandidat för jämförande validering. Kallas även ”liknande testmetod” (9).

Prestandastandarder (PS): Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Dessa standarder omfattar i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade metoden fungerar tillfredsställande och iii) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (9).

▼**M3**

Referenskemikalier: Kemikalier som valts för användning i valideringsprocessen och för vilka responsen i *in vitro*- eller *in vivo*-referenstestsystem eller på de berörda arterna är känd. Kemikalierna bör vara representativa för de kemikalieklasser som testmetoden är avsedd för och bör representera hela skalan av respons som kan förväntas för de kemikalier som testas med metoden, från stark till svag till negativ. Det kan krävas olika uppsättningar referenskemikalier för valideringsprocessens olika skeden och för olika testmetoder och testanvändningar (9).

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods exakthet (konkordans) (9).

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (9).

Ersättningstest: Ett test som är utformat att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier (9).

Känslighet: Den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Begreppet är ett mått på exaktheten hos sådana testmetoder som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (9).

Hudirritation: När en reversibel skada uppstår på huden i upp till fyra timmar efter applicering av en testkemikalie. Hudirritation är en lokal icke-immunogenisk reaktion som uppstår kort efter stimulans (29). Den mest utmärkande egenskapen är den reversibla processen som omfattar inflammatoriska reaktioner och de flesta av de kliniskt karakteristiska tecknen på irritation (hudrodnad, ödem, klåda och smärta) som hör samman med en inflammatorisk process.

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Begreppet är ett mått på exaktheten hos sådana testmetoder som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (9).

Stegvis testningsstrategi: Testning där testmetoder används i serie så att de testmetoder som väljs på varje efterföljande nivå bestäms på grundval av föregående testningsnivå (9).

Testkemikalie (kallas också testämne): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M3

Tillägg 2

Prestandastandarder för bedömning av föreslagna liknande eller modifierade *in vitro*-metoder med rekonstruerad human hud (RhE) för att testa hudirritation

INLEDNING

1. Syftet med prestandastandarder är att tillhandahålla en grund för att fastställa att nya testmetoder, både äganderättsligt skyddade (dvs. metoder med upphovsrätt, varumärke, registrering) och allmänt tillgängliga metoder är tillräckligt exakta och tillförlitliga för specifika testningsändamål. Dessa prestandastandarder, som grundar sig på validerade och godtagna testmetoder, kan användas för att utvärdera tillförlitligheten och exaktheten hos andra analoga metoder (vardagligt även kallade me too-test) som grundar sig på liknande vetenskapliga principer och som mäter eller förutser samma biologiska eller toxikologiska effekt (9).

2. Innan man antar modifierade metoder (dvs. föreslagna potentiella förbättringar av en godkänd metod) krävs en utvärdering för att fastställa de föreslagna ändringarnas inverkan på testets prestanda och i vilken utsträckning förändringarna påverkar den information som finns att tillgå för de andra komponenterna i valideringsprocessen. Beroende på de föreslagna ändringarnas antal och karaktär, genererade data och stödjande dokumentation för ändringarna, bör de antingen vara föremål för samma valideringsprocess som gäller för nya testmetoder eller, där det är lämpligt, för en begränsad bedömning av tillförlitlighet och relevans med användning av etablerade prestandastandarder (9).

3. Liknande (me too-metoder) eller modifierade metoder av någon av de tre validerade metoderna (EpiSkin™ [validerad referensmetod], EpiDerm™ SIT [EPI-200] och SkinEthic™ RHE) som föreslås för användning inom denna testmetod bör utvärderas för tillförlitlighet och exakthet när man använder kemikalier som representerar hela skalan av Draizes irritationspoäng. Vid utvärderingen med användning av de 20 rekommenderade referenskemikalierna enligt prestandastandarden (tabell 1) bör de föreslagna liknande eller modifierade metodernas värden för tillförlitlighet och exakthet vara jämförbara med eller bättre än de värden som fås med den validerade referensmetoden (tabell 2) (2) (16). De värden för tillförlitlighet och exakthet som bör nås anges i punkterna 8–12 i detta tillägg. Kemikalier i kategorin ”inte klassificerad” (”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) och kategorin ”klassificerad” (kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) (1) som representerar olika kemiska klasser ingår, så att den föreslagna metodens tillförlitlighet och exakthet (känslighet, specificitet och totala exakthet) kan jämföras med motsvarande värden för den validerade referensmetoden. Metodens tillförlitlighet, såväl som metodens förmåga att korrekt identifiera irriterande kemikalier i kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen och, beroende på den rättsliga ram som gäller för de uppgifter som tas fram, även metodens förmåga att korrekt identifiera ”ingen kategori”-kemikalier enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen, bör bestämmas innan metoden används för testning av nya kemikalier.

4. Dessa prestandastandarder baserar sig på EC-ECVAM:s prestandastandarder (8) som uppdaterats enligt FN:s GHS eller CLP-förordningens system för klassificering och märkning (1) (3). De ursprungliga prestandastandarderna fastställdes efter att valideringsstudien hade slutförts (21) och baserade sig på EU-klassificeringssystemet enligt kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugoåttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen ([1]). Till följd av att FN:s GHS-system för klassificering och märkning

([1]) EGT L 225, 21.8.2001, s. 1.

▼M3

antogs i EU (CLP-förordningen) (3), vilket gjordes mellan slutförandet av valideringsstudien och slutförandet av denna testmetod (8), har prestandastandarderna uppdaterats. Uppdateringen gäller främst ändringar av i) uppsättningen referenskemikalier för prestandastandarderna och ii) de värden som fastställts för tillförlitlighet och exakthet (2) (23).

PRESTANDASTANDARDER FÖR IN VITRO-TESTMETODER MED RhE FÖR HUDIRRITATION

5. Prestandastandarderna består av följande tre element (9):

I. Testmetodens grundläggande komponenter

II. En minimiförteckning med referenskemikalier.

III. Definierade värden för tillförlitlighet och exakthet.

I. **Testmetodens grundläggande komponenter**

6. Dessa består av de grundläggande strukturella, funktionella och förfarandemässiga delarna i en validerad metod som bör ingå i protokollet för en föreslagen mekaniskt och funktionellt liknande eller modifierad metod. Dessa komponenter omfattar metodens unika egenskaper, kritiska förfarandemässiga detaljer och åtgärder för kvalitetskontroll. Att följa testmetodens grundläggande komponenter hjälper till att säkerställa att liknande eller modifierade metoder baserar sig på samma koncept som den motsvarande validerade referensmetoden (9). Testmetodens grundläggande komponenter beskrivs i detalj i punkterna 16–21 i testmetoden och testningen bör utföras enligt följande:

— Allmänna villkor (punkt 16).

— Funktionella villkor, som omfattar

  — viabilitet (punkt 17),

  — barriärfunktion (punkt 18),

  — morfologi (punkt 19),

  — reproducerbarhet (punkt 20), och

  — kvalitetskontroll (punkt 21).

II. **Minimiförteckning över referenskemikalier**

7. Referenskemikalier används för att bestämma tillförlitligheten och exaktheten hos en föreslagen liknande eller modifierad metod som har påvisats vara strukturellt och funktionellt tillräckligt motsvarande den validerade referensmetoden eller som representerar en mindre modifiering av en av de tre validerade metoderna, är jämförbar med eller är bättre än den validerade referensmetoden (2) (8) (16) (23). De 20 rekommenderade referenskemikalierna som förtecknas i tabell 1 omfattar kemikalier som representerar olika kemiska klasser (dvs. kemiska kategorier på grundval av funktionella grupper) och är representativa för hela skalan av Draizes irritationspoäng (från icke-irriterande till kraftigt irriterande). Kemikalierna i denna förteckning består av tio kemikalier i kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen och tio icke-kategoriserade kemikalier, av vilka tre är frivilliga kemikalier i kategori 3 enligt FN:s GHS. Enligt denna testmetod anses den valfria kategorin 3 som ”ingen kategori”. Kemikalierna som förtecknas i tabell 1 är valda från de kemikalier som använts i optimeringsfasen som följde på förvalidering och i valideringsstudien för den validerade referensmetoden, med avseende på kemisk funktionalitet och fysikaliskt tillstånd (14) (18). Dessa referenskemikalier representerar det minsta antal kemikalier som bör användas för att utvärdera exaktheten och tillförlitligheten för föreslagna liknande eller modifierade metoder, men bör inte

▼M3

användas när nya metoder tas fram. I situationer där en kemikalie enligt förteckningen inte finns att tillgå, kan man använda andra kemikalier för vilka det finns adekvata *in vivo*-referensdata, primärt från de kemikalier som använts i optimeringsfasen som följt på förvalideringen eller valideringsstudien för den validerade referensmetoden. Om man vill kan ytterligare kemikalier från andra kemiska klasser för vilka det finns adekvata *in vivo*-referensdata läggas till minimiförteckningen över referenskemikalier för ytterligare utvärdering av den föreslagna testmetodens exakthet.

Tabell 1

Minimiförteckning över referenskemikalier för bestämning av exakthet och tillförlitlighet för liknande eller modifierade RhE-metoder för hudirritation (1)

Kemikalie	CAS-nummer	Fysikaliskt tillstånd	*In vivo*-gradering	Validerad referensmetod *in vitro*-kat.	FN:s GHS eller EU:s CLP *in vivo*-kat.
1-brom-4-klorbutan	6940-78-9	Vätska	0	Kat. 2	Ingen kat.
dietylftalat	84-66-2	Vätska	0	Ingen kat.	Ingen kat.
naftalenättiksyra	86-87-3	Fast ämne	0	Ingen kat.	Ingen kat.
allylfenoxiacetat	7493-74-5	Vätska	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	Vätska	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
4-metyltiobensaldehyd	3446-89-7	Vätska	1	Kat. 2	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	Fast ämne	1	Ingen kat.	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	Vätska	1,7	Ingen kat.	Ingen kat.
hexylsalicylat	6259-76-3	Vätska	2	Ingen kat.	Ingen kat.
kanelaldehyd	104-55-2	Vätska	2	Kat. 2	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) (3)
1-dekanol (2)	*112-30-1*	*Vätska*	*2,3*	*Kat. 2*	*Kat. 2*
cyklamenaldehyd	103-95-7	Vätska	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	Vätska	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-klormetyl-3,5-dimetyl-4-metoxipyridin HCl	86604-75-3	Fast ämne	2,7	Kat. 2	Kat. 2
di-n-propyldisulfid (2)	*629-19-6*	*Vätska*	*3*	*Ingen kat.*	*Kat. 2*
kaliumhydroxid (5 % vattenlösning)	1310-58-3	Vätska	3	Kat. 2	Kat. 2
bensentiol, 5-(1,1-dimetyletyl)-2-metyl	7340-90-1	Vätska	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	Fast ämne	3,3	Kat. 2	Kat. 2

▼M3

Kemikalie	CAS-nummer	Fysikaliskt tillstånd	*In vivo*-gradering	Validerad referensmetod *in vitro*-kat.	FN:s GHS eller EU:s CLP *in vivo*-kat.
heptanal	111-71-7	Vätska	3,4	Kat. 2	Kat. 2
tetrakloretylen	127-18-4	Vätska	4	Kat. 2	Kat. 2

([1]) Urvalet kemikalier baserar sig på följande kriterier: i) kemikalierna finns kommersiellt tillgängliga, ii) de är representativa för hela skalan av Draizes irritationspoäng (från icke-irriterande till kraftigt irriterande), iii) de har en väl definierad kemisk struktur, iv) de är representativa för den kemiska funktionalitet som används i valideringsprocessen och v) de är inte förknippade med någon extremt toxisk profil (t.ex. karcinogena eller toxiska för reproduktionssystemet) och de är inte förknippade med orimliga bortskaffningskostnader.

([2]) Kemikalier som är irriterande på kanin men för vilka det finns tillförlitliga belägg om att de inte är irriterande för människor (31) (32) (33).

([3]) Enligt FN:s GHS, inte enligt CLP-förordningen.

III. **Definierade värden för tillförlitlighet och exakthet.**

8. För att etablera tillförlitligheten och relevansen för föreslagna liknande eller modifierade metoder som kan överföras mellan laboratorier bör alla 20 referenskemikalierna i tabell 1 testas i minst tre laboratorier. Om den föreslagna metoden endast ska användas i ett enskilt laboratorium krävs inte testning i flera laboratorier för valideringen. Det är ändå av största vikt att sådana valideringsstudier bedöms fristående av internationellt erkända valideringsorgan, i enlighet med internationella riktlinjer (9). Alla 20 referenskemikalierna ska i varje laboratorium testas vid tre oberoende omgångar som genomförs med olika vävnadsuppsättningar och med tillräckliga tidsintervaller mellan varandra. Varje omgång ska minst bestå av tre parallellt testade vävnadsbitar för varje berörd testkemikalie, negativ kontroll och positiv kontroll.

9. Vid beräkningen av värden för tillförlitlighet och exakthet för den föreslagna metoden bör alla de fyra nedan angivna kriterierna beaktas, för att garantera att tillförlitlighet och relevans bestäms på ett förhandsdefinierat och enhetligt sätt:

   1. Endast data från testomgångar som ingår i fullständiga sekvenser får användas för beräkning av metodens variabilitet inom och mellan laboratorier och förutsägande kapacitet (exakthet).

   2. Den slutliga klassificeringen för varje referenskemikalie i varje deltagande laboratorium ska göras genom att använda viabilitetsmedelvärdet för de olika omgångarna som ingår i en fullständig sekvens.

   3. Endast data som erhållits för kemikalier för vilka det har gjorts fullständiga sekvenser av testomgångar i alla deltagande laboratorier får användas för beräkning av metodens variabilitet mellan laboratorier.

   4. Värdena för exakthet ska beräknas på grundval av de enskilda laboratoriernas förutsägelser som erhållits för de 20 referenskemikalierna vid de olika deltagande laboratorierna.

   I detta sammanhang avses med **sekvens av omgångar** tre oberoende testomgångar vid ett laboratorium för en testkemikalie. En **fullständig sekvens av omgångar** är en sekvens för en testkemikalie vid ett laboratorium där alla tre testomgångarna är giltiga. Det betyder att en enskild ogiltig omgång gör hela sekvensen på tre omgångar ogiltig.

Reproducerbarhet inom laboratorier

10. En utvärdering av reproducerbarheten inom ett laboratorium bör ge en konkordans för klassificeringar (kategori 2 och ”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) som erhålls i olika och oberoende testomgångar med de 20 referenskemikalierna vid ett enda laboratorium. Konkordansen ska vara lika med eller högre (≥) än 90 %.

▼M3

Reproducerbarhet mellan laboratorier

11. En utvärdering av reproducerbarheten mellan laboratorier är inte nödvändig om den föreslagna metoden endast ska användas vid ett enskilt laboratorium. För metoder som ska överföras mellan laboratorier ska den konkordans för klassificeringarna (kategori 2 och ”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) som erhålls i olika och oberoende testomgångar med de 20 referenskemikalierna mellan helst minst tre laboratorier vara lika med eller högre (≥) än 80 %.

Förutsägande kapacitet (exakthet)

12. Exaktheten (känslighet, specificitet och total exakthet) för den föreslagna liknande eller modifierade metoden bör vara jämförbar med eller bättre än exaktheten för den validerade referensmetoden, med beaktande av tilläggsinformation rörande relevans hos arten i fråga (tabell 2). Känsligheten ska vara lika med eller högre (≥) än 80 % (2) (8) (23). Det finns också en ytterligare särskild begränsning som gäller för känsligheten hos den föreslagna *in vitro*-metoden såtillvida att endast två *in vivo*-kemikalier i kategori 2, *1-dekanol* och *di-n-propyldisulfid,* får klassificeras felaktigt som ”ingen kategori” av fler än ett deltagande laboratorium. Specificiteten ska vara lika med eller högre (≥) än 70 % (2) (8) (23). Det finns inga ytterligare begränsningar rörande specificiteten för den föreslagna *in vitro*-metoden, dvs. de deltagande laboratorierna får felklassificera *in vivo*-kemikalier som ”ingen kategori” så länge som testmetodens slutliga specificitet ligger inom det godtagbara området. Den totala exaktheten ska vara lika med eller högre (≥) än 75 % (2) (8) (23). Även om den validerade referensmetodens känslighet beräknad för de 20 referenskemikalierna som förtecknas i tabell 1 är lika med 90 %, är det definierade minimivärdet för känsligheten som krävs för alla liknande eller modifierade metoder som övervägs satt till 80 %, eftersom både *1-dekanol* (en gränskemikalie) och *di-n-propyldisulfid* (falsk negativ i den validerade referensmetoden) är kända för att vara icke-irriterande för människa (31) (32) (33), även om de identifieras som irriterande ämnen i kaninstest. Eftersom RhE-modellerna är baserade på celler av mänskligt ursprung kan de förutsäga att dessa kemikalier inte är irriterande (”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen).

Tabell 2

Förutsägande värden för känslighet, specificitet och total exakthet som krävs för att en liknande eller modifierad metod ska anses vara giltig

Känslighet	Specificitet	Total exakthet
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kriterier för godkännande av ett försök

13. Det är möjligt att ett eller flera test som hör samman med en eller flera testkemikalier inte uppfyller kriterierna för godkänt för test- och kontrollkemikalierna eller inte kan godkännas av andra orsaker. För att komplettera data som saknas är det tillåtet att för varje testkemikalie göra högst två tilläggstest (omtestning). Det betyder alltså att då även positiv kontroll och negativ kontroll måste testas parallellt vid omtestning får man genomföra högst två extra omgångar för varje testkemikalie.

14. Det är möjligt, även efter omtestning, att det minimiantal på tre giltiga omgångar som krävs för varje testad kemikalie inte erhålls för varje referenskemikalie i varje deltagande laboratorium, och då är den resulterande datamatrisen ofullständig. I sådana fall bör alla följande tre kriterier uppfyllas för att datauppsättningarna ska anses vara godtagbara:

    1. Det bör finnas minst en fullständig sekvens av omgångar för alla 20 referenskemikalierna.

▼**M3**

2. I minst tre deltagande laboratorier måste minst 85 % av sekvenserna vara fullständiga (för 20 kemikalier, dvs. 3 ogiltiga sekvenser tillåts i ett enskilt laboratorium).

3. Minst 90 % av alla möjliga sekvenser från minst tre laboratorier måste vara fullständiga (för 20 kemikalier som testats i tre laboratorier, dvs. totalt tillåts 6 ogiltiga sekvenser).

▼M2

B. 47 TESTMETODEN BCOP (BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY) FÖR KLASSIFICERING AV ÄMNEN SOM FRÄTANDE ELLER KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN

INLEDNING

1. BCOP-testmetoden är en *in vitro*-testmetod som under vissa omständigheter och med vissa begränsningar kan användas för att klassificera ämnen och blandningar som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen (1) (2) (3). Med kraftigt irriterande för ögonen avses här sådana ämnen som framkallar okulära skador som kvarstår hos kanin under minst 21 dagar efter applicering. Även om BCOP-testmetoden inte anses vara godtagbar som en fullständig ersättning för *in vivo*-ögontest på kanin, rekommenderas testmetoden som en del av en strategi för stegvis testning när det gäller rättslig klassificering och märkning inom ett visst tillämpningsområde (4) (5). De ämnen och blandningar som testas (6) kan klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen utan ytterligare testning på kaniner. Ett ämne som ger negativt utslag behöver testas på kaniner med en stegvis testningsstrategi enligt OECD:s testriktlinjer 405 (7) (kapitel B.5 i denna bilaga).

2. Syftet är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera potentiellt frätande eller kraftigt irriterande egenskaper hos ett testämne, uppmätta som ämnets förmåga att framkalla opacitet och öka permeabiliteten i en isolerad hornhinna från nötkreatur. De toxiska effekterna på hornhinnan mäts med hjälp av i) minskad ljustransmission (opacitet) och ii) ökad passage av natriumfluorescein (permeabilitet). Bedömningen av hornhinnans opacitet och permeabilitet efter exponeringen för testämnet kombineras till ett IVIS-värde (*In Vitro* Irritancy Score), som används för att klassificera testämnets förmåga att framkalla irritation.

3. Ögonirriterande ämnen som framkallar skador som läker på mindre än 21 dagar och icke-irriterande ämnen har också testats med BCOP-testmetoden. BCOP-testmetodens exakthet och tillförlitlighet i fråga om ämnen i dessa kategorier har dock inte utvärderats formellt.

4. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Testmetoden baserar sig på BCOP-testmetodsprotokollet från amerikanska ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (8), som har tagits fram efter en internationell valideringsstudie (4) (5) (9), med bidrag från Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM). Protokollet baserar sig på uppgifter från IIVS (Institute for In Vitro Sciences) och INVITTOX-protokollet 124 (10), som representerar det protokoll som användes för den förvalideringsstudie av BCOP-test som genomfördes 1997–1998 och sponsrades av Europeiska gemenskapen. Båda dessa protokoll baserar sig på den BCOP-testmetod som först rapporterades av Gautheron m.fl. (11).

▼M2

6. De identifierade begränsningarna för denna testmetod baserar sig på höga falska positiva värden för alkoholer och ketoner och höga falska negativa värden för fasta ämnen som observerats i valideringsdatabasen (se punkt 44 (5)). När ämnen från dessa kemiska och fysikaliska klasser utesluts ur databasen får man en klart bättre exakthet för BCOP i EU-, EPA- och GHS-klassifikationssystemen (5). Om man ser till syftet med detta test (dvs. att enbart identifiera ämnen som är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen) är falska negativa värden inte kritiska, eftersom sådana ämnen därefter testas på kaniner eller med andra väl validerade *in vitro*-test, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning enligt principen om sammanvägd bedömning. Dessutom gav den aktuella valideringsdatabasen ingen möjlighet till en tillfredsställande utvärdering av vissa kemiska klasser eller produktklasser (t.ex. blandningar). Man kan dock överväga användning av denna testmetod för alla typer av ämnen (inbegripet blandningar) och likaså kan ett positivt resultat godtas som på tecken på att ämnet är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen. Positiva resultat från test med alkoholer eller ketoner bör dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.

7. Alla förfaranden som omfattar ögon och hornhinnor från nötkreatur bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (12).

8. Testmetoden har som begränsning att även om den beaktar vissa av de okulära effekterna som framkallas vid test av ögonirritation hos kanin och i viss utsträckning effekternas allvarlighetsgrad, beaktar den inte skador på konjunktiva eller iris. Dessutom gäller att även om reversibiliteten hos hornhinneskador i sig inte kan utvärderas med BCOP-test, har det på grundval av studier av kaninögon föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för hornhinneskada kan användas för att skilja mellan irreversibla och reversibla effekter (13). Slutligen gäller att BCOP inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.

9. Det pågår arbete för att ytterligare karakterisera BCOP-testmetodens användbarhet och begränsningar när det gäller att identifiera ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande (se också punkt 45). Användarna uppmuntras också att lämna uppgifter om prover och/eller data till valideringsorganisationer för formell utvärdering av eventuella framtida användningar av BCOP-testmetoden, även när det gäller identifiering av ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande.

10. Laboratorier som tar testmetoden i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i tillägg 2. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra BCOP-test innan det lämnar in BCOP-testdata avsedda för lagenlig faroklassificering.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. BCOP-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken hornhinnan från nötkreatur under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion *in vitro*. Testmetoden innebär att skador framkallade av testämnet bedöms med kvantitativa mätningar av ändringar i korneal opacitet och permeabilitet med opacitetsmätare respektive spektrofotometer för synligt ljus. Med hjälp av resultaten från de två mätningarna beräknas ett IVIS-värde som används för att bestämma en *in vitro*-klassificering av farokategori för prognos av testämnets potential att framkalla ögonirritation *in vivo* (se beslutskriterierna).

▼M2

12. För BCOP-testmetoden används isolerade hornhinnor från ögon som tillvaratagits från nyligen slaktade nötkreatur. Den korneala opaciteten mäts kvantitativt som ljustransmissionen genom hornhinnan. Permeabiliteten mäts kvantitativt som mängden natriumfluorescein som passerar genom hornhinnans hela djup enligt mätning i mediet i hornhinnehållarens bakre kammare. Testämnena appliceras på hornhinnans epitelyta via den främre kammaren. I tillägg 3 finns en beskrivning och en schematisk bild av den hornhinnehållare som används vid BCOP-testmetoden. Hornhinnehållare finns att köpa på marknaden hos olika leverantörer eller kan konstrueras i laboratoriet.

Källa och ålder för ögon från nötkreatur, val av djurart

13. Nötkreatur som sänds till slakterier avlivas i regel för användning som livsmedel eller för andra kommersiella ändamål. Endast friska djur som anses vara lämpliga för användning i livsmedelskedjan får användas för tillvaratagande av hornhinnor som används vid BCOP-testmetoden. Eftersom nötkreaturens vikt kan variera stort beroende på ras, ålder och kön finns det ingen rekommenderad slaktvikt för de djur som används.

14. Hornhinnornas dimensioner kan variera beroende på djurens ålder. Hornhinnor med en horisontell diameter > 30,5 mm och en central hornhinnetjocklek (CCT) ≥ 1 100 μm kommer i regel från nötkreatur som är äldre än åtta år, medan hornhinnor med en horisontell diameter < 28,5 mm och CCT < 900 μm i regel kommer från nötkreatur som är yngre än fem år (14). Därför används normalt inte ögon från nötkreatur som är äldre än 60 månader. Ögon från nötkreatur som är yngre än 12 månader används i regel inte eftersom ögonen fortfarande håller på att utvecklas och hornhinnans tjocklek och diameter är betydligt mindre än de värden som rapporteras för ögon från vuxna nötkreatur. Hornhinnor från unga djur (6–12 månader) får dock användas eftersom det medför vissa fördelar såsom bättre tillgänglighet, smalare åldersintervall och lägre risker för att de anställda exponeras för bovin spongiform encefalopati (15). Det vore värdefullt med ytterligare utvärdering av hur hornhinnans storlek eller tjocklek påverkar responsen från frätande och irriterande ämnen, och därför uppmanas användarna att rapportera uppskattad ålder och/eller vikt för de djur vars hornhinna använts för undersökningen.

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

15. Ögonen tas till vara av slakteriets personal. För att minimera mekaniska och andra typer av skador på ögonen bör dessa tas till vara så snart som möjligt efter slakten. För att hindra att ögonen exponeras för potentiellt irriterande ämnen bör rengöringsmedel inte användas vid sköljning av djurets huvud vid slakteriet.

16. Ögonen bör hållas helt nedsänkta i HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) i ett kärl av lämplig storlek, och transporteras till laboratoriet på sådant sätt att skador och/eller bakterieförorening minimeras. Eftersom ögonen tas till vara under slaktningen utsätts de eventuellt för blod och andra biologiska ämnen, inbegripet bakterier och andra mikroorganismer. Det är därför viktigt att minimera föroreningsrisken (t.ex. genom att hålla kärlet med ögonen på krossad is eller lägga till antibiotika i HBSS-förvaringslösningen, t.ex. 100 IU/ml penicillin eller 100 μg/ml streptomycin).

▼M2

17. Tiden mellan tillvaratagande av ögonen och användningen av hornhinnorna i BCOP-test bör minimeras (normalt bör tillvaratagande och användning ske inom samma dag) och det måste påvisas att väntetiden inte stör analysresultaten. Dessa baserar sig på urvalskriterierna för ögonen såväl som positiv och negativ kontrollrespons. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits en viss dag.

Urvalskriterier för ögon som används för BCOP-test

18. När ögonen har tagits emot vid laboratoriet ska de undersökas omsorgsfullt för skador såsom ökad opacitet, repor och nykärlsbildning. Endast hornhinnor från oskadade ögon får användas.

19. De individuella hornhinnornas kvalitet utvärderas också i senare steg i testningen. Hornhinnor vars opacitet efter en inledande jämviktsperiod på en timme är högre än sju opacitetsenheter ska förkastas (OBS: opacitetsmätaren ska kalibreras med opacitetsstandarder för opacitetsenheter, se tillägg 3).

20. Varje behandlingsgrupp (testämne, parallella negativa och positiva kontroller) ska bestå av minst tre ögon. För den negativa kontrollen vid BCOP-testning ska tre hornhinnor användas. Eftersom hornhinnorna skärs ut från globen som helhet och därefter monteras i hornhinnekamrarna, finns det en risk för att de individuella värdena för korneal opacitet och permeabilitet (inbegripet negativ kontroll) påverkas av artefakter från hanteringen. Vidare används opacitets- och permeabilitetsvärden från de negativa kontrollernas hornhinnor för att korrigera de opacitets- och permeabilitetsvärden från testade och positivkontrollerade hornhinnor som används för IVIS-beräkningarna.

FÖRFARANDE

Förberedning av ögonen

21. Defektfria hornhinnor skärs ut med en 2–3 mm omgivande kant av senhinna som är avsedd att underlätta efterföljande hantering. Var noga med att undvika skador på hornhinnans epitel och endotel. Hornhinnorna monteras en och en i särskilt utformade hornhinnehållare som har en bakre och en främre kammare som angränsar mot hornhinnans epitelsida respektive endotelsida. Båda kamrarna fylls med förvärmt EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) i överskott (bakre kammaren först). Se till så att det inte bildas bubblor. Därefter hålls utrustningen vid 32 ± 1 °C i minst en timme så att jämvikt nås mellan mediet och hornhinnorna och normal metabolisk aktivitet uppstår i den mån det är möjligt (en hornhinna *in vivo* har en ungefärlig temperatur på 32 °C).

22. Efter jämviktsperioden tillsätts färskt förvärmt EMEM till båda kamrarna och grundvärden för opacitet mäts på varje hornhinna. Alla hornhinnor som uppvisar en makroskopisk vävnadsskada (t.ex. repor, pigmentering, kärlnybildning) eller opacitet över 7 opacitetsenheter ska förkastas. Opacitetsmedelvärdet beräknas för alla jämviktsbehandlade hornhinnor. Minst tre hornhinnor med opacitetsvärden nära medianvärdet för alla hornhinnor väljs ut som exemplar för negativa kontroller (eller lösningsmedelskontroller). Återstående hornhinnor delas upp i behandlingsgrupp och positiv kontrollgrupp.

▼M2

23. Eftersom vatten har en högre värmekapacitet än luft, ger vatten stabilare temperaturförhållanden för inkubation. Därför rekommenderas vattenbad för att hålla hornhinnehållaren och dess innehåll vid 32 ± 1 °C. Luftinkubatorer kan dock också användas under förutsättning att temperaturen hålls stabil (t.ex. genom förvärmning av hållare och media).

Applicering av testämnet

24. Två olika behandlingsprotokoll används, ett för vätskor och ytaktiva ämnen (fasta eller flytande) och ett för fasta ämnen som inte är ytaktiva.

25. Vätskor testas i outspädd form, medan ytaktiva ämnen testas vid en koncentration på 10 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. Halvfasta ämnen, krämer och vaxer testas normalt som vätskor. Om andra utspädningskoncentrationer används bör detta motiveras. Hornhinnorna exponeras för vätskor och ytaktiva ämnen under 10 minuter. Om avvikande exponeringstider används bör tillbörlig vetenskaplig motivering ges.

26. Fasta ämnen som inte är ytaktiva testas normalt som lösningar eller suspensioner vid 20 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. I vissa förhållanden och med angivande av tillbörlig vetenskaplig motivering kan fasta ämnen också testas i ren form med direkt applicering på hornhinnans yta med användning av metoden med öppen kammare (se punkt 29). Hornhinnorna exponeras för fasta ämnen under fyra timmar, och på samma sätt som med vätskor och ytaktiva ämnen måste avvikande exponeringstider motiveras med tillbörliga vetenskapliga grunder.

27. Olika behandlingsmetoder kan användas, beroende på testämnets fysikaliska natur och kemiska egenskaper (t.ex. fasta ämnen, vätskor och viskösa respektive icke-viskösa vätskor). Den kritiska faktorn är att se till att testämnet täcker epitelytan tillräckligt och att det avlägsnas effektivt under sköljningsstegen. Metoden med sluten kammare används normalt vid testning av icke-viskösa till lätt viskösa vätskor, medan metoden med öppen kammare normalt används för semiviskösa och viskösa vätskor och rena fasta ämnen.

28. När sluten kammare används tillförs testämnet i den främre kammaren genom doseringshålen på kammarens övre yta i tillräcklig mängd (750 µl) för att täcka hornhinnans epitelsida och därefter hålls hålen förslutna med pluggar under exponeringen. Det är viktigt att varje hornhinna exponeras för testämnet under avsedd tidslängd.

29. När öppen kammare används ska den främre kammarens fönsterlåsring och glasfönster avlägsnas före behandlingen. Kontroll- eller testämne (750 µl eller tillräckligt för att täcka hornhinnan helt) tillförs direkt på hornhinnans epitelyta med hjälp av en mikropipett. Om testämnet är svårt att pipettera kan det i stället appliceras med en s.k. positive displacement-pipett. Positive displacement-pipettens spets införs i sprutans doseringsspets så att ämnet kan tryckas in i positive displacement-spetsen. Samtidigt dras sprutkolven ut medan pipettens pistong dras uppåt. Om det uppstår bubblor i pipettspetsen ska testämnet avlägsnas (tryckas ut) och förfarandet upprepas till dess att spetsen fylls utan att det uppstår luftbubblor. Vid behov kan man använda en vanlig spruta (utan nål) eftersom den ger möjlighet att mäta en exakt volym av testämnet och underlättar appliceringen på hornhinnans epitelyta. Efter doseringen monteras glasfönstret tillbaka på den främre kammaren så att systemet återförsluts.

▼M2

Inkubation efter exponering

30. Efter exponeringsperioden avlägsnas testämnet, eller ämnet som används för negativ eller positiv kontroll, från den främre kammaren och epitelytan tvättas minst tre gånger (eller till dess att inget testämne kan observeras visuellt på ytan) med EMEM (med fenolrött). Medium innehållande fenolrött används för sköljning eftersom färgändringen av fenolrött kan användas som indikator på effektiv sköljning av sura eller alkaliska material. Hornhinnorna ska tvättas mer än tre gånger om färgförändringen av fenolrött kvarstår (gult eller purpurrött) eller om rester av testämnet kan observeras. När mediet är rent från testämne görs en slutsköljning av hornhinnorna med EMEM (utan fenolrött). EMEM (utan fenolrött) används som slutsköljning för att säkerställa att allt fenolrött avlägsnas från den främre kammaren före opacitetsmätningen. Därefter fylls den främre kammaren på nytt med färskt EMEM utan fenolrött.

31. För vätskor och ytaktiva ämnen ska hornhinnorna efter sköljning inkuberas i ytterligare två timmar vid 32 ± 1 °C. Längre tider kan vara till fördel under vissa omständigheter och kan övervägas från fall till fall. Hornhinnor som exponerats för fasta ämnen sköljs grundligt efter den fyra timmar långa exponeringen och kräver ingen efterföljande inkubation.

32. Efter den inkubationsperiod som följer på exponeringen (vätskor och ytaktiva ämnen) eller efter slutet av den fyra timmar långa exponeringsperioden (icke-ytaktiva fasta ämnen) görs mätningar av opaciteten och permeabiliteten för varje hornhinna. Varje hornhinna granskas också visuellt och relevanta observationer noteras (t.ex. avflagning av vävnad, rester av testämne, oenhetliga opacitetsmönster). Sådana observationer kan vara viktiga eftersom de också är kopplade till variationer av opacitetsmätarens avläsningar.

Kontrollämnen

33. Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ingår i varje försök.

34. Vid testning av ett vätskeformigt ämne vid 100 % ska BCOP-testmetoden inbegripa en parallell negativ kontroll (t.ex. 0,9 % natriumkloridlösning eller destillerat vatten) så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens resultatmått. På så sätt säkerställs också att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.

35. Vid testning av en utspädd vätska, ett ytaktivt ämne eller ett fast ämne ska BCOP-testmetoden omfatta en parallell kontrollgrupp med lösningsmedel/vehikel så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens resultatmått. Endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet får användas.

36. Ett känt ögonirriterande ämne ska ingå som parallell positiv kontroll i varje försök för att bekräfta att rätt slags respons framkallas. Eftersom BCOP används i denna testmetod för att identifiera frätande eller kraftigt irriterande ämnen ska den positiva kontrollen helst göras med ett referensämne som framkallar kraftig respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsen kan bedömas över tiden bör den irritation som framkallas inte vara för stark.

37. Exempel på positiva kontrollämnen för testning av vätskor är dimetylformamid eller 1 % natriumhydroxid. Exempel på ett positivt kontrollämne för testning av fasta ämnen är 20 % (vikt/volym) imidazol i 0,9 % natriumkloridlösning.

▼M2

38. Referensämnen kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av resultatmått

39. Opaciteten bestäms enligt ljustransmissionen genom hornhinnan. Hornhinnans opacitet mäts kvantitativt med hjälp av en opacitetsmätare som mäter opacitetsvärden på en kontinuerlig skala.

40. Permeabiliteten bestäms med hjälp av mängden natriumfluorescein som passerar hela hornhinnan (dvs. epitelet på hornhinnans yttre yta och genom hornhinnan till endotelet på hornhinnans inre yta). 1 ml natriumfluoresceinlösning (4 eller 5 mg/ml vid testning av vätskor och ytaktiva ämnen respektive icke-ytaktiva fasta ämnen) tillförs hornhinnehållarens främre kammare (den som angränsar mot hornhinnans epitelsida) medan den bakre kammaren (den som angränsar mot hornhinnans endotelsida) fylls med färskt EMEM. Därefter inkuberas hållaren i horisontellt läge i 90 ± 5 minuter vid 32 ± 1 °C. Mängden natriumfluorescein som kommer in i den bakre kammaren mäts kvantitativt med hjälp av UV/VIS-spektrofotometri. De spektrofotometriska mätningarna vid 490 nm noteras som optisk densitet (OD_{490}) eller absorbansvärden som mäts på en kontinuerlig skala. Permeabilitetsvärdena för fluorescein bestäms genom OD_{490}-värden med en spektrofotometer för synligt ljus och en standardväglängd på 1 cm.

41. Alternativt kan man använda en 96-håls mikrotiterplatta förutsatt att i) det linjära området för avläsning av plattan när det gäller fluorescein OD_{490}-värden kan fastställas och ii) korrekt volym fluoresceinprover används i mikrotiterplattan för att få OD_{490}-värden som motsvarar standardväglängden 1 cm (för detta krävs eventuellt att brunnen är helt full, i regel 360 l).

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

42. När opacitetsvärdena och permeabilitetsmedelvärdena (OD_{490}) har korrigerats för bakgrundsopacitet och den negativa kontrollens permeabilitetsvärden OD_{490}, ska varje behandlingsgrupps medelvärden för opacitet och permeabilitet OD_{490} kombineras i en empiriskt härledd formel för beräkning av IVIS-värdet (*In Vitro Irritancy Score*) enligt följande:

$$IVIS = \text{medelvärdet för opacitet} + (15 \times \text{medelvärdet för permeabilitet } OD_{490})$$

Sina m.fl. (16) har rapporterat att denna formel härleddes under försök som utfördes inom och mellan laboratorier. Data som genererades för en serie med 36 föreningar i en undersökning som omfattade flera laboratorier användes som indata i en multivariat analys för bestämning av vilken ekvation som ger den bästa anpassningen mellan in vivo- och in vitro-data. Analysen genomfördes av forskare hos två separata företag och de resulterande ekvationerna var nästan identiska.

43. Opacitets- och permeabilitetsvärdena bör också utvärderas fristående för att fastställa huruvida ett testämne har en frätande eller kraftigt irriterande verkan endast genom ett av de två resultatmåtten (se beslutskriterierna).

▼M2

Beslutskriterier

44. Ett ämne som framkallar IVIS ≥ 55,1 definieras som ett frätande ämne eller kraftigt irriterande ämne. Som det konstateras i punkt 1 i fråga om testämnen som inte identifieras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen bör ytterligare testning genomföras för klassificerings- och märkningsändamål. BCOP-testmetoden har en övergripande exakthet på 79 % (113/143) till 81 % (119/147), falska positiva värden på 19 % (20/103) till 21 % (22/103) och falska negativa värden på 16 % (7/43) till 25 % (10/40) jämfört med *in vivo*-testning på kaninögon enligt klassifikationssystemen EPA (1), EU (2) eller GHS (3). När ämnen inom en viss kemikalieklass (t.ex. alkoholer eller ketoner) eller fysikalisk klass (t.ex. fasta ämnen) utesluts ur databasen, sträcker sig exaktheten hos BCOP inom klassifikationssystemen EU, EPA, och GHS från 87 % (72/83) till 92 % (78/85), falska positiva värden från 12 % (7/58) till 16 % (9/56) och falska negativa värden från 0 % (0/27) till 12 % (3/26).

45. Även om ett testämne inte klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen kan data från BCOP vara användbara i kombination med testdata från *in vivo*-test på kaninögon eller tillbörligt validerade *in vitro*-test, för vidare utvärdering av användbarheten och begränsningarna för BCOP-testmetoden när det gäller att identifiera ämnen som inte framkallar kraftig irritation eller som inte alls framkallar irritation (en vägledning om användning av *in vitro*-test för ögontoxicitet håller på att utarbetas).

Kriterier för godkännande av ett försök

46. Ett försök anses vara godkänt om den positiva kontrollen ger ett IVIS-värde som faller inom två standardavvikelser för det aktuella historiska medelvärdet, som måste uppdateras minst var tredje månad, eller varje gång ett godkänt test genomförs i laboratorier där försök genomförs oregelbundet (mindre än en gång per månad). Responsen från den negativa kontrollen eller lösningsmedels-/vehikelkontrollen bör ge opacitets- och permeabilitetsvärden som är lägre än de fastställda övre gränserna för bakgrundsvärden för opacitet och permeabilitet för nötkreatursho rnhinnor behandlade med negativa kontrollämnen eller lösningsmedel/vehikler.

Testrapport

47. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Test- och kontrollämnen

Kemiskt namn (kemiska namn) såsom det strukturella namn som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända namn.

CAS-registernummer (RN), om det är känt.

Ämnets eller blandningens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.

Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.

Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

Stabilitet, om den är känd.

▼**M2**

Uppgifter om sponsor och testanläggning

Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

Angivelse av ögonkällan (den anläggning där ögonen togs till vara).

Förvarings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tidpunkt för tillvaratagande, tidsperiod före inledning av försöket, transportmedium och temperaturförhållanden, eventuella antibiotika som använts).

Om möjligt specifika egenskaper för de djur från vilka ögonen togs till vara (t.ex. ålder, kön, vikt).

Motivering för den testmetod och det protokoll som använts

Testmetodens integritet

Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. exakthet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning av kvalifikationsämnen, användning av historiska data från negativa och positiva kontroller).

Kriterier för godtagbart försök

Godtagbara intervaller för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data.

Om tillämpligt, godtagbara intervaller för parallella referenskontroller på grundval av historiska data.

Försöksförhållanden

Beskrivning av testsystemet.

Typ av hornhinnebehållare.

Kalibreringsinformation för utrustning som använts för mätning av opacitet och permeabilitet (t.ex. opacitetsmätare och spektrofotometer).

Uppgifter om de nötkreatursh ornhinnor som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet.

Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

Testämneskoncentration(er).

Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Hänvisningar till modellens historiska data (t.ex. negativa och positiva kontroller, kvalifikationsämnen, referensämnen).

Beskrivning av utvärderingskriterierna.

Resultat

Data i tabellform för enskilda testprover (t.ex. opacitet och OD_{490}-värden och beräknade IVIS-värden för testämnet och de positiva och negativa kontrollerna samt referenskontroller om sådana ingått, inbegripet data från replikat och upprepade försök, beroende på vad som är lämpligt, och medelvärden inklusive standardavvikelse för varje försök).

Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) U.S. EPA (1996), Label Review Manual, andra utgåvan, EPA737-B-96-001, Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency.

▼**M2**

(2) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006, EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.

(3) FN (2007), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade utgåvan, New York och Genève, FN:s publikationer, 2007, finns på

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html

(4) ESAC (2007), Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants, finns på

http://ecvam.jrc.it/index.htm

(5) ICCVAM (2007), Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(6) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG, EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002), Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion, finns på

http://www.oecd.org/document/40/
0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.htm l

(8) ICCVAM (2007), ICCVAM:s rekommenderade testprotokoll för BCOP-testmetoden, ”ICCVAM Test Method Evaluation Report – In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives”, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(9) ICCVAM (2006), Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method, NIH:s publikation nr: 06-451, Research Triangle Park: National Toxicology Program, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) INVITTOX (1999), Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd, Ispra, Italien: Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM).

▼**M2**

(11) P. Gautheron, M. Dukic, D. Alix och J. F. Sina (1992), ”Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy”, *Fundam. Appl. Toxicol*, 18:442–449.

(12) J. D. Siegel, E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello och Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, finns på

http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf

(13) J. K. Maurer, R. D. Parker och J. V. Jester (2002), ”Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays”, *Reg. Tox. Pharmacol*, 36:106–117.

(14) M. J. Doughty, S. Petrou och H. Macmillan (1995), ”Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse”, *Can. J. Zool.* 73:2159–2165.

(15) J. Collee och R. Bradley (1997), ”BSE: A decade on – Part I”, *The Lancet* 349: 636–641.

(16) J. F. Sina, D. M. Galer, R. S. Sussman, P. D. Gautheron, E. V. Sargent, B. Leong, P. V. Shah, R. D. Curren och K. Miller (1995), ”A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates”, *Fundam Appl Toxicol* 26:20–31.

(17) ICCVAM (2006), Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

(18) ICCVAM (2006), Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

▼M2

Tillägg 1

DEFINITIONER

exakthet: mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat som fås med en testmetod.

referensämne: ett ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikaliska/kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för ett testämne. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan. Opaciteten kan utvärderas subjektivt (Draizes test på kaninögon) eller objektivt med ett instrument såsom en opacitetsmätare.

korneal permeabilitet: kvantitativt mått på skada på hornhinnans epitel genom bestämning av den mängd natriumfluorescein som passerar genom hornhinnans alla cellager.

EPA-kategori 1: frätande (irreversibel skada på okulär vävnad) eller kornealpåverkan eller irritation som varar mer än 21 dagar (1).

EU-kategori R41: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2).

falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativa. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (3).

▼M2

GHS-kategori 1: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (3).

fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

***In Vitro* Irritancy Score (IVIS):** en empiriskt härledd formel som används vid BCOP-test och där medelvärdet för opacitet och medelvärdet för permeabilitet för varje behandlingsgrupp kombineras till ett enda *in vitro*-värde. *IVIS* = medelvärdet för opacitet + (15 x medelvärdet för permeabilitet)

negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras parallellt med testämnesbehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

icke-irriterande: ämnen som inte klassificeras som ögonirriterande ämnen enligt EPA-kategori I, II, eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B.

frätande för ögonen: a) ett ämne som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) ämnen som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

irriterande för ögonen: a) ett ämne som orsakar en reversibel ändring på ögat efter applicering på ögats främre yta, b) ämnen som klassificeras som irriterande för ögonen enligt EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

kraftigt irriterande för ögonen: a) ett ämne som efter applicering på ögats främre yta orsakar vävnadsskada på ögat som inte har läkt inom 21 dagar efter appliceringen eller som orsakar kraftig synnedsättning, b) ämnen som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

opacitetsmätare: ett instrument för mätning av korneal opacitet genom en kvantitativ utvärdering av ljustransmissionen genom hornhinnan. Det har i regel två kamrar med var sin ljuskälla och var sin fotocell. Ena kammaren används för den behandlade hornhinnan och den andra används för kalibrering och nollställning av instrumentet. Ljus från en halogenlampa sänds genom kontrollkammaren (som är tom, utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display.

positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer över tiden kan bedömas, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

▼M2

tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln och som behandlas parallellt med testämnesbehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlats med testämnet upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

stegvis testning: En strategi för stegvis testning där all befintlig information om ett testämne granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (*weight of evidence*) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testämnets förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testämnets förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills det går att fastställa en otvetydig klassificering.

validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål

sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande ett ämnes faropotential.

▼M2

Tillägg 2

Kvalifikationsämnen för BCOP-testmetoden

Innan denna testmetod används rutinmässigt kan laboratoriet vilja påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av frätande verkan på ögonen för de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för lokal ögonirritation/frätande verkan enligt resultaten från *in vivo*-test på kaninögon (TG 405), dvs. kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering och märkning enligt FN GHS (3) (7). Med beaktande av det validerade ändamålet för dessa test (endast för identifiering av ämnen som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen) finns det dock bara två testutslag för klassificeringsändamål (frätande/kraftigt irriterande eller icke-frätande/icke kraftigt irriterande för ögonen) när det gäller att demonstrera kvalitet. Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till *in vivo*-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från de två *in vitro*-metoder för vilka testriktlinjer håller på att utarbetas. Därför valdes irriterande ämnen från ICCVAM:s förteckning med 122 referensämnen för validering av *in vitro*-testmetoder för okulär toxicitet (se tillägg H). Referensdata finns i *ICCVAM Background Review Document* för testmetoderna BCOP och ICE (17) (18).

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet hos BCOP

Ämne	CASRN	Kemisk klass (1)	Fysikalisk form	*In vivo*-klassificering (2)	*In vitro*-klassificering (3)
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
2,6-Diklorbensoylklorid	4659-45-4	Acylhalid	Vätska	Kategori 2A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2B	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande

▼M2

Ämne	CASRN	Kemisk klass (1)	Fysikalisk form	*In vivo*-klassificering (2)	*In vitro*-klassificering (3)
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen märkning	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
n-hexan	110-54-3	Kolväte (acykliskt)	Vätska	Ingen märkning	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

(1) De kemiska klasserna tilldelades vart och ett testämne med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) På grundval av *in vivo*-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av FN GHS (3) (7).

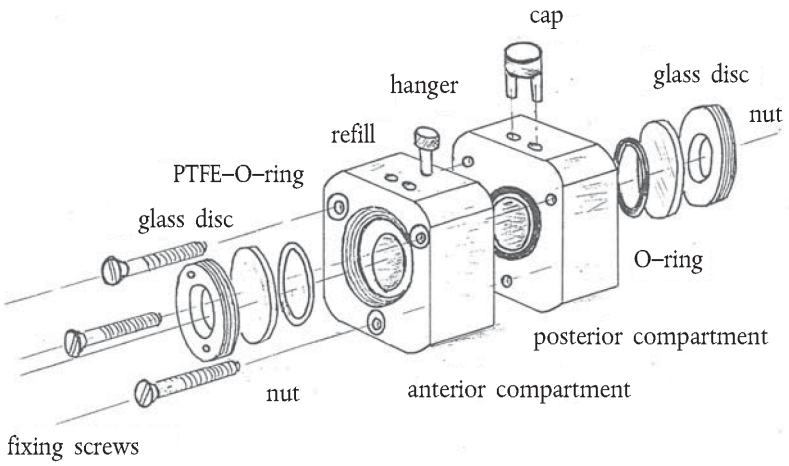
(3) På grundval av resultat i BCOP och ICE.

▼M2

Tillägg 3

HORNHINNEHÅLLARE FÖR BCOP-TESTMETODEN

1. Hornhinnehållare för BCOP är gjorda av ett inert material (t.ex. polypropen). De består av två halvor (en främre och en bakre kammare) och har två likadana cylindriska inre kammare. Varje kammare rymmer 5 ml och har ett glasfönster genom vilket opacitetsmätningarna görs. De inre kamrarna mäter 1,7 cm i diameter och 2,2 cm i djup ([1]). Den bakre kammaren har en o-ring för att förhindra läckor. Hornhinnorna placeras med endotelsidan nedåt på den bakre kammarens o-ring och den främre kammaren placeras på hornhinnornas epitelsida. Kamrarna hålls på plats med hjälp av tre rostfria skruvar på kammarens ytterkanter. Varje kammare har ett glasfönster som kan tas bort för att enkelt nå hornhinnan. Det finns också en o-ring mellan glasfönstret och kammaren för att förhindra läckor. Upptill på varje kammare finns två hål för att tillsätta och ta bort medium och testämne. Hålen försluts med gummiproppar under behandlings- och inkubationsperioderna.



Ordlista

Glass disc: Glasskiva

PTFE-O-ring: O-ring av PTFE

Refill: Påfyllning

Hanger: Hängare

Cap: Propp

Nut: Låsring

O-ring: O-ring

Posterior compartment: Bakre kammare

Anterior compartment: Främre kammare

Fixing screws: Fästskruvar

([1]) De här måtten utgår från hållare för hornhinnor från nötkreatur som är 12–60 månader gamla. För hornhinnor från djur som är 6–12 månader ska hållarna utformas så att varje kammare rymmer en volym på 4 ml och innerkamrarnas diameter är 1,5 cm och djup 2,2 cm. Vid utformningen av anpassade hornhinnehållare är det mycket viktigt att förhållandet mellan exponerad hornhinneyta och bakre kammarens volym är samma som motsvarande förhållande i en traditionell hornhinnehållare. Detta är nödvändigt för att säkerställa att permeabilitetsvärdena fastställs korrekt för beräkningen av IVIS med hjälp av den angivna formeln.

▼**M2**

OPACITETSMÄTAREN

2. Opacitetsmätaren används för mätning av ljustransmission. Ljus från en halogenlampa sänds genom kontrollkammaren (en tom kammare utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display. Opacitetsenheterna fastställs.

3. Opacitetsmätaren bör ge en linjär respons genom ett område av opacitetsmätningar som omfattar de brytpunkter som används för de olika klassifikationerna som beskrivs i prognosmodellen (dvs. upp till brytpunkten för frätande verkan/kraftig irritation). För att säkerställa linjära och exakta avläsningar upp till 75–80 opacitetsenheter är det nödvändigt att kalibrera opacitetsmätaren med en serie kalibratorer. Kalibratorerna (opaka polyesterark) placeras i kalibreringskammaren (en hornhinnekammare utformad för kalibratorer) och avläsning görs på opacitetsmätaren. Kalibratorerna placeras i kalibreringskammaren med mer eller mindre det avstånd mellan ljus och fotocell som motsvarar hornhinnans placering vid opacitetsmätningarna. Opacitetsmätaren kalibreras först till 0 opacitetsenheter genom att göra en avläsning utan kalibrator. Därefter placeras tre olika kalibratorer en i sänder i kalibreringskammaren och avläsning görs av opacitetsvärdena. Kalibratorerna 1, 2 och 3 bör ge opacitetsavläsningar som motsvarar deras riktvärden på 75, 150 respektive 225 opacitetsenheter ± 5 %.

▼M2

B 48 TESTMETODEN ICE (ISOLATED CHICKEN EYE TEST) FÖR IDENTIFIERING AV ÄMNEN SOM ÄR FRÄTANDE OCH KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN

INLEDNING

1. ICE-testmetoden är en *in vitro*-testmetod som under vissa omständigheter och med vissa begränsningar kan användas för att klassificera ämnen och blandningar som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen (1) (2) (3). Med kraftigt irriterande för ögonen avses här sådana ämnen som framkallar okulära skador som kvarstår hos kanin under minst 21 dagar efter applicering. Även om ICE-testmetoden inte anses vara godtagbar som en fullständig ersättning för *in vivo*-ögontest på kanin, rekommenderas testmetoden som en del av en strategi för stegvis testning när det gäller rättslig klassificering och märkning inom ett visst tillämpningsområde (4) (5). De testämnen och blandningar (6) som ger positiv respons med detta test kan klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen utan ytterligare testning på kaniner. Ett ämne som ger negativt utslag behöver testas på kaniner med en stegvis testningsstrategi enligt OECD:s testriktlinjer 405 (7) (kapitel B.5 i denna bilaga).

2. Syftet är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera potentiellt frätande eller kraftigt irriterande egenskaper hos ett testämne, uppmätta som ämnets förmåga att framkalla toxiska verkningar i ett isolerat kycklingöga. De toxiska verkningarna på hornhinnan mäts genom i) kvalitativ bedömning av opacitet, ii) kvalitativ bedömning av skadan på epitel efter applicering av fluorescein på ögat (fluoresceinfärgning), iii) kvantitativ mätning av ökad tjocklek (svullnad) och iv) kvalitativ utvärdering av makroskopisk morfologisk skada på ytan. Korneal opacitet, svullnad och skadebedömning efter exponering för ett testämne utvärderas var för sig och kombineras till ett resultat som används för klassificering av ämnet med avseende på ögonirritation.

3. Ögonirriterande ämnen som framkallar skador som läker på mindre än 21 dagar och icke-irriterande ämnen har också testats med ICE-testmetoden. ICE-testmetodens exakthet och tillförlitlighet i fråga om ämnen i dessa kategorier har dock inte utvärderats formellt.

4. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Testmetoden baserar sig på ICE-testmetodsprotokollet från amerikanska ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (8) som har tagits fram efter en internationell valideringsstudie (4) (5) (9), med bidrag från Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) och TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederländerna). Protokollet grundar sig på uppgifter från offentliggjorda protokoll och från det protokoll som för närvarande används av TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. De identifierade begränsningarna för denna metod baserar sig på falska positiva värden för alkoholer och falska negativa värden för fasta och ytaktiva ämnen (se punkt 47) (4). När ämnen från dessa kemiska och fysikaliska klasser utesluts ur databasen får man en klart bättre exakthet för ICE i EU-, EPA- och GHS-klassifikationssystemen (4). Om man ser till syftet med detta test (dvs. att enbart identifiera ämnen som är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen) är falska negativa värden inte kritiska, eftersom sådana ämnen därefter testas på kaniner eller med andra tillbörligt validerade *in vitro*-test, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning och enligt principen om sammanvägd bedömning. Dessutom gav den aktuella valideringsdatabasen ingen möjlighet till en tillbörlig utvärdering av vissa kemiska klasser eller produktklasser (t.ex. blandningar). Man kan dock överväga användning av denna testmetod för alla typer av ämnen (inbegripet blandningar) och likaså kan ett positivt resultat godtas som på tecken på att ämnet är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen. Positiva resultat från test med alkoholer bör dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.

7. Alla förfaranden som omfattar ögon från kycklingar bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från människor eller djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (15).

8. Testmetoden har som begränsning att även om den beaktar vissa av de okulära effekterna som framkallas vid test av ögonirritation hos kanin och i viss utsträckning effekternas allvarlighetsgrad, beaktar den inte skador på konjunktiva eller iris. Dessutom gäller att även om reversibiliteten hos hornhinneskador i sig inte kan utvärderas vid ICE-test, har det på grundval av studier av kaninögon föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för hornhinneskada kan användas för att skilja mellan irreversibla och reversibla effekter (16). Slutligen gäller att ICE inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.

9. Det pågår arbete för att ytterligare karakterisera ICE-metodens användbarhet och begränsningar när det gäller att identifiera ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande (se också punkt 48). Användarna uppmuntras också att lämna uppgifter om arter och/eller data till valideringsorganisationer för formell utvärdering av eventuella framtida användningar av ICE-testmetoden, även när det gäller identifiering av ämnen som inte är kraftigt irriterande och inte irriterande.

10. Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i bilaga 2. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra ICE-testmetoden innan laboratoriet lämnar in ICE-testdata avsedda för lagenlig faroklassificering.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. ICE-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken kycklingögon under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion *in vitro*. Med denna testmetod utvärderas den skada som framkallats av testämnet genom bestämning av hornhinnans svullnad, opacitet och fluoresceinfärgning. De två senare parametrarna bedöms kvalitativt medan analysen av hornhinnans svullnad görs kvantitativt. Varje mätning konverteras till ett kvantitativt värde som används för att kalkylera ett övergripande irritationsindex eller för att tilldela en kvalitativ kategorisering som används för att fastställa klassificeringen av frätande verkan och kraftig irritation för ögonen *in vitro*. Ettdera resultatet kan därefter användas för att göra en prognos om testämnets potential att ge frätskador eller kraftig irritation på ögat *in vivo* (se beslutskriterierna).

▼M2

Källa och ålder för kycklingögon

12. I regel används ögon tillvaratagna från kycklingar som kommer från ett slakteri där de avlivats för användning som livsmedel, vilket eliminerar behovet av försöksdjur. Endast ögon från friska djur som anses lämpliga för livsmedelkedjan får användas.

13. Det har inte gjorts någon kontrollerad undersökning för att utvärdera optimal ålder för kycklingarna för testmetoden, men i regel används kycklingar som slaktats på vanligt sätt i ett fjäderfäslakteri (cirka 7 veckor gamla, 1,5–2,5 kg).

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

14. Kycklingarnas huvuden ska avlägsnas omedelbart efter bedövning (i regel med elchock) med snitt i halsen för blödning. Kycklinghuvudena bör komma från en lokal källa nära laboratoriet så att de tillräckligt snabbt kan transporteras från slakteriet till laboratoriet för att minimera risken för skador och/eller bakterieförorening. Tidsintervallet mellan tillvaratagandet av kycklinghuvudena och användningen av ögonen för ICE-test ska minimeras (i regel högst två timmar) och det bör påvisas att transporttiden inte stör testresultaten. Dessa baserar sig på urvalskriterierna för ögonen såväl som på positiv och negativ kontrollrespons. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits på en viss dag.

15. Ögonen avlägsnas i laboratoriet, och de orörda kycklinghuvudena ska därför transporteras från slakteriet vid rumstemperatur i plastlådor som fuktas med handdukar indränkta i fysiologisk saltlösning.

Urvalskriterier för ögon som används för ICE-test

16. Ögon med högt grundvärde för fluoresceinfärgning (> 0,5) eller korneal opacitet (> 0,5) efter tillvaratagandet ska förkastas.

17. Varje behandlingsgrupp med parallell positiv kontroll består av minst tre ögon. Den negativa kontrollgruppen eller lösningsmedelskontrollen (om annat lösningsmedel än saltlösning används) ska bestå av minst ett öga.

FÖRFARANDE

Förberedning av ögonen

18. Ögonlocken skärs bort försiktigt med undvikande av skador på hornhinnan. Hornhinnans intakta skick kan utvärderas snabbt med en droppe 2 % natriumfluorescein (vikt/volym) som appliceras på hornhinnans yta för några sekunder och därefter sköljs bort med fysiologisk saltlösning. De fluoresceinbehandlade ögonen undersöks därefter med spaltlampa för att kontrollera att hornhinnan är intakt (värdet för fluoresceinfärgning och korneal opacitet ≤ 0,5).

19. Förutsatt att hornhinnan är intakt skärs ögat ut från skallen med varsamhet så att hornhinnan inte skadas. Ögongloben dras ut ur ögonhålan med ett stadigt grepp om blinkhinnan med hjälp av kirurgisk tång och ögonmusklerna klipps av med en böjd trubbig sax. Det är viktigt att greppet om hornhinnan inte är så starkt att det uppstår skador (t.ex. kompressionsartefakter).

20. När ögat har tagits ut ur hålan bör det finnas kvar en vidfäst synlig del av synnerven. Därefter placeras ögat på ett absorberande underlag och blinkhinnan och annan bindvävnad skärs bort.

▼M2

21. Därefter monteras ögat i en klämma av rostfritt stål med hornhinnan i upprätt riktning. Klämman med ögat överförs till superfusionsapparaten (16). Klämmorna ska placeras i superfusionsapparaten så att droppet med fysiologisk saltlösning når hela hornhinnan. Superfusionsapparatens kammare ska ha en kontrollerad temperatur på 32 ± 1,5 °C. I tillägg 3 finns en schematisk bild av en typisk superfusionsapparat med ögonklämmor. Utrustningen kan anskaffas kommersiellt eller konstrueras i laboratoriet. Apparaten kan också anpassas efter behoven vid ett enskilt laboratorium (t.ex. för att hålla ett avvikande antal ögon).

22. Efter att ögonen placerats i superfusionsapparaten granskas de på nytt med spaltlampa för att kontrollera att de inte har fått skador under dissektionen. Samtidigt ska även hornhinnans tjocklek mätas vid hornhinnans apex med hjälp av spaltlampans tillbehör för djupmätning. Ögon som har i) fluoresceinfärgningsvärde > 0,5, ii) värde för korneal opacitet > 0,5 eller iii) andra tecken på skada ska bytas ut. Ögon som inte har förkastats enligt något av dessa kriterier men där hornhinnans tjocklek avviker mer än 10 % från medelvärdet för alla ögon ska förkastas. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika värden på hornhinnans tjocklek beroende på inställningen för spaltbredd. Spaltbredden ska ställas in på 0,095 mm.

23. Undersökta och godkända ögon inkuberas i cirka 45–60 minuter för att få dem i jämvikt med testsystemet före doseringen. Efter jämviktsperioden görs en referensmätning av hornhinnans tjocklek och opacitet för att få ett grundvärde (tid = 0). Fluoresceinvärdet som uppmättes vid dissektionen används som grundvärde för det resultatmåttet.

Applicering av testämnet

24. Omedelbart efter mätningarna av nollreferens tas ögonen (i sina hållare) bort ur superfusionsapparaten, placeras i liggande läge och testämnet appliceras på hornhinnan.

25. Vätskeformiga testämnen används i regel i outspädd form men kan spädas ut om det bedöms vara nödvändigt (t.ex. som en del av försöksutformningen). Eventuell utspädning ska helst göras med fysiologisk saltlösning. Andra lösningsmedel än fysiologisk saltlösning kan användas under kontrollerade förhållanden men då bör lämpligheten påvisas.

26. Vätskeformiga testämnen appliceras på hornhinnan så att hela ytan är jämnt täckt med testämnet (standardvolymen är 0,03 ml).

27. Fasta ämnen ska så långt det är möjligt finfördelas i mortel eller motsvarande redskap. Pulvret appliceras så att hornhinnan blir jämnt täckt med testämnet (standardmängden är 0,03 g).

28. Testämnet (vätska eller fast ämne) får verka på hornhinnan i 10 sekunder och sköljs sedan bort från ögat med rumstempererad fysiologisk saltlösning (cirka 20 ml). Ögat (i sin hållare) återförs därefter till superfusionsapparaten i ursprunglig upprätt position.

Kontrollämnen

29. Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ska ingå i varje försök.

▼M2

30. Vid testning av outspädda vätskor eller fasta ämnen med ICE-testmetoden ska fysiologisk saltlösning användas som parallell negativ kontroll för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.

31. Vid testning av utspädda vätskor ska en parallell negativ kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel inbegripas för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation. Som det konstateras i punkt 25 får endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet användas.

32. Ett känt ögonirriterande ämne ska ingå som parallell positiv kontroll i varje försök för att bekräfta att rätt slags respons framkallas. Eftersom ICE används i denna testmetod för att identifiera frätande eller kraftigt irriterande ämnen, ska den positiva kontrollen göras med ett referensämne som framkallar kraftig respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer över tiden kan bedömas, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark. Tillräckliga *in vitro*-data bör genereras för den positiva kontrollen så att det går att beräkna ett godtagbart intervall för denna. Om det inte finns tillbörliga historiska ICE-testmetodsdata för en särskild positiv kontroll måste man eventuellt genomföra försök för att få fram denna information.

33. Exempel på positiva kontroller för vätskeformiga testämnen är 10 % ättiksyra eller 5 % bensalkoniumklorid, och exempel på positiva kontroller för fasta testämnen är natriumhydroxid eller imidazol.

34. Referensämnen kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av resultatmått

35. Hornhinnorna utvärderas före behandlingen och vid 30, 75, 120, 180 och 240 minuter (± 5 minuter) efter den sköljning som görs efter behandlingen. Dessa tidpunkter ger ett tillbörligt antal mätningar under den fyra timmar långa behandlingsperioden och ger tillräckligt med tid mellan mätningarna för att genomföra observationerna av alla ögon.

36. De resultatmått som ska bedömas är korneal opacitet, svullnad, fluoresceinfärgning och morfologiska effekter (t.ex. gropbildning eller avlossning av epitel). Alla resultatmått, med undantag av fluoresceinfärgning (som endast bestäms före behandlingen och 30 minuter efter exponering av testämnet) bestäms vid alla de ovan nämnda tidpunkterna.

37. Fotografier rekommenderas för dokumentering av korneal opacitet, fluoresceinfärgning, morfologiska verkningar och, i förekommande fall, histopatologi.

38. Efter den sista granskningen vid tidpunkten fyra timmar är det rekommendabelt att hålla ögonen i lämpligt konserveringsmedel (t.ex. neutralt formalin med buffert) med tanke på eventuell histopatologisk undersökning.

▼M2

39. Hornhinnans svullnad bestäms genom mätningar av hornhinnans tjocklek med en pachymeter eller spaltlampa. Svullnaden yttrycks som ett procenttal och beräknas på grundval av mätningarna enligt följande formel:

$$\left(\frac{\textit{hornhinnans tjocklek vid tidpunkt } t \; - \; \textit{hornhinnans tjocklek vid tidpunkt } 0}{\textit{hjornhinnans tjocklek vid tidpunkt } \; = \; 0} \right) \times 100$$

40. Medelvärdet för hornhinnans svullnad för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för svullnad oavsett observationstidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testämnet.

41. Den korneala opaciteten beräknas på grundval av mätningarna på det område av hornhinnan som har den tätaste opaciteten. Medelvärdet för den korneala opaciteten för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för korneal opacitet oberoende av tidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testämnet (tabell 1).

Tabell 1

Värden för korneal opacitet

Värde	Observation
0	Ingen opacitet
0,5	Mycket svag opacitet
1	Spridda eller diffusa områden med opacitet, alla detaljer i iris är klart synliga
2	Enkelt skönjbart translucent område, detaljerna i iris är lätt förmörkade
3	Kraftig opacitet, inga detaljer i iris är synliga, pupillens storlek kan knappat urskiljas
4	Fullständig korneal opacitet, iris syns inte

42. Medelvärdet för fluoresceinfärgning för alla testögon beräknas endast för observationstidpunkten 30 minuter och används för övergripande kategorivärde som ges för varje testämne (tabell 2).

Tabell 2

Värden för fluoresceinfärgning

Värde	Observation
0	Ingen fluoresceinfärgning
0,5	Mycket svag färgning av enskilda celler
1	Färgning av enskilda celler spridda över hornhinnans behandlade yta
2	Fokal eller konfluerande tät färgning av enskilda celler
3	Konfluenta stora områden av hornhinnan har färgats av fluorescein

▼M2

43. Till de morfologiska effekterna hör gropbildning i hornhinnans epitel, avlossning av epitel, uppruggning av hornhinnans yta och vidfästning av testämnet vid hornhinnan. Dessa observationer kan ha olika allvarlighetsgrad och kan förekomma samtidigt. Klassificeringen av observationerna är subjektiva och beror på personlig tolkning.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

44. Resultaten för korneal opacitet, svullnad och fluoresceinfärgning bör utvärderas separat för att ge en ICE-klass för varje resultatmått. ICE-klasserna för varje resultatmått kombineras därefter, så att man får en klassificering av varje testämne med avseende på irritationsframkallande egenskaper.

Beslutskriterier

45. Efter att varje resultatmått har utvärderats kan ICE-klasser tilldelas i enlighet med en på förhand fastställd skala. Tolkningen av hornhinnans tjocklek (tabell 3), opacitet (tabell 4) och fluoresceinfärgning (tabell 5) med användning av fyra ICE-klasser görs enligt följande:

Tabell 3

ICE-klassificeringskriterier för hornhinnans tjocklek

Medelvärde för svullnad (%) (*)	ICE-klass
0 till 5	I
> 5 till 12	II
> 12 till 18 (> 75 min. efter behandling)	II
> 12 till 18 (≤ 75 min. efter behandling)	III
> 18 till 26	III
> 26 till 32 (> 75 min. efter behandling)	III
> 26 till 32 (≤ 75 min. efter behandling)	IV
> 32	IV

(*) Värdena för svullnad kan bara tillämpas när tjockleken mäts med Haag-Streit BP900 spaltlampa med tillbehör nr I för mätning av djup och spaltbreddsinställningen 9½, som motsvarar 0,095 mm. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika resultat för hornhinnans tjocklek beroende på vilken spaltbredd som används.

Tabell 4

ICE-klassificeringskriterier för opacitet

Medelvärde för största opacitet (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Se tabell 1.

▼**M2**

Tabell 5

ICE-klassificeringskriterier för fluoresceinfärgning

Medelvärde för fluoresceinfärgning 30 minuter efter behandlingen (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Se tabell 2.

46. Testämnets övergripande klassificering för irritation *in vitro* bedöms genom avläsning av den klassificering för irritation som motsvarar kombinationen av kategorier för hornhinnan i fråga om svullnad, korneal opacitet och fluoresceinfärgning, och genom tillämpning av schemat i tabell 6.

Tabell 6

Övergripande klassificeringar för irritation *in vitro*

Klassificering	Kombination av de tre resultatmåtten
Frätande/Kraftigt irriterande	3 × IV
	2 × IV, 1 × III
	2 × IV, 1 × III (*)
	2 × IV, 1 × I (*)
	Korneal opacitet ≥ 3 vid 30 min. (minst två ögon)
	Korneal opacitet = 4 oavsett tidpunkt (minst två ögon)
	Kraftig avlossning av epitel (minst ett öga)

(*) Kombinationer som är mindre sannolika.

47. Som det konstateras i punkt 1 i fråga om testämnen som inte identifieras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen, bör ytterligare testning genomföras för klassificerings- och märkningsändamål. ICE-testmetoden har en övergripande exakthet på 83 % (120/144) till 87 % (134/154), falska positiva värden på 6 % (7/122) till 8 % (9/116) och falska negativa värden på 41 % (13/32) till 50 % (15/30) för identifiering av ämnen som är frätande och kraftigt irriterande för ögonen, jämfört med *in vivo*-testning på kaninögon enligt klassifikationssystemen EPA (1), EU (2) eller GHS (3). När ämnen inom en viss kemikalieklass (t.ex. alkoholer och ytaktiva ämnen) eller fysikalisk klass (t.ex. fasta ämnen) utesluts ur databasen, sträcker sig exaktheten hos ICE inom klassifikationssystemen EU, EPA, och GHS från 91 % (75/82) till 92 % (69/75), falska positiva värden från 5 % (4/73) till 6 % (4/70) och falska negativa värden från 29 % (2/7) till 33 % (3/9) (4).

48. Även om ett testämne inte klassificeras som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen kan data från ICE vara användbara i kombination med testdata från *in vivo*-test på kaninögon eller *in vitro*-test, för vidare utvärdering av användbarheten och begränsningarna för ICE-testmetoden när det gäller att identifiera ämnen som inte framkallar kraftig irritation eller som inte alls framkallar irritation (en vägledning om användning av *in vitro*-test för ögontoxicitet håller på att utarbetas).

▼M2

Kriterier för godkännande av ett försök

49. Ett försök anses vara godtagbart om de parallella negativa kontrollerna eller vehikel-/lösningsmedelkontrollerna och de parallella positiva kontrollerna ger irritationsklassificeringar som faller inom klasserna icke-irriterande respektive kraftigt irriterande/frätande.

Testrapport

50. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Test- och kontrollämnen

Kemiskt namn (kemiska namn) såsom det strukturella namn som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända namn.

CAS-registernummer (RN), om det är känt.

Ämnets eller blandningens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.

Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.

Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

Stabilitet, om den är känd.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

Angivelse av ögonkällan (anläggning där ögonen togs till vara).

Förvarings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tid för tillvaratagande, tidsintervall före försöksstart).

Om möjligt specifika egenskaper för de djur från vilka ögonen togs till vara (t.ex. ålder, kön, vikt).

Motivering för den testmetod och det protokoll som använts

Testmetodens integritet

Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. exakthet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning med kvalifikationsämnen, användning av historiska data från negativa och positiva kontroller).

Kriterier för godtagbart försök

Om tillämpligt, godtagbara intervaller för parallella referenskontroller på grundval av historiska data.

Försöksförhållanden

Beskrivning av testsystemet.

Spaltlampa som använts (t.ex. modell).

Spaltlampans inställningar.

Uppgifter om de kycklingögon som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet.

▼**M2**

Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

Testämneskoncentration(er).

Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Hänvisningar till modellens historiska data (t.ex. negativa och positiva kontroller, kvalifikationsämnen, referensämnen).

Beskrivning av utvärderingskriterierna.

Resultat

Beskrivning av övriga observerade effekter.

Fotografier av ögat, om det är lämpligt.

Diskussion av resultaten

Slutsatser

LITTERATUR

(1) U.S. EPA (1996), Label Review Manual, andra utgåvan, EPA737-B-96-001, Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006, EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.

(3) Förenta nationerna (FN) (2007), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), andra reviderade upplagan, FN New York och Genève, 2007, finns på

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html

(4) ICCVAM (2007), Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(5) ESAC (2007), Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants, finns på

http://ecvam.jrc.it/index.htm

(6) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG, EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002), Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion, finns på

[http://www.oecd.org/document/40/0, 2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007), ICCVAM:s rekommenderade testprotokoll för ICE-testmetoden, ingår i ”ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives”, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH:s publikation nr: 07-4517, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(9) ICCVAM (2006), Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method, NIH:s publikation nr: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) M. K. Prinsen och B. W. M. Koëter, (1993), ”Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits”, *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994), Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET), finns på

http://ecvam.jrc.it/index.htm

(12) M. Balls, P. A Botham, L. H. Bruner och H. Spielmann, (1995), ”The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test”, *Toxicol. In Vitro* 9:871–929.

(13) M. K. Prinsen, (1996), ”The chicken enucleated eye test (CEET), A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials”, *Food Chem. Toxicol*. 34:291–296.

(14) M. Chamberlain, S. C. Gad, P. Gautheron och M. K. Prinsen, (1997), ”IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/ prediction of ocular irritation”, *Food Chem. Toxicol*. 35:23–37.

(15) J. D. Siegel, E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello och Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, finns på

http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf

(16) J. K. Maurer, R. D. Parker och J. V. Jester (2002), ”Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays”, *Reg. Tox. Pharmacol*, 36:106–117.

(17) A. B. G. Burton, M. York och R. S. Lawrence (1981), ”The *in vitro* assessment of severe irritants”, *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 471–480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006), Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method, finns på

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006), Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method, finns på

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

▼M2

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod.

Referensämne: ett ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikaliska/kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

Korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för ett testämne. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan.

Svullnad av hornhinnan: en objektiv mätning vid ICE-försök av hur mycket hornhinnan sväller efter exponering för ett testämne. Den uttrycks som ett procenttal och beräknas utifrån ett grundvärde som fås vid mätning av hornhinnans tjocklek före exponering och den tjocklek som uppmäts med regelbundna intervaller efter exponering för testämnet. Graden av svullnad är en indikation på skadan på hornhinnan.

EPA-kategori 1: frätande (irreversibel skada på okulär vävnad) eller kornealpåverkan eller irritation som varar mer än 21 dagar (1).

EU-kategori R41: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativa. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Fluoresceinfärgning: en subjektiv mätning vid ICE-försök av den mängd natriumfluorescein som hornhinnans epitelceller håller kvar efter exponering för ett testämne. Mängden fluorescein som hålls kvar är en indikation på skada på hornhinnan.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (3).

▼M2

GHS-kategori 1: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett testämne på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (3).

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testämnesbehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Icke-irriterande: ett ämne som inte klassificeras som ögonirriterande ämnen enligt EPA-kategori I, II, eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B (1) (2) (3).

Frätande för ögonen: a) ett ämne som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) ett ämne som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

Irriterande för ögonen: a) ett ämne som orsakar en reversibel ändring på ögat efter applicering på ögats främre yta, b) ett ämne som klassificeras som irriterande för ögonen enligt EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

Kraftigt irriterande för ögonen: a) ett ämne som efter applicering på ögats främre yta orsakar vävnadsskada på ögat som inte är reversibel inom 21 dagar efter appliceringen eller som orsakar kraftig synnedsättning, b) ett ämne som klassificeras som irriterande för ögonen enligt GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Spaltlampa: ett instrument som används för direkt undersökning av ögat under förstoring genom ett binokulärt mikroskop och som visar en stereoskopisk, topografisk bild. Vid ICE-försök används instrumentet för att granska kycklingögats främre struktur och för objektiv mätning av hornhinnans tjocklek med tillbehöret för mätning av djup.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testämnesbehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testämnet upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

▼M2

Stegvis testning: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om ett testämne granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (*weight of evidence*) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testämnets förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testämnets förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål

Sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande ett ämnes faropotential.

▼M2

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR ICE-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av en testmetod enligt denna testvägledning kan laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av frätande verkan på ögonen för de tio ämnen som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för lokal ögonirritation/frätande verkan enligt resultaten från *in vivo*-test på kaninögon (TG 405) (dvs. kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering och märkning enligt FN GHS (3) (7). Med beaktande av det validerade ändamålet för dessa testningar (endast för identifiering av ämnen som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen) finns det dock bara två testutslag för klassificeringsändamål (frätande/kraftigt irriterande eller icke-frätande/icke kraftigt irriterande för ögonen) när det gäller att demonstrera kvalitet. Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till *in vivo*-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från de två *in vitro*-metoder för vilka testriktlinjer håller på att utarbetas. Därför valdes irriterande ämnen från ICCVAM:s förteckning med 122 rekommenderade referensämnen för validering av *in vitro*-testmetoder för okulär toxicitet (se tillägg H till ICCVAM:s förteckning med rekommenderade referensämnen (4). Referensdata finns i *ICCVAM Background Review Documents* för testmetoderna BCOP och ICE (18) (19).

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet med ICE-testmetoden

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ([1])	Fysikalisk form	*In vivo*-klassificering ([2])	*In vitro*-klassificering ([3])
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
2,6-Diklorbensoylklorid	4659-45-4	Acylhalid	Vätska	Kategori 2A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2B	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande

▼**M2**

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ([1])	Fysikalisk form	*In vivo*-klassificering ([2])	*In vitro*-klassificering ([3])
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen märkning	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
n-hexan	110-54-3	Kolväte (acykliskt)	Vätska	Ingen märkning	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

([1]) De kemiska klasserna tilldelades vart och ett testämne med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) På grundval av *in vivo*-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av FN GHS (3) (7).

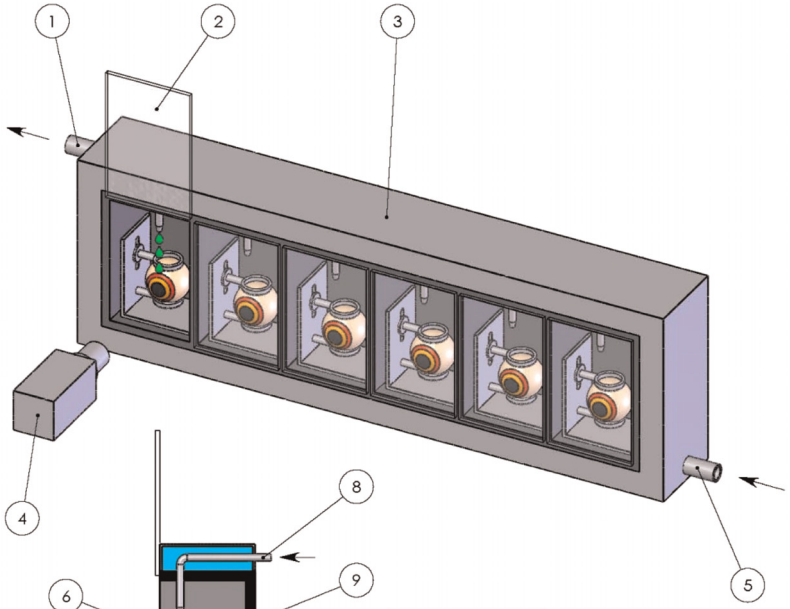
([3]) På grundval av resultat i BCOP och ICE.

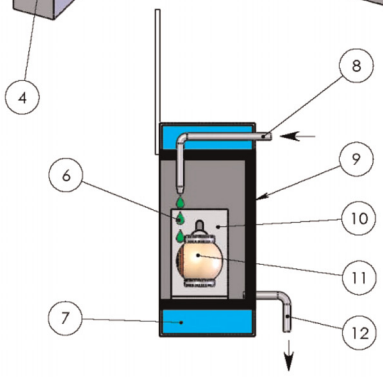
▼**M2**

Tillägg 3

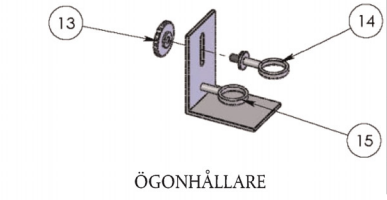
Superfusionsapparat och ögonklämmor för ICE-testmetoden

(Se Burton m.fl. (17) för ytterligare allmänna beskrivningar av superfusionsapparat och ögonklämma)





TVÄRSNITT KAMMARE



ÖGONHÅLLARE

DEL NR	BESKRIVNING
1	UTLOPP FÖR VARMVATTEN
2	GLIDDÖRR
3	SUPERFUSIONSAPPARAT
4	OPTISKT MÄTINSTRUMENT
5	INLOPP FÖR VARMT VATTEN
6	SALTLÖSNING
7	VARMVATTEN
8	INLOPP FÖR SALTLÖSNING
9	KAMMARE
10	ÖGONHÅLLARE
11	KYCKLINGÖGA
12	UTLOPP FÖR SALTLÖSNING
13	FÄSTSKRUV
14	JUSTERBART ÖVRE FÄSTE
15	FAST UNDRE FÄSTE

▼M3

B.49. MIKRONUKLEUSTEST AV DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*

INLEDNING

1. Mikronukleustest *in vitro* (MNvit) är ett genotoxicitetstest för att upptäcka mikrokärnor i cytoplasmat i interfasceller. Mikrokärnor kan härröra från acentriska kromosomfragment (dvs. en centromer saknas) eller från hela kromosomer som inte kan migrera till polerna under det anafasa steget av celldelningen. Genom testet upptäcks aktiviteten hos klastogena och aneugena kemikalier (ämnen och blandningar) (1) (2) i celler som har genomgått celldelning under eller efter exponering för testämnet. Denna testmetod ger möjlighet att använda protokoll med och utan aktinpolymeriseringsinhibitorn cytokalasin B (cytoB). Tillsättning av cytoB före mitosen gör det möjligt att identifiera och selektivt analysera frekvensen mikrokärnor i celler som har slutfört en mitos eftersom sådana celler är binukleära (3) (4). Denna testmetod gör det också möjligt att använda protokoll utan blockering av cytokines, förutsatt att det finns belägg för att den analyserade cellpopulationen har genomgått mitos.

2. Utöver MNvit-metoden för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inducerar mikrokärnor kan man även använda blockering av cytokines, immunokemisk märkning av kinetochorer eller hybridisering med centromeriska/telomeriska prober (FISH-teknik, Fluorescens *In Situ* Hybridisation) för att få information om mekanismerna för kromosomskador och bildningen av mikrokärnor (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Märknings- och hybridiseringsteknik kan användas när det förekommer ökad bildning av mikrokärnor och man vill slå fast om ökningen är resultatet av klastogena och/eller aneugena händelser.

3. Mikrokärnorna representerar skador som har förmedlats till dotterceller, medan kromosomavvikelser som detekteras i metafasceller inte alltid förmedlas. Eftersom mikrokärnor i interfasceller kan bedömas relativt objektivt, behöver laboratoriepersonalen endast bestämma huruvida cellerna har genomgått delning eller inte och hur många celler som innehåller mikrokärna. Därför kan detekteringen göras relativt snabbt och analysen kan automatiseras. Då kan man detektera tusentals i stället för hundratals celler per behandling, vilket ökar försökets tyngd. Eftersom mikrokärnor kan uppstå från isolerade kromosomer finns det också möjlighet att detektera aneuploidiframkallande ämnen som är svåra att undersöka genom konventionella kromosomavvikelsetest, t.ex. OECD:s testriktlinje 473 (kapitel B.10 i denna bilaga) (17). MNvit-metoden ger dock inte möjlighet att utan särskilda tekniker såsom FISH enligt beskrivningen i punkt 2 skilja mellan kemikalier som inducerar polyploidi från sådana kemikalier som inducerar klastogenicitet.

4. MNvit-metoden är en *in vitro*-metod där man i regel använder odlade celler från människa eller gnagare. Metoden ger tillgång till en omfattande bas för undersökning av kromosomskadepotentialen *in vitro* eftersom både aneugener och klastogener kan upptäckas.

5. MNvit-metoden är robust och effektiv för ett flertal celltyper, med eller utan tillsats av cytoB. Det finns omfattande data som stöd för att MNvit-metoden är giltig för ett flertal gnagarcellinjer (CHO, V79, CHL/IU och L5178Y) och lymfocyter från människa (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Dessa data kommer bland annat från internationella valideringsstudier samordnade av Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) och rapporter från International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Tillgängliga data har också omvaliderats i en retrospektiv sammanvägd (weight-of-evidence)

▼M3

valideringsstudie vid Europiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), och testmetoden har erkänts som vetenskapligt giltig av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC) (32) (33) (34). Man har beskrivit användningen av TK6 lymfoblastoidceller från människa (35), HepG2-celler (36) (37) och embryoceller från syrisk hamster (38), även om de inte har använts i valideringsstudier.

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. För testning *in vitro* krävs i regel ett exogent system för metabolisk aktivering, om cellerna inte är metaboliskt kompetenta i fråga om de ämnen som testas. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena *in vivo*. Man bör också se till att undvika sådana förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat som inte återspeglar den verkliga mutageniciteten och kan ha sin orsak i faktorer såsom markerade ändringar av pH eller osmolalitet eller hög cytotoxicitet (39) (40) (41). Om testkemikalien orsakar ändring av pH i mediet vid tillsättningstidpunkten bör pH justeras, företrädesvis genom buffring av stamlösningen så att alla volymer hålls lika stora vid alla testkoncentrationer och för alla kontroller.

8. För analysen av induktion av mikrokärnor är det av central betydelse att mitos har inträffat i både de behandlade och obehandlade odlingarna. Det mest informativa stadiet för detektering av mikrokärnor är när cellerna har slutfört en mitos under eller efter behandling med testämnet.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

9. Cellodlingar från människa eller däggdjur exponeras för testämnet både med och utan exogent metaboliskt aktiveringssystem, utom om de celler som används har tillräcklig metaboliserande kapacitet. Parallella kontroller med lösningsmedel/vehikel och positiva kontrollkemikalier ska ingå i alla test.

10. Under eller efter exponering för testämnet odlas cellerna tillräckligt länge för att kromosomskador eller spindelfiberskador ska leda till att mikrokärnor bildas i interfascellerna. För induktion av aneuploidi bör testämnet i regel finnas närvarande under mitosen. Interfascellerna skördas och färgas in och närvaron av mikrokärnor analyseras. Idealiskt sett bör man för detekteringen av mikrokärnor endast använda celler som har slutfört mitosen under exponeringen för testämnet eller under perioden efter exponeringen, om en sådan används. I odlingar som har behandlats med en cytokinesinhibitor uppnås detta genom att endast analysera binukleära celler. Om blockering av cytokines inte används är det viktigt att påvisa att de analyserade cellerna sannolikt har genomgått celldelning under eller efter exponeringen för testämnet. Oavsett protokoll är det viktigt att påvisa att cellproliferation har skett både i kontrollodlingarna och de behandlade odlingarna, och omfattningen av testämnesinducerad cytotoxicitet eller cytostas ska bedömas i de odlingar (eller parallella odlingar) som är föremål för analys av mikrokärnor.

▼M3

TESTBESKRIVNING

Förberedelser

11. Man kan använda odlade primära perifera blodlymfocyter från människa (5) (19) (42) (43) och celler från ett antal gnagarcellinjer såsom CHO, V79, CHL/IU och L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Användning av andra cellinjer och celltyper bör motiveras på grundval av deras påvisade prestanda med denna metod, enligt det som anges i avsnittet om kriterier för godkännande. Eftersom bakgrundsförekomsten av mikrokärnor påverkar försökets känslighet, rekommenderas att man använder celltyper med en låg stabil bakgrundsförekomst av mikrokärnbildning.

12. De humana perifera blodlymfocyterna ska tas från unga (cirka 18–35 år) rökfria individer utan tidigare känd exponering för genotoxiska kemikalier eller strålning. Om celler från fler än en givare poolas för användning bör antalet givare anges. Förekomsten av mikrokärnor ökar med åldern och denna trend är mera markerad hos kvinnor än hos män (44), vilket bör beaktas när man väljer celler för poolning.

Medier och odlingsbetingelser

13. Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, CO_2-halt, temperatur och luftfuktighet) bör väljas för odlingarna. Etablerade cellinjer och stammar bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma, och får inte användas om kontamination har skett eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Den normala cellcykeltiden vid de odlingsbetingelser som används i laboratoriet bör vara känd. Om blockering av cytokines används bör koncentrationen av cytokinesinhibitor vara optimerad för den berörda celltypen och bör även ha påvisats kunna ge en god skörd av binukleära celler för analys.

Beredning av odlingarna

14. Etablerade cellinjer och stammar: celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium vars densitet är sådan att det inte sker sammanväxning i enkelskiktsodlingar och att suspensionsodlingar inte når för hög densitet före skörden, och inkuberas vid 37 °C.

15. Lymfocyter: helblod behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin) eller separerade lymfocyter odlas i ett medium som innehåller en mitogen (t.ex. fytohemaglutinin) före exponering för testämnet och cytoB.

Metabolisk aktivering

16. Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet är en kofaktorstödd post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare som behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (45) (46) eller en kombination av fenobarbiton och β-naftoflavon (46) (47) (48) (49). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmkonventionen om långlivade organiska föroreningar (50) eller förordning (EG) nr 850/2004 om långlivade organiska föroreningar (66) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera monooxygenaser (”mixed-function oxidases”) (46) (47) (48) (49). S9-fraktionen används typiskt i koncentrationer mellan 1–10 % (volym/volym) i det slutliga testmediet. Förhållandena i ett system för metabolisk aktivering kan bero på vilken klass av kemikalie som testas och i vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en S9-koncentration.

▼M3

17. Genetiskt framställda cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer för människa eller gnagare kan eliminera behovet av ett exogent system för metabolisk aktivering och kan användas som testceller. I sådana fall bör valet av cellinjer underbyggas vetenskapligt, t.ex. genom monooxygenasernas relevans för testämnets metabolism (51) och deras respons på kända klastogener och aneugener (se avsnittet om kriterier för godkännande). Här bör konstateras att de ämnen som testas kanske inte metaboliseras av monooxygenaser, och i sådana fall indikerar negativa resultat inte att testämnet inte kan inducera mikrokärnor.

Beredning av testämnet

18. Fasta kemikalier bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas. Flytande kemikalier kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut före behandlingen. Gaser eller flyktiga kemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna kärl (52) (53). Testämnesberedningarna bör vara färska, utom om stabilitetsdata visar att lagring kan godkännas.

Försöksbetingelser

Lösningsmedel/vehiklar

19. Lösningsmedlet/vehikeln får inte reagera med testämnet, leda till att cellerna inte överlever eller att S9-aktiviteten inte kan upprätthållas vid den använda koncentrationen. Om andra än väletablerade lösningsmedel/vehiklar (t.ex. vatten, cellodlingsmedier, dimetylsulfoxid) används bör detta motiveras med data om deras förenlighet med testämnet och avsaknad av genetisk toxicitet. Det rekommenderas att man alltid när det är möjligt överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar som första alternativ.

Användning av cytoB som cytokinesinhibitor

20. En av de viktigaste faktorerna när det gäller MNvit-metodens resultat är att se till att de celler som analyseras har slutfört mitosen under behandlingen eller under eventuell inkubationsperiod efter behandlingen. CytoB är det ämne som oftast används för blockering av cytokines eftersom det hindrar aktinbildning och således hindrar separationen av dotterceller efter mitosen så att binukleära celler kan bildas (5) (54) (55). Analysen av mikrokärnor kan då begränsas till celler som har genomgått mitos under eller efter behandlingen. Samtidigt kan man mäta testämnets effekt på cellproliferationskinetiken. CytoB ska användas som cytokinesinhibitor när humana lymfocyter används eftersom cellcykeltiderna varierar mellan odlingar och mellan givare och eftersom inte alla lymfocyter ger respons på fytohemaglutinin. Även andra metoder har använts vid testning av cellinjer för att bestämma om de celler som analyseras har delat sig; dessa metoder behandlas nedan (se punkt 26).

21. Laboratoriet bör fastställa lämplig koncentration av cytoB för varje celltyp i syfte att nå optimal förekomst av binukleära celler i kontrollodlingarna för lösningsmedel/vehikel. Lämplig cytoB-koncentration är i regel 3–6 μg/ml.

▼M3

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

22. Vid bestämning av den högsta testämneskoncentrationen ska man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. för kraftig cytotoxicitet, utfällning i odlingsmediet och markerade ändringar av pH eller osmolalitet (39) (40) (41).

23. Cellproliferationen bör mätas för att se till att de behandlade cellerna har genomgått mitos under försöket och att behandlingarna görs på lämpliga nivåer av cytotoxicitet (se punkt 29). Om cytoB inte används ska cytotoxiciteten bestämmas med och utan metabolisk aktivering i celler som kräver metabolisk aktivering, med användning av den relativa ökningen av antalet celler eller relativ populationsfördubbling (se tillägg 2 för formler). När cytoB används kan cytotoxiciteten bestämmas med användning av replikeringsindex (se tillägg 2 för formel).

24. Behandling av odlingarna med cytoB och mätning av de relativa förekomsterna av mononukleära, binukleära och multinukleära celler i odlingen är en exakt metod för kvantifiering av effekten på cellproliferationen och behandlingens cytotoxiska eller cytostatiska aktivitet (5) och säkerställer att endast celler som har delat sig under eller efter behandlingen analyseras.

25. I försök där cytoB används kan cytostas/cytotoxicitet kvantifieras genom att bestämma proliferationsindex vid cytokinesinhibering (Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI) (5) (26) (56) eller härledas från replikeringsindex (RI) från minst 500 celler per odling (se tillägg 2 för formler). När cytoB används för att bedöma cellproliferation bör CBPI eller RI bestämmas på grundval av minst 500 celler per odling. Dessa åtgärder och andra kan användas för att uppskatta cytotoxiciteten genom jämförelse av värden för behandlade odlingar och kontrollodlingar. Bedömning av andra markörer för cytotoxicitet (t.ex. sammanväxning, cellantal, apoptos, nekros, antalet metafaser) kan ge värdefull information.

26. I studier utan cytoB är det nödvändigt att påvisa att de celler i odlingen som analyseras har genomgått delning under eller efter behandling med testämnet. Annars kan man få falsk negativ respons. Till de metoder som har använts för att se till att cellerna som analyseras har delat sig hör tillsättning och därpå följande detektering av bromodeoxiuridin (BrdU) för att identifiera celler som har delat sig (57), bildning av kloner när celler från permanenta cellinjer behandlas och analyseras *in situ* på ett objektglas (proliferationsindex (PI)) (25) (26) (27) (28) eller mätning av relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) eller andra prövade metoder (16) (56) (58) (59) (se tillägg 2 för formler). Bedömning av andra markörer för cytotoxicitet eller cytostas (t.ex. sammanväxning, celltal, apoptos, nekros, antal metafaser) kan ge värdefull information.

27. Minst tre analyserbara testkoncentrationer bör utvärderas. För att uppnå detta kan det vara nödvändigt att genomföra försöket med ett större antal nära varandra liggande koncentrationer och analysera bildningen av mikrokärnor i de koncentrationer som ger en lämplig cytotoxicitetsskala. En alternativ strategi är att utföra ett preliminärt cytotoxicitetstest för att få ett snävare intervall för det definitiva testet.

28. Den högsta koncentrationen ska vara avsedd att ge en cytotoxicitet på 55 ± 5 %. Högre nivåer kan inducera kromosomskada som en bieffekt av cytotoxicitet (60). När det uppstår cytotoxicitet ska de valda testkoncentrationerna täcka en skala som sträcker sig från den koncentration som ger 55 ± 5 % cytotoxicitet till den som ger liten eller ingen cytotoxicitet.

▼M3

29. Om ingen cytotoxicitet eller utfällning observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara 0,01 M, 5 mg/ml eller 5 µl/ml, enligt det som är lägst. De koncentrationer som väljs för analys ska i regel vara separerade med högst 10. För testämnen som har en brant koncentration-responskurva kan det vara nödvändigt att använda närmare liggande testämneskoncentrationer så att odlingarna i intervallen för moderat och låg toxicitet också blir analyserade.

30. Om lösligheten är en begränsande faktor ska den högsta koncentrationen, förutsatt att denna inte begränsas av cytotoxicitet, vara den lägsta koncentration vid vilken minimal utfällning är synlig i odlingarna, förutsatt att analysen inte störs. Utvärdering av utfällning bör göras med metoder som ljusmikroskopi med detektering av utfällning som består eller uppstår under odlingen (vid slutet av behandlingen).

Kontrollgrupper

31. Parallella positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje försök.

32. Positiva kontroller behövs för att påvisa cellernas och testprotokollets förmåga att identifiera klastogener och aneugener och att bekräfta S9-preparatets metaboliska förmåga. För den positiva kontrollen bör man använda kända inducerare av mikrokärnbildning vid koncentrationer som förväntas ge små men reproducerbara ökningar över bakgrundsnivån och påvisa testsystemets känslighet. Koncentrationerna för de positiva kontrollerna bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar de kodade objektglasens identitet för den som gör avläsningarna.

33. En klastogen som kräver metabolisk aktivering (t.ex. cyklofosfamid, benso(a)pyren) bör användas för att påvisa den metaboliska förmågan och testsystemets förmåga att detektera klastogener. Om det är motiverat kan andra positiva kontroller användas. Eftersom vissa positiva kontroller som kräver metabolisk aktivering i vissa behandlingsförhållanden eller för vissa cellinjer kan vara aktiva utan exogen metabolisk aktivering, bör behovet av metabolisk aktivering och aktiviteten hos S9-preparaten testas i de valda cellinjerna och vid de valda koncentrationerna.

34. För närvarande känner man inte till några aneugener som kräver metabolisk aktivering för sin genotoxiska aktivitet (16). Positiva kontroller som för närvarande är godkända för aneugen aktivitet är t.ex. kolchicin och vinblastin. Andra kemikalier kan användas om de endast eller primärt inducerar mikrokärnor genom aneugen aktivitet. För att det inte ska behövas två positiva kontroller (för klastogenicitet och aneugenicitet) utan metabolisk aktivering, kan aneugenicitetskontrollen tjäna som positiv kontroll utan S9, och klastogenicitetskontrollen kan användas för att testa lämpligheten för det system som används för metabolisk aktivering. De positiva kontrollerna för klastogenicitet och aneugenicitet bör användas för celler som inte kräver S9. Förslag på positiva kontroller finns i tillägg 3.

35. Användning av positiva kontroller relaterade till kemisk klass kan också övervägas när lämpliga kemikalier finns att tillgå. Alla positiva kontroller bör vara lämpliga för celltypen och aktiveringsförhållandena.

▼M3

36. Lösningsmedels-/vehikelkontroller bör ingå för varje skördningstidpunkt. Dessutom bör man använda obehandlade negativa kontroller (utan lösningsmedel/vehikel), utom om det finns offentliggjorda data eller laboratoriet har historiska data som påvisar att det valda lösningsmedlet inte inducerar genotoxiska eller andra skadliga effekter vid de koncentrationer som används.

TESTFÖRFARANDE

Behandlingsschema

37. För att maximera sannolikheten för att detektera en aneugen eller klastogen som agerar i ett visst skede av cellcykeln är det viktigt att tillräckligt antal celler behandlas med testämnet under cellcykelns alla skeden. Behandlingsschemat för cellinjer och primära cellodlingar kan därför avvika något från behandlingsschemat för lymfocyter som kräver mitogen stimulering för att inleda sin cellcykel; dessa behandlas i punkterna 41–43 (16).

38. Teoretiska överväganden och offentliggjorda data (18) tyder på att de flesta aneugener och klastogener detekteras med en kortvarig behandlingsperiod på 3–6 timmar med och utan tillsats av S9, åtföljd av borttagning av testämnet och en tillväxtperiod på 1,5–2,0 cellcykler (6). Cellerna skördas vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala (dvs. obehandlade) cellcykelns längd efter att behandlingen inletts eller vid avslutad behandling (se tabell 1). Provtagnings- eller skördningstidpunkterna kan senareläggas om det är känt eller man misstänker att testämnet påverkar cellcykellängden (t.ex. vid testning av nukleosidanaloger).

39. Eftersom S9-preparat är potentiellt cytotoxiska för odlade däggdjursceller används en förlängd exponeringsbehandling på 1,5–2,0 gånger normal cellcykel endast när S9 inte ingår. Vid förlängd behandling finns det alternativ där man har möjlighet att behandla cellerna med testkemikalie utan eller med cytoB. Dessa alternativ gäller för situationer där det kan finnas tvivel rörande eventuell växelverkan mellan testämnet och cytoB.

40. Förslag till cellbehandlingsscheman finns i tabell 1. Dessa allmänna behandlingsscheman kan modifieras beroende på testämnets stabilitet eller reaktivitet eller de särskilda tillväxtegenskaper som gäller för de celler som används. Alla behandlingar bör inledas och avslutas medan cellerna är i exponentiell tillväxtfas. Dessa scheman presenteras i närmare detalj i punkterna 41–47 nedan.

Tabell 1

Tidpunkter för cellbehandling och skörd när MNvit-metoden används

Lymfocyter, primära celler och cellinjer behandlade med cytoB	+ S9	Behandla 3–6 timmar med tillsats av S9, avlägsna S9 och behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler.
	– S9 Kort exponering	Behandla 3–6 timmar, avlägsna behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler.

▼M3

	– S9 Förlängd exponering	*Alternativ A:* Behandla under 1,5–2 normala cellcykler med tillsats av cytoB, skörda i slutet av exponeringsperioden. *Alternativ B:* Behandla under 1,5–2,0 normala cellcykler, avlägsna testämnet, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler.

Cellinjer som behandlas utan cytoB

(samma som de behandlingsscheman som anges ovan utom att cytoB inte tillsätts)

Lymfocyter, primära celler och cellinjer med cytoB

41. För lymfocyter är det effektivast att starta exponeringen för testämnet 44–48 timmar efter stimulering med fytohemaglutinin, när cykelsynkroniseringen har fallit bort (5). I det första försöket behandlas cellerna 3–6 timmar med testämnet med och utan tillsats av S9. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium som innehåller cytoB och cellerna skördas efter 1,5–2,0 normala cellcykler.

42. Om båda de initiala försöken med kort (3–6 timmar) behandling är negativa eller tvetydiga görs en efterföljande förlängd exponeringsbehandling utan S9. Det finns två likvärdigt godkända behandlingsalternativ att tillgå. Det kan dock vara lämpligare att använda alternativ A för stimulerade lymfocyter i fall där den exponentiella tillväxten kan minska vid 96 timmar efter stimulering. Likaså ska cellodlingarna inte ha nått sammanväxning vid den slutliga skördningstiden i alternativ B.

— Alternativ A: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler och skördas vid behandlingstidens slut.

— Alternativ B: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium och cellerna skördas efter ytterligare 1,5–2,0 normala cellcykler.

43. Primära celler och cellinjer ska behandlas på liknande sätt som lymfocyterna, utom att det inte är nödvändigt att stimulera dem med fytohemaglutinin under 44–48 timmar. Andra celler än lymfocyter ska exponeras så att cellerna vid försökets slut fortfarande är i logfas.

Cellinjer utan cytoB

44. Cellerna behandlas 3–6 timmar med och utan tillsats av S9. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium och cellerna skördas efter 1,5–2,0 normala cellcykler.

▼M3

45. Om båda de initiala försöken med kort (3–6 timmar) behandling är negativa eller tvetydiga görs en efterföljande förlängd exponeringsbehandling (utan S9). Det finns två likvärdigt godkända behandlingsalternativ att tillgå.

— Alternativ A: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler och skördas vid behandlingstidens slut.

— Alternativ B: Cellerna behandlas med testämnet under 1,5–2,0 normala cellcykler. Behandlingsmediet avlägsnas och ersätts med färskt medium och cellerna skördas efter ytterligare 1,5–2,0 normala cellcykler.

46. I enkelskikt kan det finnas mitotiska celler (som identifieras genom att de är runda och lösgör sig från ytan) i slutet av behandlingen på 3–6 timmar. Eftersom dessa mitotiska celler enkelt lösgörs, kan de förloras när mediet som innehåller testämnet avlägsnas. Man bör vara uppmärksam på att samla in dem när odlingarna tvättas och återbörda dem till odlingarna, för att undvika förlust av celler som undergår mitos och är utsatta för risk för mikrokärnor vid tidpunkten för skörd.

Antal odlingar

47. Dubbla odlingar bör användas för varje testämneskoncentration och för lösningsmedels-/vehikelodlingarna och de negativa kontrollerna. I fall där laboratoriets historiska data kan påvisa minimala variationer mellan dubbla odlingar kan det vara godtagbart att endast använda en odling. I så fall rekommenderas analys av ett högre antal koncentrationer.

Skörd av celler och beredning av objektglas

48. Varje odling skördas och hanteras separat. Förberedningen av cellerna kan inbegripa hypoton behandling, men detta steg är inte nödvändigt om tillräcklig cellspridning erhålls på annat sätt. Olika tekniker kan användas för preparering av objektglasen förutsatt att man får cellpreparat av hög kvalitet för analysen. Cellernas cytoplasma bör behållas för att ge möjlighet att detektera mikrokärnor och (vid metoden med blockering av cytokines) tillförlitlig identifiering av binukleära celler.

49. Objektglasen kan färgas med olika metoder, såsom Giemsa eller fluorescerande DNA-specifika färgämnen (59). Användningen av ett DNA-specifikt färgämne (t.ex. akridinorange (61) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (62)) kan eliminera några av de artefakter som är associerade med färgämnen som inte är DNA-specifika. Anti-kinetochor-antikroppar, FISH-teknik med pancentromera DNA-prober eller primad *in situ*-märkning med pancentromerspecifik primer, tillsammans med lämplig DNA-motfärgning kan användas för att identifiera innehållet (kromosom/kromosomfragment) av mikrokärnor om man är intresserad av mekanismer för hur de bildas (15) (16). Andra metoder för differentiering mellan klastogener och aneugener kan användas om de har visat sig vara effektiva.

Analys

50. Alla objektglas, inklusive glasen från lösningsmedels-/vehikelkontrollerna och de positiva och negativa kontrollerna, bör ges en oberoende kodning före analysen med mikroskop. Alternativt kan kodade prover analyseras med användning av ett validerat och automatiskt system för flödescytometri eller bildanalys.

▼M3

51. I cytoB-behandlade odlingar bör förekomsten av mikrokärnor analyseras i minst 2 000 binukleära celler per koncentration (minst 1 000 binukleära celler per odling, två odlingar per koncentration). Om enkla odlingar används bör minst 2 000 binukleära celler per koncentration analyseras ur odlingen. Om betydligt mindre antal än 1 000 binukleära celler per odling, eller 2 000 om en enkel odling används, finns att tillgå för analys för varje koncentration och en väsentlig ökning av mikrokärnor inte upptäcks, bör testet upprepas med användning av flera celler eller vid mindre toxiska koncentrationer, enligt det som är lämpligt. Man bör se upp med att inte analysera binukleära celler med oregelbunden form eller celler där de två kärnorna avviker betydligt i storlek, inte heller ska binukleära celler förväxlas med dåligt spridda multinukleära celler. Celler som innehåller fler än två huvudkärnor ska inte analyseras för mikrokärnor, eftersom bakgrundsförekomsten av mikrokärnor kan vara högre i dessa celler (63) (64). Analys av mononukleära celler kan godtas om testämnet påvisas störa cytoB-aktiviteten.

52. För cellinjer som testas utan cytoB-behandling bör mikrokärnorna analyseras med minst 2 000 celler per koncentration (minst 1 000 celler per odling, två odlingar per koncentration). Om endast en odling per koncentration används bör minst 2 000 celler analyseras från odlingen.

53. När cytoB används bör proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bestämmas för bedömning av cellproliferationen (se tillägg 2) med användning av minst 500 celler per odling. När behandlingar görs utan tillsats av cytoB är det väsentligt att belägg ges för att de celler som analyseras har proliferat, enligt det som beskrivs i punkterna 24–27.

Kriterier för godkännande

54. Ett laboratorium som vill använda MNvit-testning enligt beskrivningen i denna testmetod bör påvisa sin förmåga att på ett tillförlitligt och exakt sätt detektera kemikalier med känd aneugen och klastogen aktivitet, med och utan metabolisk aktivering, såväl som kända negativa kemikalier, med användning av referenskemikalierna enligt tillägg 3. För att påvisa sin förmåga att genomföra testmetoden korrekt bör laboratoriet tillhandahålla belägg för att de celler som analyseras för bildning av mikrokärnor har slutfört en kärndelning, om testningen genomförs utan användning av cytoB.

55. De kemikalier som förtecknas i tillägg 3 rekommenderas som referenskemikalier. Ersättande eller ytterligare kemikalier kan ingå om deras aktivitet är känd och om de inducerar mikrokärnor enligt samma mekanismer och om de kan påvisas vara relevanta för de kemikalier som testas med MNvit-förfarandet. Motiveringen kan innehålla en valideringsstudie där man använt ett brett urval olika ämnen eller fokuserat på ett smalare spektrum baserat på testämnets kemiska klass eller mekanismen för den skada som undersöks.

56. Lösningsmedels-/vehikelkontrollen och obehandlade odlingar bör ge reproducerbart låga och enhetliga förekomster av mikrokärnor (typiskt 5–25 mikrokärnor per 1 000 celler för de celltyper som anges i punkt 11). Andra celltyper kan ha annorlunda responsintervall, vilka bör bestämmas när celltyperna valideras för användning i ett MNvit-förfarande. Data från negativ kontroll, lösningsmedelskontroll och positiv kontroll bör användas för att etablera historiska kontrollintervall. Dessa värden bör användas för att bedöma den parallella negativa eller positiva kontrollens lämplighet för ett försök.

▼M3

57. Om det föreslås mindre ändringar av protokollet (t.ex. automatiska i stället för manuella analystekniker eller användning av en ny celltyp), bör ändringens effektivitet påvisas innan det modifierade protokollet kan anses vara godkänt för användning. När effektiviteten påvisas måste man också kunna visa att de centrala mekanismerna för kromosombrott och kromosomökning och -förlust kan detekteras och att lämpliga positiva och negativa resultat kan nås för klassen för det enskilda ämne eller för det breda urval av ämnen som ska testas.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

58. Om blockering av cytokines används ska endast förekomsten av binukleära celler med mikrokärnor (oavsett antalet mikrokärnor per cell) användas för utvärderingen av inducering av mikrokärnor. Analys av antalet celler med en, två eller flera mikrokärnor kan ge användbar information men är inte obligatorisk.

59. Parallella mått på cytotoxicitet och/eller cytostas för alla behandlade odlingar och kontrollodlingar med lösningsmedel/vehikel bör bestämmas (58). Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bör beräknas för alla behandlade odlingar och kontrollodlingar som mått på cellcykelfördröjning när blockering av cytokines används. Om cytoB inte tillsätts bör relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) eller proliferationsindex (PI) användas (se tillägg 2).

60. Data bör anges per enskild odling. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform.

61. Att kemikalier inducerar mikrokärnor i MNvit-metoden kan bero på att de inducerar kromosombrott, kromosomförlust eller en kombination av dessa två. Ytterligare analys med användning av anti-kinetochor-antikroppar, centromerspecifika *in situ*-prober eller andra metoder kan göras för att avgöra huruvida mekanismen för inducering av mikrokärnor beror på klastogen och/eller aneugen aktivitet.

Utvärdering och tolkning av resultaten

62. Det finns inget krav på verifiering genom ytterligare testning av ett tydligt positivt eller negativt svar. Tvetydiga resultat kan förtydligas genom analys av ytterligare 1 000 celler, som tas från alla odlingar för att bibehålla karaktären av blindförsök. Om detta inte klargör resultatet krävs ytterligare testning. Vid uppföljningstestning bör man överväga att modifiera undersökningsparametrarna så att man får en bredare eller snävare skala av förhållanden, enligt det som är lämpligt. Till de undersökningsparametrar som kanske måste ändras ingår koncentrationsintervall, tidpunkten för behandling och skörd av cellerna och/eller betingelserna för metabolisk aktivering.

63. Det finns ett flertal kriterier för att fastställa ett positivt resultat, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en statistiskt signifikant reproducerbar ökning av antalet celler som innehåller mikrokärnor. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Överväganden om huruvida de observerade värdena ligger inom eller utanför det historiska kontrollintervallet kan ge vägledning för utvärderingen av svarets biologiska betydelse. Lämpliga statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultaten (65). Resultaten från statistisk testning bör dock bedömas utifrån dos-responsförhållandet. Likaså bör reproducerbarhet och historiska data beaktas.

▼M3

64. Även om de flesta försök ger tydligt positiva eller negativa resultat, kan datauppsättningen i vissa fall inte ge möjlighet att göra en definitiv bedömning av testämnets aktivitet. Sådana tvetydiga eller tveksamma resultat kan uppstå oavsett hur många gånger försöket upprepas.

65. Positiva resultat från MNvit-testning tyder på att testämnet inducerar kromosombrott eller kromosomförlust i odlade däggdjursceller. Negativa resultat indikerar att testämnet under de gällande försöksbetingelserna inte inducerar kromosombrott och/eller kromosomökning eller -förlust i de odlade däggdjurscellerna.

Testrapport

66. Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Testkemikalie

— Identifieringsdata och CAS-nummer och EG-nummer.

— Fysikalisk form och renhetsgrad.

— Fysikalisk-kemiska egenskaper av betydelse för studien.

— Testkemikaliens reaktionsbenägenhet med lösningsmedel/vehikel eller cellodlingsmedier.

Lösningsmedel/vehikel

— Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel.

— Testämnets stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln.

Celler

— Cellernas typ och källa.

— Den använda celltypens lämplighet.

— Frånvaro av mykoplasma, om detta är tillämpligt.

— Uppgifter om cellcykelns längd, fördubblingstid eller proliferationsindex.

— Om lymfocyter används, blodgivarnas kön, ålder och antal, om tillämpligt.

— Om lymfocyter används, uppgift om huruvida helblod eller separata lymfocyter exponeras.

— Antal passager, om detta är tillämpligt.

— Metoder för underhållet av cellodlingar, om detta är tillämpligt.

— Det modala antalet kromosomer.

— Normal cellcykellängd (negativ kontroll).

Testbetingelser

— Identitet för cytokinesinhiberande ämne (t.ex. cytoB), om sådant används, och ämnets koncentration samt cellexponeringens varaktighet

— Motivering för val av koncentrationer och antalet odlingar, även data om cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar i den mån dessa data finns att tillgå.

— Mediesammansättning, CO_2-koncentration, om tillämpligt.

— Testämneskoncentrationer.

▼M3

— Koncentration (och/eller volym) för vehikel och tillsatt testämne.

— Inkubationstemperatur och tid.

— Behandlingens varaktighet.

— Tidpunkten för skörd efter behandlingen.

— Celldensitet vid inokulering, om tillämpligt.

— Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, även kriterier för godkännande.

— Positiva kontrollkemikalier och negativa kontroller.

— Metoder för preparering av objektglas och färgningsteknik.

— Kriterier för identifiering av mikrokärnor.

— Antalet analyserade celler.

— Metoder för mätning av cytotoxicitet.

— All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet.

— Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.

— Metod(er) för statistisk analys.

— Metoder, såsom användning av kinetochor-antikropp, för att fastställa om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade mikrokärnor, om tillämpligt.

Resultat

— Mätningar av cytotoxicitet, t.ex. proliferationsindex (CBPI) eller replikeringsindex (RI) när cytokinesinhibering används, relativ ökning av celltal (RICC), relativ populationsfördubbling (RPD) eller proliferationsindex (PI) när cytokinesinhibering inte används, andra observationer om tillämpligt, t.ex. cellsammanväxning, apoptos, nekros, antalet metafaser, frekvensen binukleära celler.

— Tecken på utfällning.

— Data om behandlingsmediets pH och osmolalitet, om uppmätt.

— Definition av godkända celler för analys.

— Fördelningen av mono-, bi- och multinukleära celler i fall där blockering av cytokines har använts.

— Antalet celler med mikrokärnor angivet separat för varje behandlad odling och kontrollodling och, där det är lämpligt, angivelse av huruvida det gäller binukleära eller mononukleära celler.

— Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.

— Kemiska data om parallella negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel).

— Historiska data om negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontroller, med intervall, medelvärden och standardavvikelser samt tillförlitlighetsintervall (t.ex. 95 %).

— Statistisk analys, p-värden om sådana finns.

Diskussion om resultaten

Slutsatser

▼M3

HÄNVISNINGAR

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1–4.

(2) Parry, J.M. och Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3–15.

(3) Fenech, M. och Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233–246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. och Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167–172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104.

(6) Fenech, M. ochd Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193–198.

(7) Eastmond, D.A. och Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34–43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9–20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. och Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297–302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. och Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329–334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. och Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205–213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. och Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519–525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. och Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9–20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. och Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233–245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. och Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211–219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. och Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153–163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: www.oecd.org/env/testguidelines

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. och Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13–36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. och Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37–60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. och Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61–87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. och Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88–124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. och Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125–152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT och *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187–208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. och Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45–59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. och Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81–116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. och Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183–190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. och Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55–71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. och Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137–163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. och Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123–134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. och Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569–580.

▼M3

(31) Elhajouji, A., och Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1–152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16–17 November, 2006, Finns på: http://ecvam.jrc.it/index.htm

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Finns på: http://ecvam.jrc.it/index.htm

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271–283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. och Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105–115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. och Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257–260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. och Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315–328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. och Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61–70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. och Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147–205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. och Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297–305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789–886.

(42) Fenech, M. och Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29–36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11–18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. och Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31–45.

▼M3

(45) Maron, D.M. och Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173–215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. och Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55–65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. och Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175–177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. och Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. och Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51–59.

(50) Unep (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (Unep). Finns på: http://www.pops.int/

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. och Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247–274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. och McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, sidorna 91–103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. och Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795–801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35–44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., och Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103–112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. och Wakata, A. (2004), Corrigendum to ”Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”, *Mutation Res.*, 564, 97–100.

(57) Pincu, M., Bass, D. och Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61–65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. och Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1–3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. och Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169–184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191–201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T. och Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. och Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269–275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. och Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. och Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65–75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. och Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, sidorna 463–467.

(66) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 850/2004 av den 29 april 2004 om långlivade organiska föroreningar och om ändring av direktiv 79/117/EEG (EUT L 158, 30.4.2004, s. 7).

▼M3

Tillägg 1

Definitioner

Aneugen: Ett ämne eller en process som genom växelverkan med komponenterna i den mitotiska och meiotiska celldelningscykeln leder till aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: Alla avvikelser från det normala antalet diploida (eller haploida) kromosomer med en eller flera kromosomer, men inte med hela uppsättningar kromosomer (polyploidi).

Apoptos: Programmerad celldöd som karakteriseras av en serie steg som leder till sönderfall av celler till membranbundna partiklar som därefter elimineras genom fagocytos eller avstötning.

Cellproliferation: Ökning av antalet celler som resultat av mitotisk celldelning.

Centromer: DNA-regionen i en kromosom där båda kromatiderna är sammanhållna och på vilken båda kinetochorerna är fästa sida vid sida.

Klastogen: Alla ämnen eller processer som orsakar strukturella kromosomavvikelser i populationer av celler eller organismer.

Cytokines: Den celldelning som följer omedelbart efter mitosen vid vilken två dotterceller bildas med var sin enskild kärna.

Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI): Förhållandet mellan antalet celler efter två delningar i den behandlade populationen och motsvarande antal i den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

Cytostas: Inhibering av celltillväxt (se tillägg 2 för formel).

Cytotoxicitet: Skadliga effekter på cellens struktur eller funktion som i slutändan leder till celldöd.

Genotoxisk: En allmän term som omfattar alla typer av DNA- eller kromosomskador, inklusive brott, adduktomfördelning, mutationer, kromosomavvikelser och aneuploidi. Inte alla typer av genotoxiska effekter leder till mutationer eller stabila kromosomskador.

Interfasceller: Celler som inte är i mitotisk fas.

Kinetochor: Ett protein som innehåller en struktur som fäster sig vid en kromosomcentromer till vilken spindelfibrer associerar under celldelning och ger upphov till en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

Mikrokärnor: Små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna och som produceras under mitosens eller meiosens telofas från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

Mitos: Delning av cellkärnan, i regel bestående av profas, prometafas, metafas, anafas och telofas.

Mitotiskt index: Den andel celler som är i metafas dividerat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av cellproliferation hos den populationen.

Mutagent ämne: Ämne som producerar en ärftlig ändring av DNA-basparssekvensen (-sekvenserna) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomavvikelser).

▼**M3**

Icke-disjunktion: När kromatidpar inte separeras och segregeras korrekt till dottercellerna under utveckling, vilket leder till dotterceller med abnormalt antal kromosomer.

Polyploidi: Numeriska kromosomavvikelser i celler eller organismer som inbegriper en eller flera hela kromosomuppsättningar, i motsats till en enskild kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

Proliferationsindex (PI): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ ökning av celltal (RICC): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ populationsfördubbling (RPD): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Replikeringsindex (RI): Andelen celldelningscykler som slutförts i en behandlad odling under exponeringsperioden och återhämtningen, i förhållande till den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

Testkemikalie (kallas också testämne): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M3

Tillägg 2

Formler för bestämning av cytotoxicitet

1. *När cytoB används* ska bedömningen av cytotoxicitet basera sig på proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) (16) (58). Proliferationsindex vid cytokinesinhibering indikerar det genomsnittliga antalet cellcykler per cell under exponeringsperioden för cytoB och kan användas för att beräkna cellproliferationen. Replikeringsindex indikerar det relativa antalet kärnor i behandlade odlingar i jämförelse med kontrollodlingar och kan användas för att beräkna procentandelen cytostas:

$$\% \text{ cytostas} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

och

T = odling behandlad med testkemikalie

C = vehikelkontrollodling

där

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Antalet mononukleära celler}) + (2 \times \text{Antalet binukleära celler}) + (3 \times \text{Antalet multinukleära celler}))}{(\text{Totala antalet celler})}$$

Således gäller att ett CBPI-värde på 1 (alla celler är mononukleära) motsvarar 100 % cytostas.

$$\text{Cytostas} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{Antalet binukleära celler}) + (2 \times \text{Antalet multinukleära celler})) \div (\text{Totala antalet celler})_T}{((\text{Antalet binukleära celler}) + (2 \times \text{Antalet multinukleära celler})) \div (\text{Totala antalet celler})_C} \times 100$$

T = behandlade odlingar

C = kontrollodlingar

2. Således betyder ett RI-värde på 53 % att, jämfört med antalet celler som har delat sig till binukleära och multinukleära celler i kontrollodlingen, endast 53 % av detta antal har delat sig i den behandlade odlingen, dvs. 47 % cytostas.

3. *När cytoB inte används*, rekommenderas att cytotoxiciteten utvärderas på grundval av relativ ökning av celltal (RICC) eller relativ populationsfördubbling (RPD) (58), eftersom den andel av cellpopulationen som har delat sig beaktas i båda metoderna.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{Ökning av cellantal i behandlade odlingar (slutlig – vid start)})}{(\text{Ökning av cellantal i kontrollodlingar (slutlig – vid start)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{Antal populationsfördubblingar i behandlade odlingar})}{(\text{Antal populationsfördubblingar i kontrollodlingar})} \times 100$$

▼M3

där

Populationsfördubbling = [log (Cellantal efter behandling ÷ Ursprungligt cellantal)] ÷ log 2

4. Således indikerar ett RICC-värde eller ett RPD-värde på 53 % att det förekommer 47 % cytotoxicitet/cytostas.

5. Genom att använda ett proliferationsindex (PI) kan cytotoxiciteten bestämmas genom att räkna antalet kloner som består av 1 cell (cl1), 2 celler (cl2), 3 till 4 celler (cl4) och 5 till 8 celler (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PI har använts som en värdefull och tillförlitlig cytotoxicitetsparameter även för cellinjer som har odlats *in situ* utan tillsats av cytoB (25) (26) (27) (28).

▼M3

Tillägg 3

Referenskemikalier som rekommenderas för bedömning av prestanda ([1])

Kategori	Kemikalie	CAS-nummer	EG-nummer
1. Klastogener utan metabolisk aktivering			
	Cytosinarabinosid	147-94-4	205-705-9
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogener som kräver metabolisk aktivering			
	Benso(a)pyren	50-32-8	200-028-5
	Cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugener			
	Kolchicin	64-86-8	200-598-5
	Vinblastin	143-67-9	205-606-0
4. Negativa ämnen			
	Di(2-etylhexyl)ftalat	117-81-7	204-211-0
	Nalidixinsyra	389-08-2	206-864-7
	Pyren	129-00-0	204-927-3
	Natriumklorid	7647-14-5	231-598-3

([1]) Referenskemikalierna är de kemikalier som rekommenderas. Ersättning eller tillägg av kemikalier till förteckningen över referenskemikalier kan göras om deras aktivitet är känd och de inducerar mikrokärnor enligt samma mekanismer, och om de kan påvisas vara relevanta för de kemikalier som ska testas med MNvit-förfarandet. Beroende på ändamålet kan motiveringen också innehålla en valideringsstudie där man använt ett brett urval olika ämnen eller fokuserat på ett smalare spektrum baserat på testämnets kemiska klass eller mekanismen för den skada som undersöks.

▼M3

B.50. **HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): DA**

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den första testmetoden (B.42) för bestämning av hudsensibilisering hos möss (LLNA-metoden, OECD:s testriktlinje 429) har reviderats (1). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA-metoden och en granskning av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). I LLNA-metoden används radioisotopiskt tymidin eller jod för att mäta lymfocytproliferation och metoden har därför begränsad användning när det förekommer problem med att anskaffa, använda eller bortskaffa radioaktivitet. LLNA: DA (som utvecklats av Daicel Chemical Industries, Ltd) är en icke-radioaktiv modifiering av LLNA enligt vilken mängden adenosintrifosfat (ATP) kvantifieras genom bioluminiscens som en indikator på lymfocytproliferation. LLNA: DA-testmetoden har validerats, granskats och rekommenderats av en internationell expertutvärderingspanel som konstaterade att den kan användas för att identifiera hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier, med vissa begränsningar (10)(11)(12)(13). Testmetoden är avsedd för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Enligt kapitel B.6 i denna bilaga och i OECD:s testriktlinje 406 används test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (14). LLNA (kapitel B.42 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 429) och de två icke-radioaktiva modifikationerna LLNA: DA (kapitel B.50 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 442 A) och LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 442 B) har fördelar jämfört med marsvinstestet enligt B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (14) såtillvida att man kan minska antalet djur och använda dem på ett skonsammare sätt.

2. I likhet med LLNA används LLNA: DA för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos-responsbedömning. Vidare gäller att de här metodernas förmåga att detektera hudsensibiliserande kemikalier utan att det behövs radiomärkning för DNA eliminerar risken för yrkesmässig exponering för radioaktivitet och problem rörande bortskaffning av avfall. Detta kan i sin tur ge möjlighet till ökad användning av möss för att upptäcka hudsensibiliserande ämnen, vilket ytterligare kan minska användningen av marsvin för att testa kemikaliers hudsensibiliserande potential (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14).

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA: DA är en modifierad LLNA-metod för identifiering av kemikalier med potential att framkalla hudsensibilisering, med specifika begränsningar. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA: DA alltid ska användas i stället för LLNA eller test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14), utan att metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse (10) (11). Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska

▼M3

egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende testämnets toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Denna information bör övervägas för att kunna fastställa om LLNA-metoden är lämplig för testämnet (mot bakgrund av att LLNA-metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och som stöd för valet av dos.

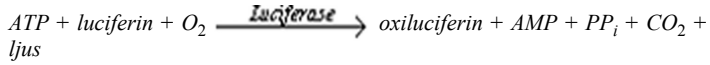
5. LLNA: DA är en *in vivo*-metod, och därför kan man inte undvika användningen av djur för bedömning av sensibilisering genom allergisk kontakt. Detta test erbjuder dock möjligheter till att minska antalet djur i jämförelse med test på marsvin (B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14). Dessutom ger LLNA: DA möjlighet till en betydligt skonsammare behandling (mindre smärta och lidande) av de djur som används för testning av sensibilisering genom allergisk kontakt, eftersom man med LLNA: DA, till skillnad från B.6 och OECD:s testriktlinje 406 inte behöver framkalla provokationsinducerade dermala hypersensitivitetsreaktioner. Trots fördelarna med LLNA: DA i jämförelse med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (14), finns det vissa begränsningar som gör att man kanske måste använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (t.ex. testning av vissa metaller, falska positiva resultat med vissa hudirriterande ämnen (såsom vissa ytaktiva ämnen (6) (1 och kapitel B.42 i denna bilaga), testämnets löslighet)). Dessutom kan det för kemiska klasser eller ämnen som har funktionella grupper som påvisats agera som potentiella störfaktorer (16) vara nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406 (14)). Det rekommenderas att de begränsningar som anges för LLNA (1 och kapitel B.42 i denna bilaga) även ska gälla för LLNA: DA (10). Dessutom är LLNA: DA eventuellt inte lämplig för testning av ämnen som påverkar ATP-nivåerna (t.ex. ämnen som fungerar som ATP-inhibitorer) eller ämnen som stör exakt mätning av intracellulärt ATP (t.ex. förekomsten av ATP-degraderande enzymer eller förekomst av extracellulärt ATP i lymfnoden). Utöver sådana identifierade begränsningar bör LLNA: DA gå att använda för testning av alla ämnen, utom om ett ämne förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA: DA-metodens exakthet. Dessutom bör överväganden göras rörande risken för positiva gränsresultat när man får värden för stimulationsindex (SI) mellan 1,8 och 2,5 (se punkterna 31–32). Detta grundar sig på valideringsdatabasen med 44 ämnen med användning av SI ≥ 1,8 (se punkt 6) för vilka LLNA: DA ger korrekt identifiering av alla 32 sensibiliserande ämnen enligt LLNA men felaktig identifiering av 3 av 12 icke-sensibiliserande ämnen enligt LLNA med SI-värden mellan 1,8 och 2,5 (dvs. på gränsen till positivt) (10). Eftersom samma datauppsättning användes för att fastställa SI-värdena och beräkna testmetodens förutsägande egenskaper kan dock de angivna resultaten vara en överuppskattning av de faktiska förutsägande egenskaperna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA: DA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara ≥ 1,8 för att det

▼M3

ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. Det förfarande som beskrivs här grundar sig på mätning av ATP-innehållet (som korrelerar med antalet levande celler) genom bioluminiscens (17) i syfte att indikera ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna (18) (19). I bioluminiscensmetoden används enzymet luciferas för att katalysera ombildningen till ljus från ATP och lucifering enligt följande reaktion:



$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oxiluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + ljus$$

Det emitterade ljusets intensitet är linjärt relaterat till ATP-koncentrationen och uppmäts med en luminometer. Luciferin-luciferas-förfarandet är en känslig metod för ATP-kvantifiering som används i en mängd olika tillämpningar (20).

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. Valideringsstudier för LLNA: DA genomfördes uteslutande med stammen CBA/J som därför anses vara den stam som är att föredra (12) (13). I testet används unga vuxna mushonor som inte har fött ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA: DA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (21), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i djurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (öronmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets förhållanden i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har några synliga hudskador.

Förberedelse av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska före applicering på mössens öron extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel för att få ut alla extraherbara beståndsdelar för testning. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

▼M3

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet klarar av att ge respons med tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne för vilket responsen har en välkarakteriserad styrka. Användningen av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet att bedöma reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Vissa tillsynsmyndigheter kräver också att positiv kontroll används för varje försök, och därför rekommenderas samråd med relevanta myndigheter innan testning med LLNA: DA inleds. Likaså uppmuntras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur i fall där myndigheterna inte godkänner periodiska positiva kontroller (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA: DA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) som är större eller lika med 1,8 i förhållande till den negativa kontrollgruppen. Dosen för den positiva kontrollkemikalien ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (t.ex. SI > 10 anses vara för högt värde). Rekommenderade ämnen för positiv kontroll är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS-nummer 101-86-0) och 25-procentig eugenol (CAS-nummer 97-53-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller de ovan angivna kriterierna användas, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.

12. Även om användning av en parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen i laboratorier som regelbundet genomför LLNA: DA (dvs. minst en gång i månaden) och som har en etablerad historisk databas över positiv kontroll som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från positiva kontroller. Tillräcklig kvalitet hos LLNA: DA kan framgångsrikt påvisas genom att enhetliga positiva resultat erhålls från den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (kortare än ett år).

13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas när det sker ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.

14. Man bör vara medveten om att beslut om att använda positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningsresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska undersökningarna av positiv kontroll. Om t.ex. falska negativa resultat fås vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet av positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga användning av färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att färre möss kan användas (22).

▼M3

15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar en enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym)), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även behövs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (23). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat kontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.

16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av ämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:

— Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.

— Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Stödjande data från LLNA: DA.

— Stödjande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet bör användas. Dessutom används en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord, enligt laboratoriets principer för överväganden enligt punkterna 11–15). Man bör överväga flera upprepade doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.

18. Doserna och vehikeln bör väljas på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna 0 och (24). Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör övervägas vid valet av de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (24) (25). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt att först genomföra ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).

19. Vehikeln får inte störa eller snedvrida testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet för att få högsta möjliga koncentration samtidigt som man får en lösning/suspension som är lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (6) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att säkerställa att hydrofila ämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubiliserande ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.

▼M3

20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i kontrollgruppen (se punkt 33). Dessutom kan möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen endast övervägas utifrån att data samlas in individuellt per djur (22). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas per individuellt djur. Regelbunden insamling av individuella data per djur ger en fördel rörande djurens välbefinnande eftersom man kan undvika upprepad testning som annars skulle behövas om testämnesresultat som ursprungligen har samlats in på ett visst sätt (t.ex. genom poolade djurdata) måste granskas senare av tillsynsmyndigheter som har avvikande krav (såsom data per individuellt djur).

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns tillgång till information för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör ett preliminärt screeningtest genomföras för att definiera den lämpliga dosnivån för test i LLNA: DA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att ge vägledning för valet av högsta dosnivå som ska användas i den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen i fall där det inte finns tillgång till information om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.

22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som vid den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen, utom att man inte utvärderar proliferationen i lymfnoderna och man kan använda färre djur i dosgruppen. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 8). På varje mus observeras båda öronen i fråga om hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (25). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen), dag 7 (24 timmar före avslut) och dag 8. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 8 genom vägning av en öronbit som stansats ut efter att djuren har avlivats skonsamt. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom hudrodnadsgradering ≥ 3 och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningsdagarna (26) (27). Den högsta dos som väljs för den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen blir nästa lägre dos i koncentrationsserien för den preliminära screeningen (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Grader av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2

▼M3

Observation	Gradering
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. Utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (26) (27) har en statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss också använts för att identifiera irriterande ämnen genom LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Dock så gäller att även om statistiskt signifikanta ökningar kan inträffa när ökningen av örontjocklek är mindre än 25 %, har dessa inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (30) (31) (32) (33) (34).

24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (35) när de används som del av en helhetsbedömning, och kan därför ge hänvisning om den högsta dosnivå som ska användas i det huvudsakliga LLNA: DA-försöket: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, en minskning på mer än 5 % av kroppsvikten från dag 1 till dag 8 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på svår smärta och lidande ska avlivas skonsamt (36).

Huvudundersökningens försöksschema

25. För testet används följande försöksschema:

— *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikten samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera en 1-procentig vattenlösning av natriumlaurylsulfat (SLS) på baksidan av varje öra med en borste doppad i lösningen och täck örats hela baksida med fyra till fem strykningar. En timme efter SLS-behandlingen appliceras 25 µl lämpligt utspätt testämne, enbart vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen gjord positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer rörande punkterna 11–15) på båda öronens baksida.

— *Dagarna 2, 3 och 7:* Upprepa förbehandlingen med 1-procentig SLS-vattenlösning och applicera testämnet på samma sätt som på dag 1.

— *Dagarna 4, 5 och 6:* Ingen behandling.

— *Dag 8:* Registrera vikten för varje djur och eventuella kliniska observationer. Avliva djuren skonsamt cirka 24–30 timmar efter appliceringsstarten dag 7. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje musöra och behandla separat i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) för varje djur. Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (22). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

▼M3

Beredning av cellsuspensioner

26. För varje mus bereds en suspension med enskilda celler av de bilateralt bortskurna lymfnodscellerna (LNC) genom att placera lymfnoderna mellan två objektglas som trycks lätt samman för att krossa noderna. Kontrollera att vävnaden har spritt ut sig i ett tunt skikt och dra isär de två objektglasen. Bered en suspension av vävnaden på båda objektglasen genom att hålla dem ett i sänder i vinkel över en Petriskål och skölja med fosfatbuffrad saltlösning och skrapa samtidigt loss vävnaden med en cellskrapa. Observera att lymfnoderna i den negativa kontrollgruppens djur är små, och det är viktigt att iaktta stor försiktighet för att inte åstadkomma störande inverkan på SI-värdena. Totalt används 1 ml fosfatbuffrad saltlösning för sköljning av båda objektglasen. Gör en lätt homogenisering av LNC-suspensionen i Petriskålen med hjälp av cellskrapan. Dra upp en alikvot på 20 µl ur LNC-suspensionen med mikropipett och var försiktig med att inte ta upp membran som kan ses med blotta ögat, och blanda sedan med 1,98 ml fosfatbuffrad saltlösning till en provvolym på 2 ml. Bered sedan ett andra prov på 2 ml genom samma förfarande så att det finns två prov beredda per djur.

Bestämning av cellproliferation (mätning av lymfocyternas ATP-innehåll)

27. Ökning av ATP-innehållet i lymfnoderna mäts genom luciferin-luciferas-metoden med användning av ett system för ATP-mätning som mäter bioluminiscensen som relativa ljusenheter (Relative Luminescence Units, RLU). Tiden mellan avlivning av ett djur fram till mätning av ATP-innehållet bör vara enhetlig, inom cirka 30 minuter, eftersom man anser att ATP-innehållet gradvis minskar med tiden efter avlivningen (12). Serien av förfaranden från bortskärning av de aurikulära lymfnoderna fram till ATP-mätning bör därför slutföras inom 20 minuter enligt det på förhand fastställda tidsschemat som är samma för varje djur. ATP-luminiscensen bör mätas för varje 2 ml-prov så att totalt två ATP-mätningar görs per djur. Genomsnittet för ATP-luminiscens bestäms och används därefter för beräkningarna (se punkt 30).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

28. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt och individuellt per mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av möss som visar tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion, så att de kan avlivas (36).

Kroppsvikt

29. Såsom konstateras i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid försökets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

30. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som genomsnittet för stimulationsindex. Stimulationsindex erhålls genom att genomsnittligt värde för RLU/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt värde för RLU/djur för kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel. Genomsnittligt stimulationsindex för vehikelkontrollgrupperna är då 1.

▼M3

31. Vid bedömning av resultaten anses ett resultat vara positivt när SI ≥ 1,8 (10). Man kan dock även använda dos-responsförhållandets styrka samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränsresultat (dvs. SI-värde mellan 1,8 och 2,5) ska anses vara positivt 0 0 (37).

32. För ett gränsresultat för positiv respons där SI-värdet ligger mellan 1,8 och 2,5 vill man kanske beakta tilläggsinformation såsom dos-responsförhållandet, tecken på systemisk toxicitet eller särskilt kraftig irritation och, där det är lämpligt, statistisk signifikans tillsammans med SI-värden för att bekräfta att resultaten är positiva (10). Likaså bör man beakta testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna förhållandet mellan dos och respons. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (4).

33. När data samlas in per enskild mus kan man göra en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden för dos-responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos-responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel). De statistiska analyserna kan inbegripa t.ex. linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos-responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av en lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanförliggande värden).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Data sammanställs i tabellform med angivelse av RLU-värden per djur, gruppens medelvärde för RLU per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollkemikalier

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer, om tillgängligt, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel

— Identifieringsdata (renhet, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts).

— Motivering för val av vehikel.

▼**M3**

Testdjur

— CBA-mössens ursprung.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antal djur och deras ålder.

— Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser

— Ursprung, satsnummer och tillverkarens kvalitetsintyg/kvalitetskontrolldata för ATP-kit.

— Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.

— Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).

— Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.

— Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll

— Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, även information om testämne, koncentration och vehikel.

— Data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och parallella negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) för testningslaboratoriet.

— Om försöket inte har omfattat parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat

— Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd avlivning samt medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.

— Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.

— Tidpunkten för avlivning och tidpunkten för ATP-mätning per djur.

— En tabell med RLU-värden och SI-värden per djur för varje dosbehandlingsgrupp.

— Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för RLU per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp.

▼M3

— Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen mellan djuren i testämnesgruppen och kontrollgruppen.

— Förhållandet mellan dos och respons.

— Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten

— En kort kommentar om resultaten, dos-responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. och Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. och Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. och Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. och Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99–4494. Research Triangle Park, N.C. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10–7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. och Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. och Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. och Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. och Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. och Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. och Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127–132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. och Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346–370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09–7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. och Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13–31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. och Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. och Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. och Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. och Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. och Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. och Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563–79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (38).

Referensämne: Sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Falsk negativt: Ett ämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod när ämnet i själva verket är positivt eller aktivt.

Falskt positivt: Ett ämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod när ämnet i själva verket är negativt eller icke-aktivt.

Fara: Potentialen för skadliga verkningar på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (38).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll.

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde (”outlier”) är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (38).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M3

B.51. **HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): BrdU-ELISA**

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den första testmetoden (B.42) för bestämning av hudsensibilisering hos möss (LLNA-metoden, OECD:s testriktlinje 429) har reviderats (1 och kapitel B.42 i denna bilaga). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA och en översikt av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). I LLNA-metoden används radioisotopiskt tymidin eller jod för att mäta lymfocytproliferation och metoden har därför begränsad användning när det förekommer problem med att anskaffa, använda eller bortskaffa radioaktivitet. LLNA: BrdU-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) är en icke-radioaktiv modifikation av LLNA-testmetoden och i den används icke-radiomärkt 5-bromo-2-deoxiuridin (BrdU) (CAS-nummer 59-14-3) i ett ELISA-baserat testsystem för mätning av lymfocytproliferation. LLNA: BrdU-ELISA har validerats, granskats och rekommenderats av en internationell oberoende expertutvärderingspanel som konstaterade att den kan användas för att identifiera hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier, med vissa begränsningar (10) (11) (12). Testmetoden är avsedd för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Enligt kapitel B.6 i denna bilaga och i OECD:s testriktlinje 406 används test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (13). LLNA (kapitel B.42 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 429) och de två icke-radioaktiva modifikationerna LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 442 B) och LLNA: DA (kapitel B.50 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 442 A) ger fördelar jämfört med marsvinstest enligt B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) genom möjligheten att minska antalet djur och behandla dem på ett skonsammare sätt.

2. I likhet med LLNA används LLNA: BrdU-ELISA för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos-responsbedömning. Vidare gäller att de här metodernas förmåga att upptäcka hudsensibiliserande kemikalier utan att det behövs radiomärkning för DNA eliminerar risken för yrkesmässig exponering för radioaktivitet och problem rörande bortskaffning av avfall. Detta kan i sin tur ge möjlighet till ökad användning av möss för att upptäcka hudsensibiliserande ämnen, vilket ytterligare kan minska användningen av marsvin för att testa kemikaliers hudsensibiliserande potential (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13).

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA: BrdU-ELISA är en modifierad LLNA-metod för identifiering av kemikalier med potential att framkalla hudsensibilisering, med specifika begränsningar. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA: BrdU-ELISA alltid ska användas i stället för LLNA eller test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13), utan att metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse (10) (11). Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och

▼M3

kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Denna information bör övervägas för att kunna fastställa om LLNA: BrdU-ELISA-metoden är lämplig för testämnet (mot bakgrund av att metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och som stöd för valet av dos.

5. LLNA: BrdU-ELISA är en *in vivo*-metod, och därför kan man inte undvika användningen av djur för bedömning av sensibilisering genom allergisk kontakt. Metoden ger dock möjligheter att använda färre djur för detta ändamål i jämförelse med test på marsvin (B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13). Dessutom ger LLNA: BrdU-ELISA möjlighet till en betydligt skonsammare behandling av djuren för testning av sensibilisering genom allergisk kontakt, eftersom man med LLNA: BrdU-ELISA, till skillnad från B.6 och OECD:s testriktlinje 406, inte behöver framkalla provokationsinducerade dermala hypersensitivitetsreaktioner. Dessutom behöver adjuvant inte användas, vilket är fallet vid maximeringstest på marsvin (kapitel B.6 i denna bilaga, 13). LLNA: BrdU-ELISA är därför en mindre plågsam metod för djuren. Trots fördelarna med LLNA: BrdU-ELISA i jämförelse med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) finns det vissa begränsningar som gör att man kanske måste använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (t.ex. testning av vissa metaller, falska positiva resultat med vissa hudirriterande ämnen (såsom vissa ytaktiva ämnen (6) (1 och kapitel B.42 i denna bilaga), testämnets löslighet)). Dessutom kan det för kemiska klasser eller ämnen som har funktionella grupper som påvisats agera som potentiella störfaktorer (15) vara nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406 (13)). Det rekommenderas att de begränsningar som anges för LLNA (1 och kapitel B.42 i denna bilaga) även ska gälla för LLNA: BrdU-ELISA (10). Utöver sådana identifierade begränsningar bör LLNA: BrdU-ELISA gå att använda för testning av alla kemikalier, utom om en kemikalie förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA: BrdU-ELISA-metodens exakthet. Dessutom bör överväganden göras rörande möjligheten till positiva gränsresultat, när man erhåller värden för stimulationsindex mellan 1,6 och 1,9 (se punkterna 31–32). Detta grundar sig på valideringsdatabasen med 43 ämnen och användning av SI ≥ 1,6 (se punkt 6) för vilka LLNA: BrdU-ELISA ger korrekt identifiering av alla 32 sensibiliserande ämnen enligt LLNA men felaktig identifiering av 2 av 11 icke-sensibiliserande ämnen enligt LLNA med SI-värden mellan 1,6 och 1,9 (dvs. på gränsen till positivt) (10). Eftersom samma datauppsättning användes för att fastställa SI-värdena och beräkna testmetodens förutsägande egenskaper kan dock de angivna resultaten vara en överuppskattning av de faktiska förutsägande egenskaperna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA: BrdU-ELISA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara ≥ 1,6 för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. De förfaranden som beskrivs

▼M3

här grundar sig på mätning av BrdU-innehållet för att indikera ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna. BrdU är ett analogt ämne med tymidin och inkorporeras på liknande sätt in i DNA i prolifererande celler. Inkorporeringen av BrdU mäts med ELISA med hjälp av en antikropp som är specifik för BrdU som också märks med peroxidas. När substratet tillsätts reagerar peroxidas med detta och det uppstår en färgad produkt som kvantifieras vid en specifik absorbans genom avläsning av en mikrotiterplatta.

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. Valideringsstudier för LLNA: BrdU-ELISA genomfördes uteslutande med stammen CBA/JN som därför anses vara den stam som är att föredra (10) (12). I testet används unga vuxna mushonor som inte har fött ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA: BrdU-ELISA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (16), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (öronmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets förhållanden i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har några synliga hudskador.

Förberedelse av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel så att alla extraherbara beståndsdelar för testning fås ut. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet har tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne och en respons med välkarakteriserad styrka. Användningen av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet till bedömning av reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Vissa tillsynsmyndigheter kräver också att positiv kontroll används för varje undersökning, och därför uppmuntras laboratorierna att

▼M3

samråda med relevanta myndigheter innan testning med LLNA: BrdU-ELISA inleds. Likaså uppmuntras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur för att uppfylla krav som kan uppstå från användningen av periodisk positiv kontroll (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA: BrdU-ELISA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) som är större eller lika med 1,6 i förhållande till negativa kontrollgruppen. Dosen av den positiva kontrollkemikalien ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (t.ex. SI > 14 anses vara för högt värde). Rekommenderade ämnen för positiv kontroll är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS-nummer 101-86-0) och 25-procentig eugenol (CAS-nummer 97-53-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller de ovan angivna kriterierna användas, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.

12. Även om användning av en parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen i laboratorier som regelbundet genomför LLNA: BrdU-ELISA (dvs. minst en gång i månaden) och som har en etablerad historisk databas över positiv kontroll som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från positiva kontroller. Tillräcklig kvalitet hos LLNA: BrdU-ELISA kan framgångsrikt påvisas genom att enhetliga positiva resultat erhålls från den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (dvs. kortare än ett år).

13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas när det sker ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.

14. Man bör vara medveten om att beslut om att använda positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningsresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska undersökningarna med positiv kontroll. Om man t.ex. får falska negativa resultat vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet med positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga användning av färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att färre möss kan användas (17).

15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar en enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym)), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även behövs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (18). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat kontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.

▼M3

16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av testämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:

— Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.

— Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Stödjande data från LLNA: BrdU-ELISA.

— Stödjande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet bör användas. Dessutom används en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en grupp för positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord, enligt laboratoriets principer för överväganden enligt punkterna 11–15). Man bör överväga flera upprepade doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.

18. Doser och vehikel väljs på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna 2 och 19. Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör övervägas vid valet av de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (19) (20 och kapitel B.4 i denna bilaga). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt att först genomföra ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).

19. Vehikeln får inte störa eller snedvrida testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet för att få högsta möjliga koncentration samtidigt som man får en lösning/suspension som är lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (6) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att se till att hydrofila testämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubiliserande ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.

▼M3

20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i vehikelkontrollgruppen (se punkt 33). Dessutom kan möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen endast övervägas utifrån att data samlas in individuellt per djur (17). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas per individuellt djur. Regelbunden insamling av individuella data per djur ger en fördel rörande djurens välbefinnande eftersom upprepad testning undviks som annars skulle behövas om testämnesresultat som ursprungligen har samlats in på ett visst sätt (t.ex. genom poolade djurdata) måste granskas senare av tillsynsmyndigheter som har avvikande krav (såsom data per individuellt djur).

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns tillgång till information för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör ett preliminärt screeningtest genomföras för att definiera den lämpliga dosnivån för test i LLNA: BrdU-ELISA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att få vägledning för valet av högsta dosnivå i huvudundersökningen, i fall där information saknas om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.

22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som vid den huvudsakliga LLNA: BrdU-ELISA-undersökningen, utom att man inte utvärderar proliferationen i lymfnoderna och man kan använda färre djur i dosgruppen. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 6). För varje mus observeras båda öronen för hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (20 och kapitel B.4 i denna bilaga). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen) och på dag 6. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 6 genom vägning av en öronbit som stansas ut efter skonsam avlivning. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom hudrodnadsgradering ≥ 3 och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningsdagarna (21) (22). Den högsta dos som väljs för huvudundersökningen blir nästa lägre dos i den preliminära screeningens koncentrationsserie (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Grader av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2

▼M3

Observation	Gradering
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. För identifiering av irriterande ämnen med LLNA har man utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (21) (22) också använt statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Dock så gäller att även om statistiskt signifikanta ökningar kan inträffa när ökningen av örontjocklek är mindre än 25 %, har dessa inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (25) (26) (27) (28) (29).

24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (30) när de används som del av en helhetsbedömning och kan således ge indikation om den högsta dosnivå som ska användas i huvudundersökningen: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, minskning av kroppsvikten med mer än 5 % från dag 1 till dag 6 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på svår smärta och lidande ska avlivas skonsamt (31).

Huvudundersökningens försöksschema

25. För testet används följande försöksschema:

— *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikten samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera 25 µl lämpligt utspätt testämne, ren vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen utförd positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer när det gäller punkterna 11–15) på båda öronens baksida.

— *Dagarna 2 och 3:* Upprepa appliceringen enligt dag 1.

— *Dag 4:* Ingen behandling.

— *Dag 5:* Injicera 0,5 ml (5 mg/mus) BrdU-lösning (10 mg/ml) intraperitonealt.

— *Dag 6:* Registrera vikten för varje djur och eventuella kliniska observationer. Avliva djuren skonsamt cirka 24 timmar efter BrdU-injektionen. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje musöra och behandla separat i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) för varje djur. Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (17). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

▼M3

Beredning av cellsuspensioner

26. För varje mus bereds en suspension med enskilda celler av lymfnodsceller (LNC) från de bilateralt bortskurna lymfnoderna genom försiktig mekanisk sönderdelning med hjälp av ett nät av rostfritt stål (200 mesh) eller annan godkänd teknik för beredning av en suspension med enskilda celler (t.ex. sönderdelning av lymfnoderna i en engångsmortel av plast åtföljt av passage genom ett nylonnät (70 mesh)). Förfarandet för beredning av LNC-suspensionen är kritiskt för detta test och därför bör varje laboratorium se till att färdigheterna övas in på förhand. Observera att lymfnoderna i den negativa kontrollgruppens djur är små, och det är viktigt att iaktta stor försiktighet för att undvika störande inverkan på SI-värdena. För varje fall ska målvolymen hos LNC-suspensionen justeras till en bestämd optimerad volym (cirka 15 ml). Den optimerade volymen baserar sig på att man för den negativa kontrollen ska få en genomsnittsabsorbans inom 0,1–0,2.

Bestämning av cellproliferation (mätning av BrdU-innehållet i lymfocyternas DNA)

27. BrdU mäts i ELISA med hjälp av ett kommersiellt tillgängligt kit (t.ex. Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland, katalognummer 11 647 229 001). Mätningen går i huvuddrag ut på att 100 µl LNC-suspension överförs till brunnarna i en flatbottnad mikrotiterplatta i tre uppsättningar. Efter fixering och denaturering av LNC tillsätts anti-BrdU-antikropp till varje brunn och tillåts reagera. Därefter avlägsnas anti-BrdU-antikroppen genom tvättning och substratlösning tillsätts så att kromogen kan bildas. Därefter mäts absorbansen vid 370 nm med en referensvåglängd på 492 nm. Under alla omständigheter gäller att testningsbetingelserna bör optimeras (se punkt 26).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

28. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt och individuellt per mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion så att berörda djur kan avlivas (31).

Kroppsvikt

29. Enligt det som anges i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid försökets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

30. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som genomsnittet för stimulationsindex. Stimulationsindex erhålls genom att genomsnittligt värde för BrdU-märkningsindex/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt värde för BrdU-märkningsindex för kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel. Det genomsnittliga stimulationsindexet för vehikelkontrollgrupperna har då värdet 1.

BrdU-märkningsindex definieras enligt följande:

$$\text{BrdU-märkningsindex} = (ABS_{em} - \text{ABS blank}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS blank}_{ref})$$

där em = emissionsvåglängd och ref = referensvåglängd.

▼M3

31. Vid bedömning av resultaten anses ett resultat vara positivt när SI ≥ 1,6 (10). Man kan dock även använda styrkan på dos-responsförhållandets samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränsresultat (dvs. SI-värde mellan 1,6 och 1,9) ska anses vara positivt (3) (6) (32).

32. För ett gränsresultat för positiv respons där SI-värdet ligger mellan 1,6 och 1,9 vill man kanske beakta tilläggsinformation såsom dos-responsförhållandet, tecken på systemisk toxicitet eller särskilt kraftig irritation och, där det är lämpligt, statistisk signifikans tillsammans med SI-värden för att bekräfta att resultaten är positiva (10). Likaså bör man beakta testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna förhållandet mellan dos och respons. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (4).

33. När data samlas in per enskild mus kan man göra en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden för dos-responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos-responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel). De statistiska analyserna kan inbegripa t.ex. linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos-responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av en lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanförliggande värden).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Data sammanställs i tabellform med angivelse av värdena för BrdU-märkningsindex per djur, gruppens medelvärde för BrdU-märkningsindex per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollkemikalier:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer, om tillgängligt, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel:

— Identifieringsdata (renhet, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts).

— Motivering för val av vehikel.

▼M3

Testdjur:

— CBA-mössens ursprung.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antal djur och deras ålder.

— Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— ELISA-satsens ursprung, satsnummer och kvalitetsförsäkran/kvalitetskontrolldata (antikroppskänslighet samt detektionsspecificitet och -gräns).

— Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.

— Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).

— Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.

— Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll:

— Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, även information om testämne, koncentration och vehikel.

— Data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och parallella negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) för testningslaboratoriet.

— Om försöket inte har omfattat parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat:

— Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd skonsam avlivning samt medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.

— Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.

— En tabell med BrdU-märkningsindex per mus och SI-värden per behandlingsgrupp.

— Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för BrdU-märkningsindex per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp.

▼M3

— Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen mellan djuren i testämnesgruppen och kontrollgruppen.

— Förhållandet mellan dos och respons.

— Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten:

— En kort kommentar om resultaten, dos-responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. och Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. och Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. och Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. och Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99–4494. Research Triangle Park, N.C. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10–7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. och Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. och Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. och Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09–7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. och Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. och Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. och Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. och Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. och Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(28) Vohr, H.W. och Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. och Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm.

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. och Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (33).

Referensämne: Ett sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Falsk negativt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod när ämne i själva verket är positivt eller aktivt (33).

Falskt positivt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod när ämne i själva verket är negativt eller icke-aktivt (33).

Fara: Potentialen för skada på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämne. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (33).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll (33).

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde (”outlier”) är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (33).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

B.52 AKUT INHALATIONSTOXICITET – AKUT TOXICITETSKLASS

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 436 (2009). Den första testriktlinjen för akut inhalation 403 antogs 1981, och har sedan dess reviderats (se kapitel B.2 i denna bilaga (1)). Utvecklingen av en inhalationsmetod för akut toxicitetsklass (ATC) (2) (3) (4) ansågs lämplig efter antagandet av den reviderade orala ATC-metoden (kapitel B.1 i denna bilaga) (5). En retrospektiv resultatbedömning av ATC-testmetoden för akut toxicitet vid inhalation visade att metoden är lämplig för klassificerings- och märkningsändamål (6). ATC-testmetoden för inhalation medger användningen av seriella steg med fasta målkoncentrationer för att rangordna en testkemikalies toxicitet. Dödlighet används som viktigaste endpoint, dock, bör djur med svår smärta och som lider, eller är döende avlivas skonsamt för att minska lidandet. Vägledning om humana endpoints finns i OECD:s vägledningsdokument nr 19 (7).

2. I vägledningsdokumentet om akut inhalationstoxicitet (GD 39) (8) kan man få vägledning om den här beskrivna testmetodens genomförande och tolkning.

3. Definitioner som används inom ramen för den här testmetoden finns i tillägg 1 och i GD 39 (8).

4. Testmetoden ger information om farliga egenskaper och låter testkemikalien rangordnas och klassificeras i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering av kemikalier som orsakar akut toxicitet (9). Om punktskattningar av LC50-värden eller koncentration-responsanalyser krävs, är kapitel B.2 i denna bilaga (1) den lämpligaste testmetoden. Ytterligare vägledning om val av testmetod finns i GD 39 (8). Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av specialmaterial såsom svårlösliga isometriska eller fibrösa material, eller avsiktligt tillverkade nanomaterial.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Innan man överväger ett test i enlighet med den här testmetoden bör testlaboratoriet överväga all information avseende testkemikalien, inklusive befintliga studier vars data visar att man inte behöver göra fler tester, för att minska användningen av djur. Information som kan underlätta val av lämplig art, stam, kön, exponeringssätt och lämplig testkoncentration är ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultat från andra eventuella in vitro- eller in vivo-studier avseende toxicitet; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Koncentrationer som förväntas orsaka svår smärta eller lidande, beroende på frätande ([1]) eller allvarligt irriterande verkningar bör inte testas med denna testmetod (se GD 39 (8)).

([1]) Korrosivitetsbedömningen kan baseras på ett expertutlåtande på grundval av bevis såsom erfarenhet från människor eller djur, befintliga (in vitro) data, dvs. avsnitt B.40 (10), B.40 a (11) i denna bilaga eller OECD TG 435 (12), pH-värden, information från liknande kemikalier eller andra relevanta data.

▼M4

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Testprincipen bygger på ett stegvist förfarande som ger tillräcklig information om akut toxicitet vid inhalation av testkemikalien under en exponeringsperiod på 4 timmar för att möjliggöra dess klassificering. Andra exponeringstider kan gälla för specifika regulatoriska ändamål. För varje definierat koncentrationssteg ska 3 djur av vardera kön testas. Beroende på mortaliteten och/eller förekomsten av döende djur kan steg 2 vara tillräckligt för att möjliggöra bedömning av testkemikaliens akuta toxicitet. Om det saknas belägg för att det ena könet är mer mottagligt än det andra kan testet fortsätta med det mer mottagliga könet. Resultatet från det föregående steget kommer att bestämma det följande steget så att

   a) ingen ytterligare testning behövs,

   b) testning görs av tre djur per kön, eller

   c) testning görs av 6 djur av det mer mottagliga könet dvs. den undre gränsen för uppskattningar av toxisk klass som bör baseras på 6 djur per testkoncentrationsgrupp, oberoende av kön.

7. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt och medtas i tolkningen av testresultaten på samma sätt som de som avled under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecknen på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i vägledningsdokument nr 19 om humana endpoints (7).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

8. I testet används friska unga vuxna djur av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta och motiveringar ska ges om andra arter används.

Förberedelse av djuren

9. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På exponeringsdagen bör djuren vara unga vuxna 8 till 12 veckor gamla och kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet för eventuellt tidigare exponerade djur i samma ålder. Djuren väljs ut slumpmässigt, förses med märkning så att de kan identifieras individuellt. Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten. Djuren bör också acklimatisera sig till testutrustningen en kort period före testet, eftersom detta minskar den stress som en ny miljö innebär.

Djurhållning

10. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala

▼M4

respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

11. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och testets ändamål. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringen, deras principer och särskilda för- och nackdelar finns beskrivna i GD 39 (8).

EXPONERINGSBETINGELSER

Administrering av koncentrationer

12. En fast exponeringstid på 4 timmar, exklusive jämviktstid, rekommenderas. Andra varaktigheter kan behövas för att uppfylla specifika krav, dock bör motivering ges i studierapporten (se GD 39 (8)). Djur som exponeras i helkroppskammare ska inhysas individuellt för att hindra intagandet av testkemikalien på grund av skötsel av de andra djuren i buren. Inget foder ska ges under exponeringsperioden. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

13. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas.

Partikelstorleksfördelning

14. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 4 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (8) (13) (14). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard bör en sakkunnig bedömning göras om detta inte kan uppnås. Till exempel kan metalldimma understiga denna standard, och laddade partiklar, fibrer och hygroskopiska material (som ökar i storlek i den fuktiga miljön i andningsvägarna) kan överstiga denna standard.

▼M4

Beredning av testkemikalie i en vehikel

15. En vehikel kan användas för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien i atmosfären. I regel bör vatten ha företräde. För att uppnå den erfordrade partikelstorleksfördelningen bör partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer, emellertid bör försiktighet iakttas så att man inte sönderdelar eller förändrar testkemikalien. I de fall där mekaniska processer tros ha förändrat testkemikaliens sammansättning (t.ex. extrem temperatur från friktionen vid överdriven fräsning), bör testkemikaliens sammansättning verifieras analytiskt. Det är viktigt att testkemikalien inte förorenas. Det är inte nödvändigt att testa icke-spröda granulära material som avsiktligt är sammansatta så att de inte kan inhaleras. Ett friktionstest ska användas för att visa att inga inandningsbara partiklar bildas när det granulära materialet hanteras. Om ett friktionstest bildar inandningsbara partiklar ska ett test utföras avseende inhalationstoxicitet.

Kontrolldjur

16. Det är inte nödvändigt med en parallell negativ (luft-) kontrollgrupp. Om en annan vehikel än vatten används för att skapa testatmosfären ska en vehikelkontrollgrupp endast användas när historiska data om inhalationstoxicitet inte är tillgängliga. Om en toxicitetsstudie av en testkemikalie som har beretts i en vehikel inte påvisar någon toxicitet, framgår det att vehikeln är icke-toxisk vid den testade koncentrationen, och därmed finns det inget behov av en vehikelkontroll.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

17. Luftflödet genom kammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen av testatmosfärens koncentration (eller stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta atmosfärsskapande dynamiska parametrar. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare i de fall där luftflödet genom exponeringssystemet är otillräckligt för att ge ett dynamiskt flöde i testkemikalieatmosfären. Det finns föreskrivna metoder som kan användas för att visa att återandning inte sker under de valda processförhållandena (8) (15). Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att dessa standarder inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

18. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsområden, gäller både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas och registreras minst tre gånger under tidsperioder upp till 4 timmar, och varje timme vid kortare tidsperioder. Den relativa fuktigheten bör företrädesvis upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar) eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

▼M4

Testkemikalie: nominell koncentration

19. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom kammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringseffektivitet, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: faktisk koncentration

20. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliens koncentration i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller av icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden. Målkoncentrationerna och de nominella och faktiska koncentrationerna ska finnas med i undersökningsrapporten, men endast de faktiska koncentrationerna används i de statistiska analyserna för att beräkna värdena för dödlig koncentration.

21. En sats av testkemikalien ska användas, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

22. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt och övervakas kontinuerligt och/eller intermittent beroende på analysmetoden. När intermittent provtagning används bör prover på kammaratmosfären tas minst två gånger under en fyratimmarsstudie. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, kan ett prov tas under hela exponeringsperioden. Om märkta prov-till-prov-fluktationer förekommer, bör man för de påföljande koncentrationerna som ska testas ta fyra prover per exponering. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor, och inte med mer än ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tiden tills kammaren når jämvikt (t_{95}) bör beräknas och registreras. Varaktigheten för en exponering spänner sig över den tid som testkemikalien genereras och tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå t_{95}. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (8).

▼M4

23. För mycket komplexa blandningar bestående av ångor/gaser och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning). Varje fas kan bete sig annorlunda i en inhalationskammare så åtminstone en indikatorsubstans ska väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva substansen i blandningen för varje fas (ånga/gas och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i den totala blandningen rapporteras, inte bara för den aktiva ingrediensen eller komponenten (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (8).

Testkemikalie: partikelstorleksfördelning

24. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst två gånger under varje 4-timmarsexponering med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare. Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor eller det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela försöket. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (8)). Om likvärdigheten kan påvisas i ett tidigt skede av försöket kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att exponeringen måste upprepas. Partikeldimensionering bör utföras för ångorna, om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas (se punkt 14).

PROCEDUR

Huvudtest

25. Tre djur per kön eller sex djur av det mer mottagliga könet används för varje steg. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. Koncentrationsnivån som ska användas som startdos väljs från en av fyra fasta nivåer, och nivån på utgångskoncentrationen bör vara den som mest sannolikt producerar toxicitet hos vissa av de doserade djuren. Testprogrammet för gaser, ångor och aerosoler (inkluderad i tilläggen 2–4) representerar testningen med avslutningsvärdena för CLP-kategorierna 1–4 (9) för gaser (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (tillägg 2), för ångor (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (tillägg 3) och för aerosoler (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (tillägg 4). Kategori 5, som inte är genomförd i förordning (EG) nr 1272/2008 (9) avser koncentrationer över respektive gränskoncentration. För varje startkoncentration gäller respektive testprogram. Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur följer testproceduren de angivna pilarna tills en kategorisering kan göras.

26. Tidsintervallet mellan exponeringsgrupperna fastställs genom start, varaktighet och allvarlighetsgrad för tecknen på toxicitet. Exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå ska fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att de tidigare testade djuren överlever. En period på tre eller fyra dagar mellan exponeringarna för varje koncentrationsnivå rekommenderas för observationen av fördröjd toxicitet. Tidsintervallet kan anpassas på lämpligt sätt, t.ex. i händelse av ofullständiga responser.

▼M4

Toleranstest

27. Toleranstestet används när testkemikalien är känd eller förväntas vara praktiskt taget icke-toxisk dvs. framkallar endast en toxisk reaktion över den reglerade gränskoncentrationen. Information om testkemikaliens toxicitet kan erhållas genom kunskap om liknande testade substanser eller liknande blandningar, med beaktande av identitet och procentandel av komponenter kända för att ha en signifikant toxicitet. I situationer när det finns lite eller ingen information om dess toxicitet, eller testkemikalien förväntas vara toxisk, ska huvudtestet utföras (ytterligare vägledning finns i GD 39 (8)).

28. Enligt det normala förfarandet exponeras tre djur per kön, eller sex djur av det mer mottagliga könet för en koncentration av respektive 20 000 ppm för gaser, 20 mg/l för ångor och 5 mg/l för damm/ånga (om möjligt), vilket fungerar som toleranstestet för denna testmetod. När man testar aerosoler bör det primära målet vara att uppnå en andningsbar partikelstorlek (dvs. en MMAD på 1–4 μm). Det är möjligt för de flesta kemikalier med en koncentration på 2 mg/l. Testning av aerosoler med högre än 2 mg/l ska endast göras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås [se GD 39 (8)]. I enlighet med GHS (16), avrådes testning över en gränskoncentration på grund av djurskyddsskäl. Testning i GHS-kategori 5 (16), som inte är genomförd i förordning (EG) nr 1272/2008 (9), ska endast övervägas om det finns en stor sannolikhet för att resultaten från ett sådant test har en direkt relevans för skydd av människors hälsa, och motivering lämnas i studierapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig användning av djur ska ett test genomföras utan djur före toleranstestet, för att se till att förhållandena i kammaren kan uppnås för ett toleranstest.

OBSERVATIONER

29. Djuren bör ofta observeras kliniskt under exponeringsperioden. Efter exponeringen ska kliniska observationer göras minst två gånger på dagen för exponeringen, eller oftare om djurens respons på behandlingen indikerar det, och därefter minst en gång per dag under en period av 14 dagar. Observationstidens längd är inte fast, utan bör bestämmas utifrån art och tidpunkt för de första kliniska tecknen samt längden på återhämtningsperioden. De tillfällen då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om tecknen på toxicitet visar en tendens att fördröjas. Alla observationer registreras systematiskt med individuella registreringar för varje djur. Djur som påträffas döende och djur som visar tecken på uppenbar smärta och/eller svårt ihållande lidande ska avlivas skonsamt av djurskyddsskäl. Försiktighet bör iakttas vid utförande av undersökningar för kliniska tecken på toxicitet med djur som ser dåliga ut och har övergående respiratoriska förändringar till följd av exponeringsförfarandet, inte misstas för behandlingsrelaterade verkningar. Principerna och kriterierna som finns sammanfattade i vägledningsdokumentet om humana endpoints bör tas i beaktande (7). När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

▼M4

30. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i bur och päls, ögon och slemhinnor, samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet, samt kroppsmotorik och beteendemönster. Om möjligt bör eventuella skillnader mellan lokala och systematiska effekter noteras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning.

Kroppsvikt

31. Vikten hos individuella djur bör registreras en gång under acklimatiseringsperioden på exponeringsdagen innan exponeringen (dag 0), och åtminstone dag 1, 3 och 7 (och därefter varje vecka), och vid tidpunkten för när döden eller avlivningen inträffar om dag 1 överskrids. Kroppsvikt är en erkänt viktig indikator för toxicitet och djur som uppvisar en ihållande minskning på ≥ 20 % jämfört med värden från förstudien bör noggrant övervakas. Djur som överlever vägs och avlivas skonsamt i slutet av perioden efter exponeringsperioden.

Patologi

32. Alla försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl bör obduceras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur har upptäckts, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

33. Ytterligare undersökningar inklusive a priori genom beräkning kan anses utöka studiens tolkningsvärde, såsom mätning av lungvikt hos överlevande råttor, och/eller ge prov på irritation genom mikroskopundersökningen av luftvägarna. Undersökta organ kan innefatta sådana som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt 24 timmar eller mer, och organ kända för, eller som förväntas påverkas. Mikroskopisk undersökning av hela luftvägarna kan ge användbar information om testkemikalier som är reaktiva med vatten, såsom syror och hygroskopiska testkemikalier.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Individuella data om kroppsvikt och obduktionsfynd bör tillhandahållas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd.

▼M4

Testrapport

35. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

— Art/stam som används och motivering för användning av andra arter än råtta.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Beskrivning av inhalationskammaren inklusive mått och volym.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla, behandling av luft som tillförs/extraheras och system som används för luftkonditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i systemet (helkropp).

— Temporal homogenitet/stabilitet för testatmosfären.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Information om utrustningen som används för att mäta syre och koldioxid, i förekommande fall.

▼M4

— Tid som krävs för att uppnå jämvikt i inhalationskammaren (t_{95}).

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grunden för valet av målkoncentration i huvudstudien.

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testblandningar som insamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en kan analyseras separat.

— Alla luftkoncentrationer ska rapporteras i viktenheter (t.ex. mg/l, mg/m^3, etc.), enheter för volym (t.ex. ppm, ppb) kan också redovisas inom parantes.

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om testkemikalieberedning, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta substanser eller för att bereda testlösningar. I de fall där mekaniska processer kan ha förändrat testkemikaliens sammansättning ska analysresultaten inkluderas för att bekräfta dess sammansättning.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som använts och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad och effekternas varaktighet).

— Den individuella kroppsvikten hos djuren som samlats in på studiedagar, datum och tid för dödsfall som inträffat före planerad avlivning, tidsförlopp för första tecken på toxicitet och om dessa var reversibla för varje enskilt djur.

▼M4

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

— CLP-kategoriklassificering och LC_{50}-avslutningsvärde;

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av använda metoder för att uppfylla kriterierna för den här testmetoden, t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör åtgärdas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

— En förklaring bör ges om det fanns behov av att offra djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (7).

LITTERATUR

(1) Kapitel B.2 i denna bilaga, akut toxicitet (inhalation).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129–134.

(5) Chapter B.1 i denna bilaga, akut inhalationstoxicitet - metod för akut toxcicitesklass (ATC).

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Finns på [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Finns på [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Finns på [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

(10) Kapitel B.40 i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).

(11) Kapitel B.40 a i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: test med modell av human hud.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Finns på [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol.27: 160–167.

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Finns på [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Förfarande för varje startkoncentration för gaser (ppm/4 h)

Allmänna anmärkningar ([1])

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 2 a: Startkoncentration är 100 ppm

Tillägg 2 b: Startkoncentration är 500 ppm

Tillägg 2 c: Startkoncentration är 2 500 ppm

Tillägg 2 d: Startkoncentration är 20 000 ppm

Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

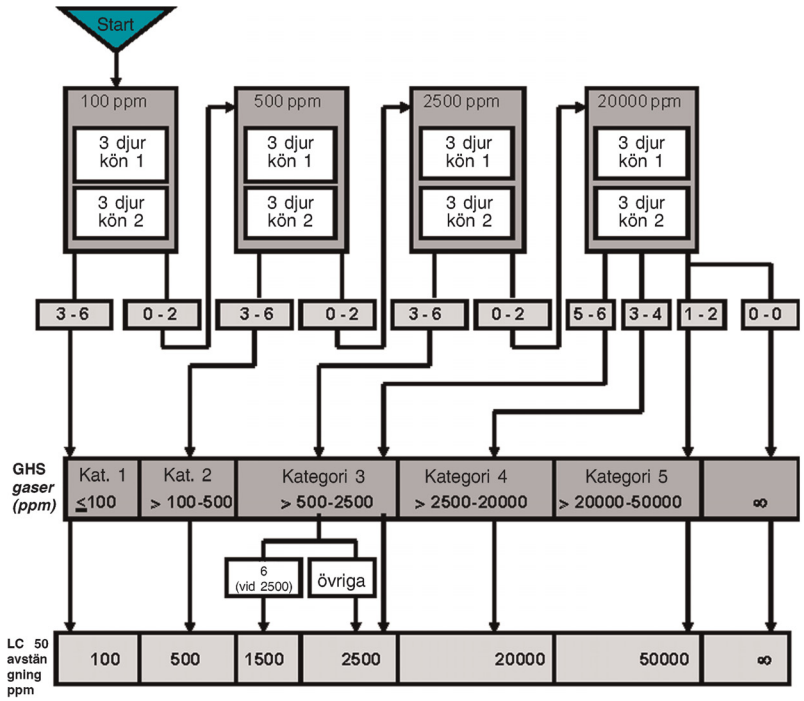
([1]) I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

▼M4

Tillägg 2a

Akut inhalations toxicitet:

Tes tförfarande med en s tartkoncentration av 100 ppm/4 h för gas er



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet per steg

— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

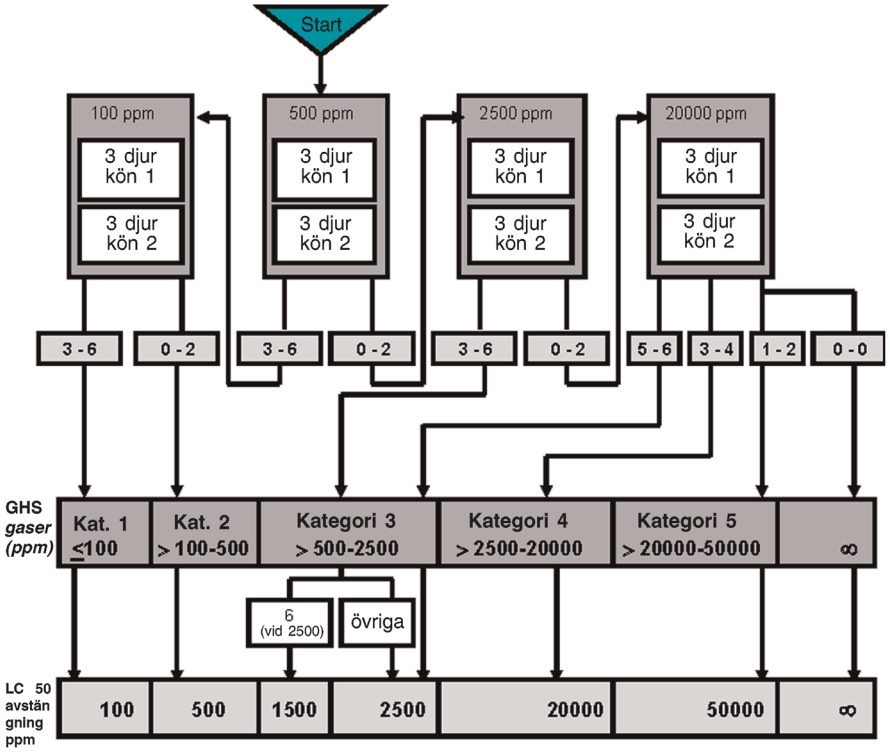
— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 2b

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 500 ppm/4 h för gaser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet per steg

— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

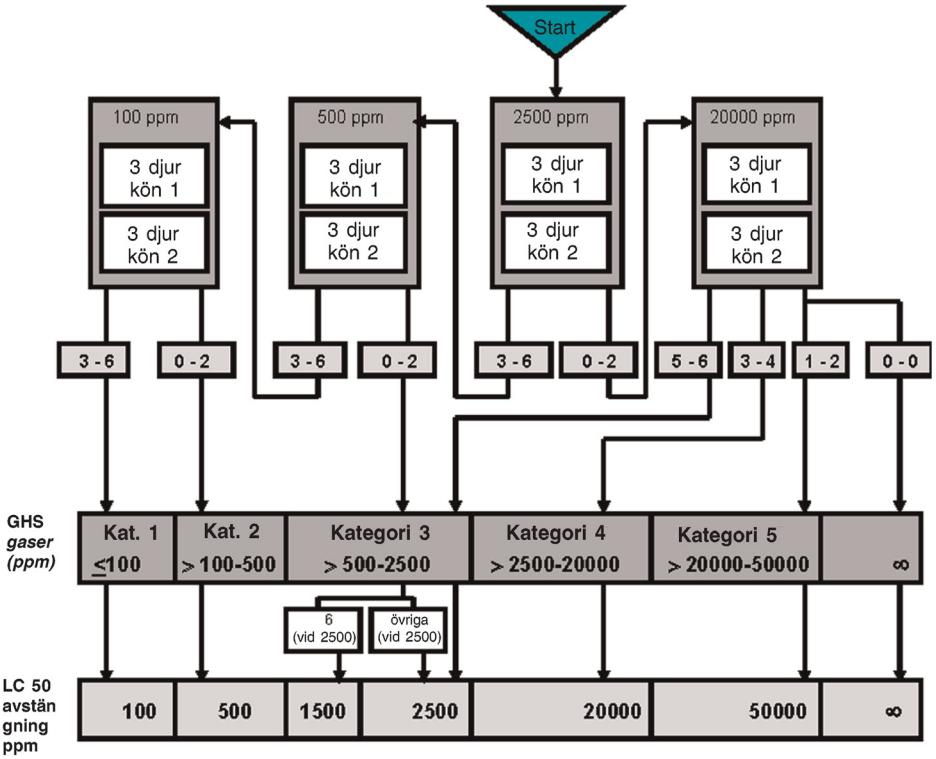
— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 2c

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 2 500 ppm/4 h för gaser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0–6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

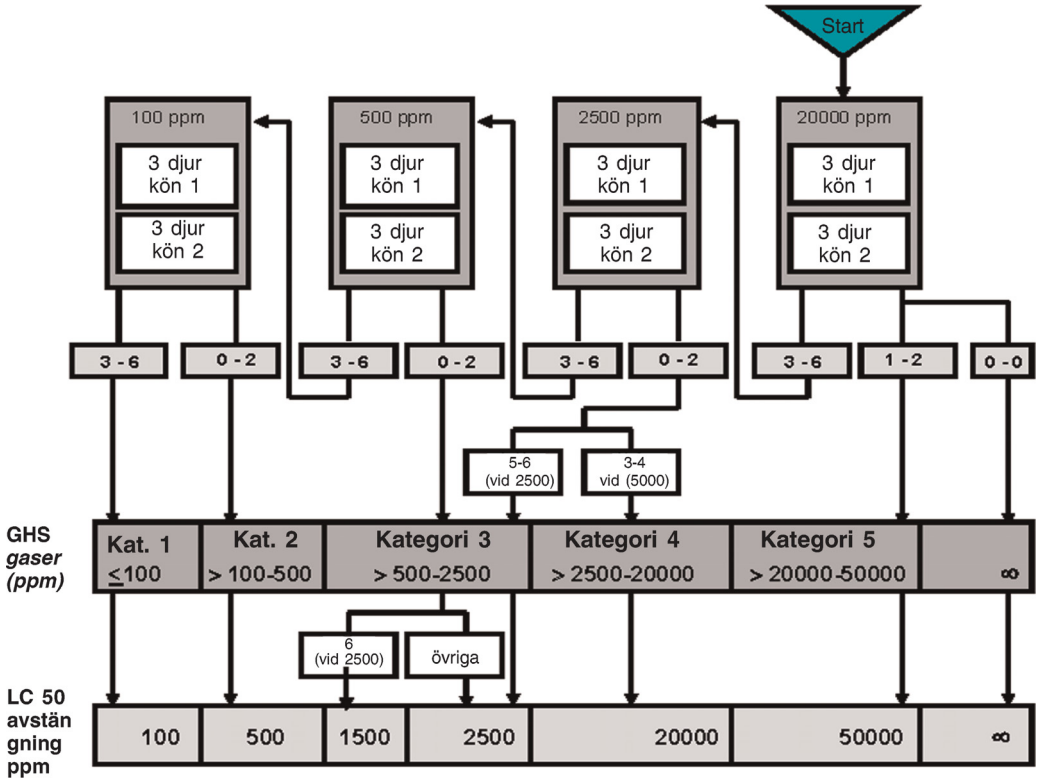
— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 2d

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 20 000 ppm/4 h för gaser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3

Förfarande för varje startkoncentration för ångor (mg/l/4 h)

Allmänna anmärkningar ([1])

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 3 a: Startkoncentration är 0,5 mg/l

Tillägg 3 b: Startkoncentration är 2,0 mg/l

Tillägg 3 c: Startkoncentration är 10 mg/l

Tillägg 3 d: Startkoncentration är 20 mg/l

Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

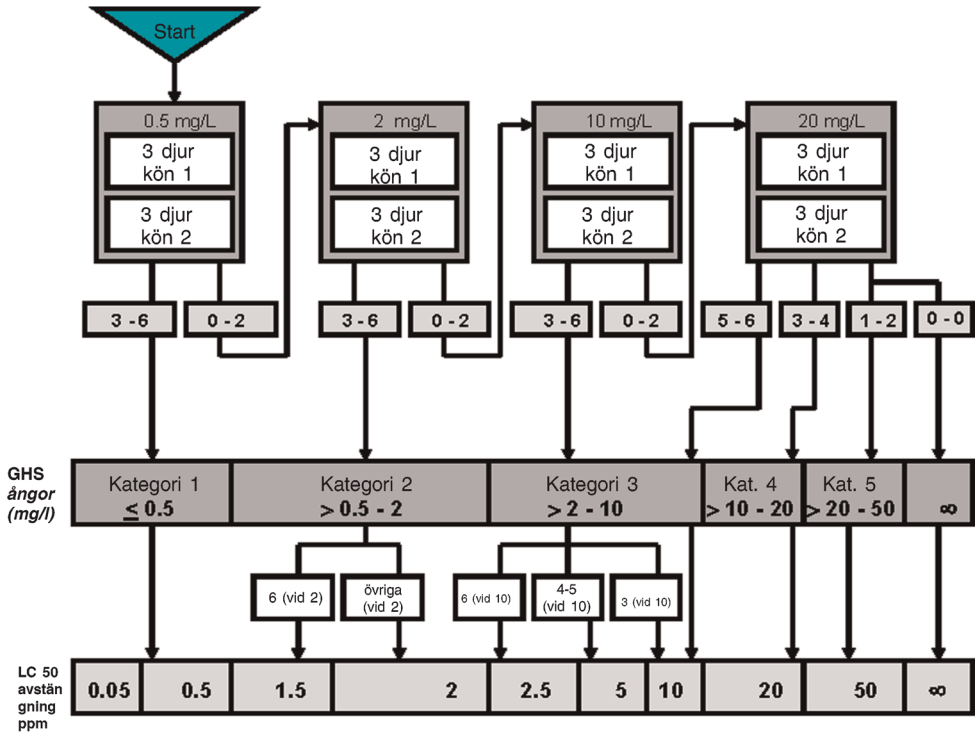
([1]) I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

▼M4

Tillägg 3a

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,5 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassificerad

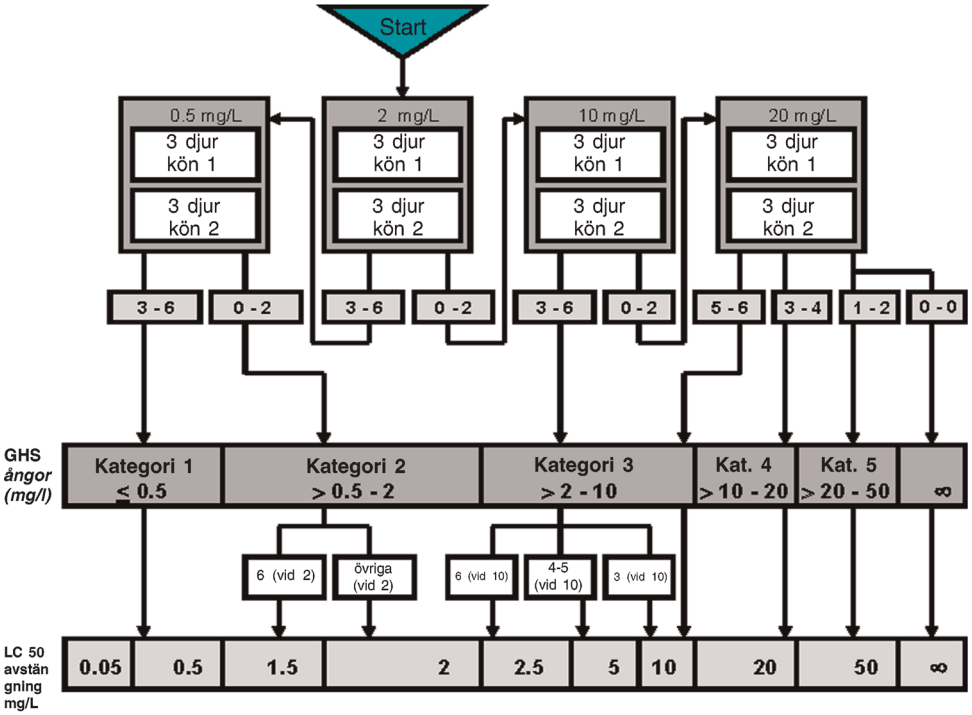
— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3b

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 2 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0–6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

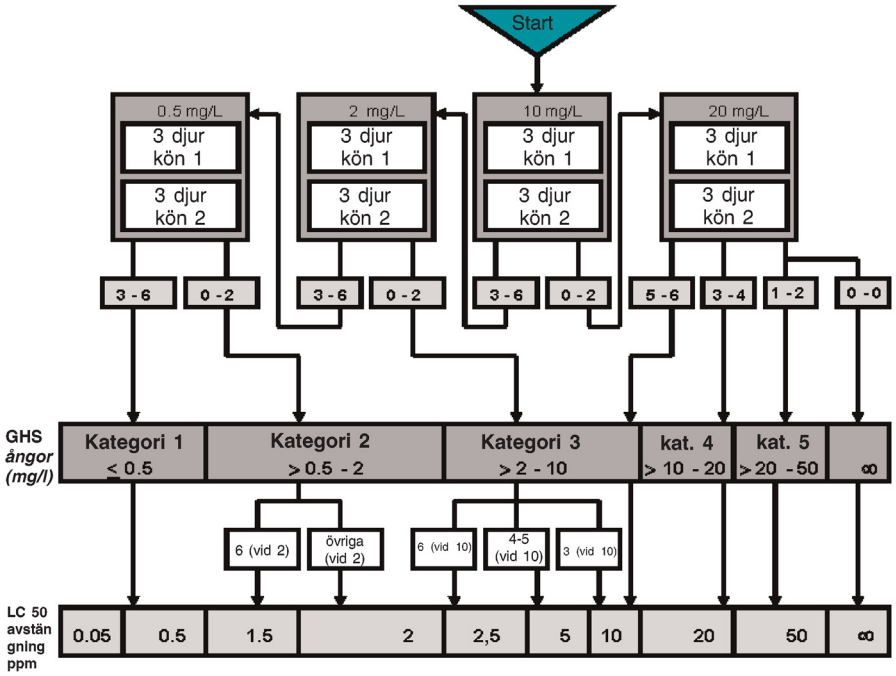
— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3c

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 10 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0–6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

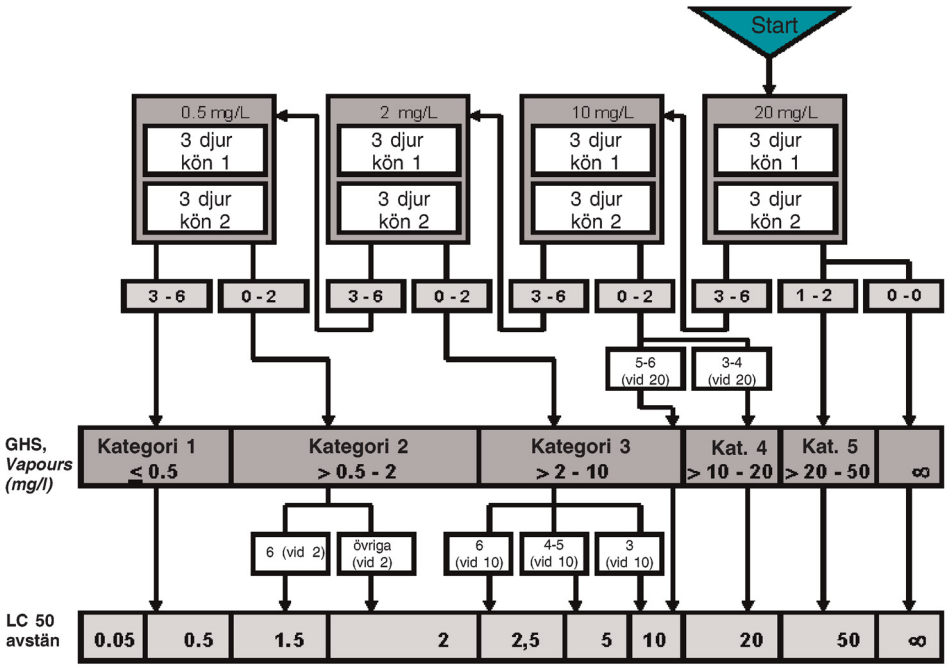
— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3d

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 20 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4

Förfarande för varje startkoncentration för aerosoler (mg/l/4 h)

Allmänna anmärkningar ([1])

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 4 a: Startkoncentration är 0,05 mg/l

Tillägg 4 b: Startkoncentration är 0,5 mg/l

Tillägg 4 c: Startkoncentration är 1 mg/l

Tillägg 4 d: Startkoncentration är 5 mg/l

Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

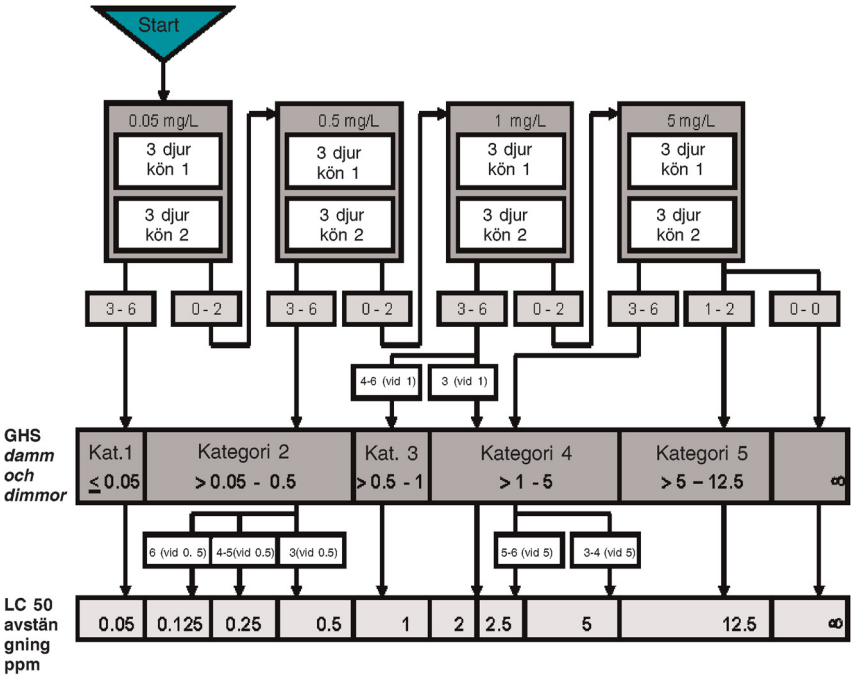
([1]) I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

▼M4

Tillägg 4a

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,05 mg/L/4h för ångor



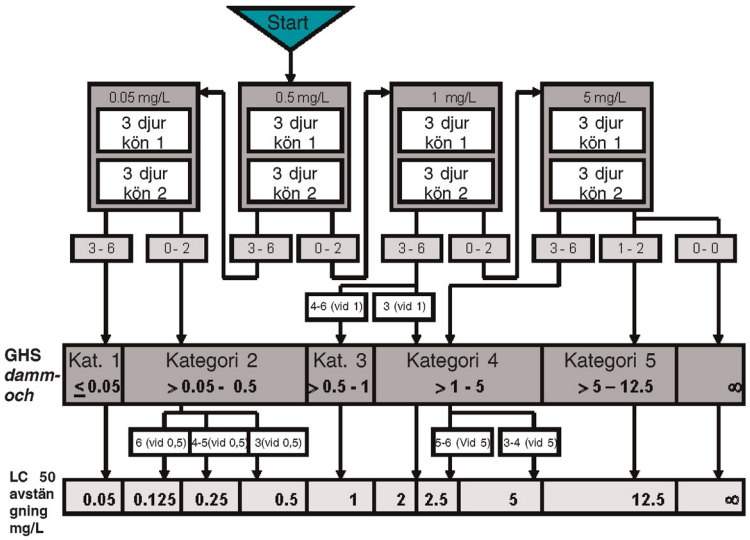
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 ng/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4b

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,5 mg/L/4h för aerosoler



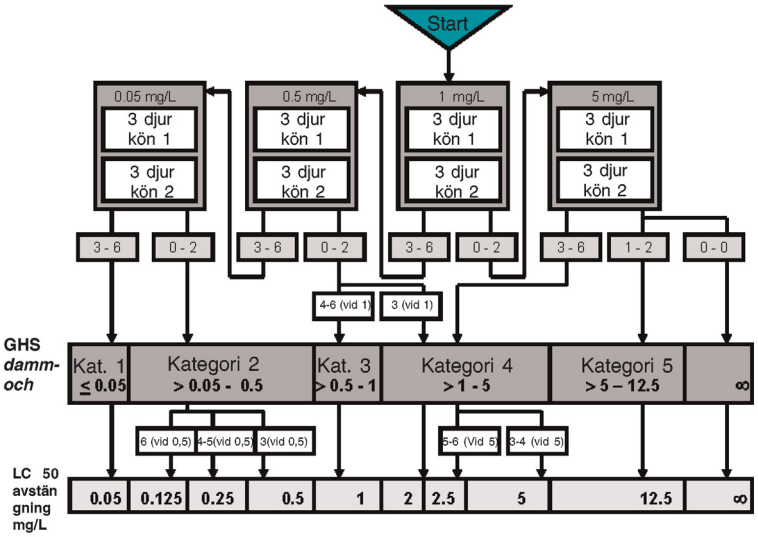
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djurav det mer mot tagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4c

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 1 mg/L/4h för aerosoler



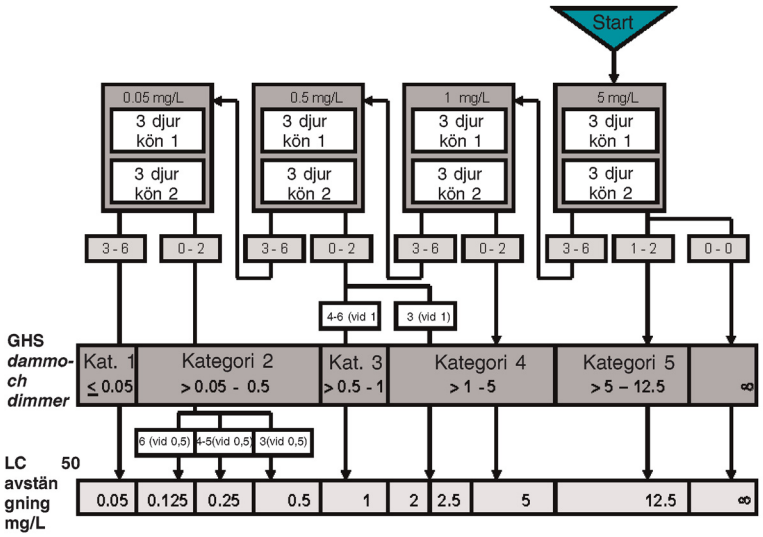
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djurav det mer mot tagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4d

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 5 mg/L/4h för aerosoler



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djurav det mer mot tagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)”

▼B

DEL C: METODER FÖR BESTÄMNING AV EKOTOXICITET

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

C.1	AKUT TOXICITET FÖR FISK
C.2	TEST AV AKUT IMMOBILISERING AV *DAPHNIA*-ARTER
C.3	BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS SÖTVATTENSALGER OCH CYANOBAKTERIER
C.4	BESTÄMNING AV ”LÄTT” BIONEDBRYTBARHET
DEL 1	ALLMÄNNA PRINCIPER
DEL 2	DOC-ELIMINERING (DOC DIE-AWAY) (metod C.4-A)
DEL 3	MODIFIERAT OECD-SCREENINGTEST (metod C.4-B)
DEL 4	CO_2-UTVECKLING (metod C.4-C)
DEL 5	MANOMETRISK RESPIROMETRITEST (metod C.4-D)
DEL 6	CLOSED BOTTLE-TEST (metod C.4-E)
DEL 7	MITI TEST (metod C.4-F)
C.5	NEDBRYTNING – BIOKEMISK SYREFÖRBRUKNING
C.6	NEDBRYTNING – KEMISK SYREFÖRBRUKNING
C.7	NEDBRYTNING – ABIOTISK NEDBRYTNING: HYDROLYS SOM FUNKTION AV PH
C.8	TOXICITET HOS DAGGMASKAR
C.9	BIOLOGISK NEDBRYTBARHET: ZAHN-WELLENS TEST
C.10	SIMULATIONSTEST AEROB AVLOPPSVATTENBEHANDLING C.10-A: ENHETERNA FÖR AKTIVERAT SLAM – C.10-B BIOFILMER
C.11	BIOLOGISK NEDBRYTBARHET: AKTIVERAT SLAM – RESPIRATIONSHÄMNINGSTEST
C.12	BIOLOGISK NEDBRYTBARHET: MODIFIERAT SCAS-TEST
C.13	BIOKONCENTRATION: GENOMFLÖDESPROVNING MED FISK
C.14	TILLVÄXTTEST PÅ UNGA EXEMPLAR AV FISK
C.15	FISK, KORTTIDSTEST AVSEENDE TOXICITET PÅ *EMBRYO*-OCH SÄCKYNGELSTADIERNA
C.16	HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (ORALT)
C.17	HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (KONTAKT)
C.18	BESTÄMNING AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORD VID JÄMVIKT I UPPSLAMMAT JORDPROV

▼B

C.19	UPPSKATTNING AV ADSORPTIONSKOEFFICIENT (K_{OC}) I JORD OCH AVLOPPSSLAM MED ANVÄNDNING AV HÖGTRYCKSVÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)
C.20	REPRODUKTIONSTEST PÅ *DAPHNIA MAGNA*
C.21	JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KVÄVE
C.22	JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KOL
C.23	AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I JORD
C.24	AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I AKVATISKA SEDIMENTSYSTEM
C.25.	AEROB MINERALISERING I YTVATTEN – SIMULERINGSTEST AV BIOLOGISK NEDBRYTNING
C.26.	BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS FLYTBLADSVÄXTEN *LEMNA* SP. (ANDMAT)

▼M4

C.27.	TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMIDLARVER MED SPIKAT SEDIMENT
C.28.	TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMID-LARVER MED SPIKAT VATTEN
C.29.	LÄTT BIONEDBRYTBARHET – CO_2 I FÖRSLUTNA KÄRL (Headspace-test)
C.30.	BIOACKUMULERING I JORDLEVANDE OLIGOCHAETER (FÅBORSTMASKAR)

▼B

C.1 AKUT TOXICITET FÖR FISK

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med detta test är att bestämma ett ämnets akuta dödliga toxicitet för sötvattenfisk. Det är värdefullt att känna till ämnets löslighet i vatten, ångtryck, kemiska stabilitet, dissociationskonstanter och bionedbrytbarhet när man ska välja den mest lämpliga testmetoden (statisk, semistatisk eller genomströmning) för att säkerställa tillfredsställande konstanta koncentrationer av testämnet under hela testperioden.

Vid planeringen av testet och tolkningen av testresultaten bör man ta hänsyn till andra uppgifter (t.ex. strukturformel, renhetsgrad, art och procentdel av signifikanta orenheter, förekomst och mängd av tillsatser, samt n-oktanol/vattendelningskoefficienten).

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Akut toxicitet är de märkbara skadliga verkningar som på kort tid (dagar) framkallas hos en organism som exponeras för ett ämne. I detta test uttrycks akut toxicitet som median letal koncentration (LC_{50}), dvs. den koncentration i vatten som medför att 50 % av fiskarna i en försöksgrupp dör under kontinuerlig exponering i en viss tid. Exponeringstiden ska anges.

Alla koncentrationer av testämnet anges i vikt per volymenhet (milligram per liter). De kan också uttryckas som vikt per vikt (mg/kg^{-1}).

1.3 REFERENSÄMNEN

Ett referensämne kan användas för att visa att försöksdjurens respons inte har ändrats signifikant under testbetingelserna i laboratoriet.

Inga referensämnen finns angivna för detta test.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Ett gränstest kan utföras med 100 mg per liter för att konstatera om LC_{50} är större än denna koncentration.

Fisken exponeras för testämnet som i en rad koncentrationer tillsätts vattnet under 96 timmar. Dödligheten registreras med högst 24 timmars mellanrum och om så är möjligt beräknas de koncentrationer som vid varje observationstillfälle har medfört att 50 % av fisken (LC_{50}) har dött.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierna gäller för såväl gränstestet som den fullständiga testmetoden.

Dödligheten i kontrollgruppen får inte överstiga 10 % (eller 1 fisk om färre än 10 fiskar används) i slutet av testet.

Under hela testet ska koncentrationen av upplöst syre vara högre än 60 % av luftmättnadsvärdet.

▼B

Koncentrationer av testämnet ska ligga över 80 % av startkoncentrationen under hela testperioden.

För ämnen som är lättlösliga i testmediet och ger stabila lösningar, dvs. ämnen som inte i hög grad förångas, bryts ned, hydrolyseras eller adsorberas, kan startkoncentrationen antas vara lika med den nominella koncentrationen. Man ska kunna bevisa att koncentrationen har bibehållits under hela testet och att kvalitetskriterierna är uppfyllda.

För ämnen som är

i) svårlösliga i testmediet, eller

ii) kan skapa stabila emulsioner eller dispersioner, eller

iii) är ostabila i vattniga lösningar

ska man som värde för startkoncentrationen använda den koncentration som är uppmätt i lösningen (eller om detta inte är tekniskt möjligt, mätt i vattenkolonnen) vid testets inledning. Koncentrationen bestäms sedan jämvikt uppnåtts, men innan fisken släpps i.

I alla dessa fall ska ytterligare mätningar göras under testets gång för att säkerställa att koncentrationen har bibehållits och att kvalitetskriterierna har varit uppfyllda.

pH-värdet får inte variera med mer än 1 enhet.

1.6. METODBESKRIVNING

Tre typer av förfaranden kan användas:

Statiskt test:

Toxicitetstest utan något genomflöde av testlösningen. (Lösningarna förblir oförändrade under hela testet.)

Semi-statiskt test:

Test utan genomflöde av testlösningen men där hela testlösningar regelbundet byts ut helt efter längre perioder (t.ex. 24 timmar).

Genomströmningstest:

Toxicitetstest där vattnet i testkamrarna förnyas hela tiden och där testämnet transporteras med det vatten som används till att förnya testmediet.

1.6.1 **Reagenser**

1.6.1.1 *Lösningar av testämnen*

Stamlösningar av erforderlig styrka framställs genom att testämnet upplöses i avjoniserat vatten eller vatten enligt 1.6.1.2.

De valda testkoncentrationerna framställs genom utspädning av stamlösningen. Om höga koncentrationer testas kan ämnet lösas direkt i utspädningsvattnet.

▼B

Ämnen testas normalt endast upp till gränsen för löslighet. För vissa ämnen (t.ex. ämnen som är svårlösliga i vatten, som har ett högt P_{ow}-värde, eller som bildar en stabil dipersion och inte en riktig lösning i vatten) accepteras att man har använt en testkoncentration som är större än lösligheten för att säkerställa att den högsta upplösta/stabila koncentration har nåtts. Det är dock viktigt att denna koncentration inte på annat sätt förstör testmetoden (t.ex. bildar en hinna av ämnet på vattenytan som förhindrar syrsättning av vattnet, etc.).

Ultraljud, organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel kan användas för att framställa stamlösningar av ämnen som är svårlösliga i vatten och för att dispergera sådan ämnen i testmediet. Om tillsatsämnen används ska alla testkoncentrationer innehålla samma mängd av tillsatsämnet och en extra kontrollgrupp ska användas som utsätts för samma koncentration av tillsatsämnet som den som används i testserien. Sådana tillsatsämnen används i lägsta möjliga koncentration och får aldrig vara större än 100 mg per liter i testmediet.

Testet utförs utan justering av pH-värdet. Om det finns tecken på en markant förändring av pH-värdet rekommenderas att testet upprepas med pH-justering och att dessa resultat rapporteras. I detta fall ska pH-värdet i stamlösningen justeras efter pH-värdet i utspädningsvattnet, om det inte finns särskilda skäl som talar mot detta. HC1 och NaOH är förstahandsvalen för justering av pH-värdet. Denna pH-justering ska göras på ett sådant sätt att testämnets koncentration i stamlösningen inte ändras i någon signifikant grad. Om justeringen medför någon kemisk reaktion eller fysisk utfällning av testämnet ska detta rapporteras.

1.6.1.2 *Vatten till förvaring och utspädning*

Dricksvatten (som inte är förorenat av skadliga koncentrationer av klor, tungmetaller eller andra ämnen), råvatten av god kvalitet eller rekonstituerat vatten (se tillägg 1) kan användas. Vatten med en total hårdhet på mellan 10 och 250 mg per liter (som $CaCO_3$) och med ett pH-värde av 6,0–8,5 är att föredra.

1.6.2 **Apparatur**

All apparatur ska vara tillverkad av kemiskt inert material:

— Automatiskt utspädningssystem (till genomströmningstestet).

— Syremätare.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhet.

— Lämplig apparatur för temperaturkontroll.

— pH-mätare.

1.6.3 **Testfisk**

Fiskarna ska vara friska och utan synliga missbildningar.

▼B

De arter som ska användas bör väljas på grundval av praktiska kriterier, t.ex. att de är lätt tillgängliga under hela året, enkla att hålla, lämpliga för testet, har en relativ känslighet, samt på grundval av ekonomiska, biologiska och ekologiska faktorer av betydelse. Nödvändigheten att kunna jämföra de data som erhålls och redan genomförd internationell harmonisering (hänvisning 1) bör också beaktas vid val av fiskart.

I tillägg 2 förtecknas de fiskarter som rekommenderas för detta test. Sebrafisk och regnbåge är att föredra.

1.6.3.1 *Förvaring*

Testfisk ska helst komma från ett enda bestånd och vara av ungefär samma längd och ålder. Fisken ska förvaras i minst 12 dagar under följande betingelser:

Belastning:

Anpassad efter systemet (cirkulation eller genomströmning) och fiskarterna.

Vatten:

Se punkt 1.6.1.2.

Ljus:

12–16 timmars ljus per dag.

Koncentration av upplöst syre:

Minst 80 % av luftmättnadsvärdet.

Utfodring:

Dagligen eller tre gånger per vecka, sista gången 24 timmar innan testet inleds.

1.6.3.2 *Dödlighet*

Efter 48 timmars acklimatisering registreras dödligheten och följande kriterier tillämpas:

— Högre än 10 % av populationen på 7 dagar:

hela partiet kasseras.

— Mellan 5 och 10 % av populationen:

observationsperioden förlängs med ytterligare 7 dagar.

Om inga fler dödsfall inträffar kan partiet accepteras, i annat fall kasseras det.

— Lägre än 5 % av populationen:

partiet kan accepteras.

1.6.4 **Tillvänjning**

All fisk ska i minst 7 dagar före testet exponeras för vatten av den kvalitet och temperatur som ska användas i testet.

▼B

1.6.5 **Testförfarande**

Före det slutliga testet kan ett inledande test göras för att fastställa vilka koncentrationer som ska användas i huvudtestet.

Förutom testserien inbegrips en kontrollgrupp som inte tillförs testämnet och, i vissa fall, en kontrollgrupp som tillförs tillsatsämnet.

Beroende på testämnets fysiska och kemiska egenskaper ska ett statiskt test, ett semi-statiskt test eller ett genomströmningstest väljas så att kvalitetskriteriet uppfylls.

Fisken exponeras för testämnet enligt följande:

— Varaktighet: 96 timmar.

— Antal djur: Minst 7 per koncentration.

— Kar: Av passande storlek i förhållande till den rekommenderade belastningen.

— Belastning: För statisk och semistatiska test rekommenderas 1,0 g per liter som maximal belastning. För genomströmningssystem kan större belastning accepteras.

— Testkoncentrationer: Minst 5 koncentrationer med ett konstant inbördes förhållande av högst 2,2 som så långt det för täcker intervallet 0–100 % dödlighet.

— Vatten: Se 1.6.1.2.

— Ljus: 12–16 timmar ljus per dag.

— Temperatur: Lämplig för arten (tillägg 2) men inom ±1 ºC i ett enskilt test.

— Koncentration av upplöst syre: Inte mindre än 60 % av luftmättnadsvärdet vid den valda temperaturen.

— Utfodring: Ingen.

Fisken besiktas efter de första 2–4 timmarna och minst var 24:e timme. Fisk anses vara död om beröring av stjärtfenan inte framkallar någon reaktion och inga andningsrörelser kan iakttas. Död fisk avlägsnas när den upptäcks och dödsfall registreras. Register förs över synliga abnormiteter (t.ex. förlust av jämvikten, ändrat simbeteende, andningsfunktion, pigmentering osv.).

Mätningar av pH, upplöst syre och temperatur ska göras dagligen.

Gränstest

Genom användning av förfarandena som beskrivs i denna testmetod kan ett gränstest utföras med 100 mg per liter för att konstatera om LC_{50} är större än denna koncentration.

Om ämnet är av sådan art att man inte kan erhålla en koncentration av 100 ml per liter i testvattnet utförs gränstestet vid ämnets mättnadskoncentration (eller den högsta koncentrationen vid vilken det bildas en stabil disper-sion) i det använda mediet (se även 1.6.1.1).

▼B

Gränstestet utförs med 7–10 fiskar och en eller två kontrollgrupper av samma storlek. (Enligt binomialteorin är det vid användning av 10 fiskar 99,9 % säkerhet för att LC_{50} är större än den använda koncentrationen, om dödligheten är noll. Med 7, 8 eller 9 fiskar ger en dödlighet av noll 99 % säkerhet för att LC_{50} är större än den använda koncentrationen.)

Om dödsfall sker måste en fullständig undersökning utföras. Eventuella subletala verkningar registreras.

2. **DATA OCH UTVÄRDERING**

För var och en av de tidsperiod då observationer företas (efter 24, 48, 72 och 96 timmar) avbildas den procentuella dödligheten mot koncentrationen på logaritmisk sannolikhetspapper.

När så är möjligt och för varje observationstid ska LC_{50} och dess konfidensgränser (p = 0,05) uppskattas genom standardförfaranden. Dessa värden ska avrundas till en (eller högst två) signifikanta siffror (exempel på avrundning till två siffror: 170 för 173,5, 0,13 för 0,127, 1,2 för 1,21).

I de fall där koncentrations-procentresponskurvans lutning är för brant för att medge en beräkning av LC_{50} räcker det med en grafisk uppskattning av detta värde.

Om två på varandra följande koncentrationer med ett förhållande på 2,2 endast ger 0 och 100 % dödlighet, räcker dessa två värden för att ange inom vilket område LC_{50} ligger.

Om det framgår att det inte går att hålla testämnet stabilt eller homogent ska detta rapporteras och försiktighet ska iakttas vid tolkningen av resultaten.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla:

— Uppgifter om testfisken (vetenskapligt namn, stam, leverantör, eventuell förbehandling, storlek och antal som använts for varje koncentration).

— Källan till utspädningsvattnet och viktiga kemiska egenskaper (Ph, hårdhet, temperatur).

— För ämnen med låg vattenlöslighet anges metod att framställa stam- och testlösning.

— Koncentrationen av eventuella tillsatsämnen.

— En lista över de koncentrationer som använts och alla tillgängliga uppgifter om testämnets stabilitet vid kon centrationerna i testlösningen.

— Om kemiska analyser görs ska metoder och resultat rapporteras.

— Resultat från gränstest om sådant utförts.

— Skälen till valet av och detaljer om använt testförfarande (t.ex. statisk, semi-statisk, doseringstakt, genomströmningstakt, eventuell syrsättning, antal fiskar osv.).

▼B

— Beskrivning av testutrustningen.

— Ljusbetingelser.

— Testlösningens koncentration av upplöst syre, pH-värden och temperatur var 24:e timme.

— Bevis på att kvalitetskriterierna har uppfyllts.

— Kumulativ dödlighet för varje koncentration och kontrollprov (eller kontroll med tillsatsämne om sådant behövs) vid de rekommenderade observationstiderna.

— Grafisk framställning av denna responskurva över koncentration/procent i slutet av testet.

— Om möjligt, LC_{50}-värden för varje rekommenderad observationstid (med 95 % konfidensgränser).

— Statistiska förfaranden som använts vid bestämning av LC_{50}-värdena.

— Om referensämne har använts ska erhållna resultat anges.

— Högsta testade koncentration som inte medför dödsfall inom testperioden.

— Lägsta testade koncentrationen som medför 100 % dödlighet inom testperioden.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, rådets beslut K(81) 30 slutligt och uppdaterat.

2. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 juni 1985.

3. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow Through methods – NFT 90-305 juni 1985.

4. ISO 7346/1,/*2* och/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of a substance to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – *Teleostei, Cyprinidae)*. Del 1: Static method. Del 2: Semi-static method. Del 3: Flow-through method.

5. Eidgenössiches Departament des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmetoden – Del II 1974.

6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (Ll) och L (15).

7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8. NEN 6506 – Water – Bepailing van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

9. Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians, The committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10. Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

11. Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, del IV, 16 mars 1979.

12. Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

13. Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish, EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14. Verfahrensvorschlag des Umweltsbundesamt zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. och Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikalienge-setz, ecomed 1986.

15. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, E, A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., vol. 96, 1949, s. 99.

16. Finney, D. J. Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K., 1978.

17. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 1969, vol. 3, s. 793–821.

18. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, s. 3–32.

19. Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer och J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, s. 65–84.

20. Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. och Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

▼B

Tillägg 1

Rekonstituterat vatten

Exempel på lämpligt utspädningsvatten

Alla kemikalier ska vara av analytisk renhetsgrad.

Vattnet ska vara destillerat vatten av god kvalitet eller avjoniserat vatten med en ledningsförmåga på mindre än 5μScm^{-1}.

Apparatur för destillering av vatten får inte innehålla några delar gjorda av koppar.

Stamlösningar

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalciumklorid dihydrat)	11,76 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	
$MgSO_4.7H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat):	4,93 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	
$NaHCO_3$ (natriumvätekarbonat):	2,59 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	
KCl (kaliumklond):	0,23 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.	

Rekonstituerat utspädningsvatten

Blanda 25 ml av de fyra stamlösningarna med vatten så att 1 liter erhålls.

Syrsätt tills koncentrationen av upplöst syre är lika med luftmättnadsvärdet.

pH ska vara 7,8 ± 0,2.

Justera vid behov pH-värdet med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyra).

Det således framställda utspädningsvattnet sätts åt sidan i 12 timmar och ska inte syrsättas ytterligare.

Summan av Ca- och Mg-jonerna i denna lösning är 2,5 mmol per liter. Förhållandet mellan Ca- och Mg-jonerna är 4:1 och mellan Na- och K-jonerna 10:1. Den totala alkaliniteten hos denna lösning är 0,8 mmol per liter.

Avvikelser vid framställningen av utspädningsvattnet får inte ändra vattnets sammansättning eller egenskaper.

▼B

Tillägg 2

Fiskarter som rekommenderas till test

Rekommenderade arter	Rekommenderad temperaturintervall (°C)	Rekommenderad total längd på testdjur (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrafisk	20–24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20–24	5,0 ± 2,0
Cypnnus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Karp	20–24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck och Schlegel 1850) Red killifish	20–24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20–24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	20–24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regnbågsforell	12–17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Guldfisk	20–24	6,0 ± 2,0

Odlingsbetingelser

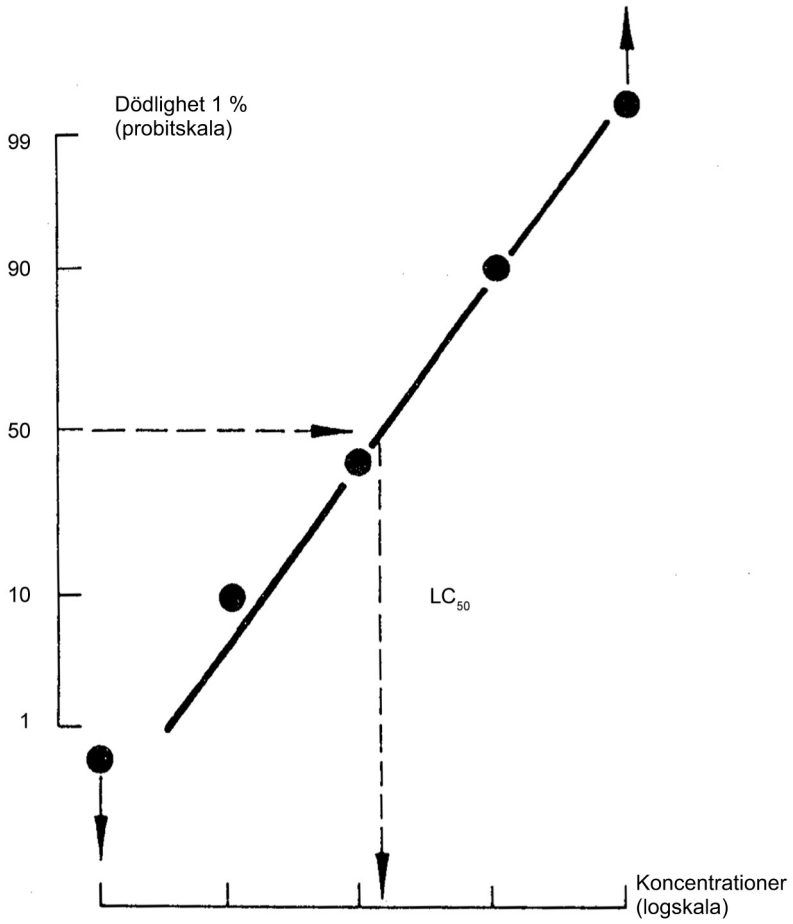
Ovan angivna fiskar är lätta att odla och/eller är lätt tillgängliga året runt. De kan förädlas och odlas i fiskdammar eller i laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade betingelser så att testdjuren är friska och av känd härstamning. Dessa fiskar finns i många delar av världen.

▼B

Tillägg 3

Exempel på kurva över koncentration mot dödlighet

Exempel på bestämning av LC_{50} på log-probit-papper



▼B

C.2 TEST AV AKUT IMMOBILISERING AV *DAPHNIA*-ARTER

1. METOD

Denna testmetod för akut immobilisering motsvarar OECD TG 202 (2004).

1.1 INLEDNING

Denna metod beskriver ett akut toxicitetstest för att bedöma effekten av kemikalier på hinnkräftor *(Daphnia)*. Såvitt möjligt har befintliga testmetoder använts (1)(2)(3).

1.2 DEFINITIONER

För denna metods ändamål gäller följande definitioner:

EC_{50}: Den koncentration som beräknas immobilisera 50 % av hinnkräftorna inom en given exponeringstid. Om någon annan definition används måste denna rapporteras tillsammans med en hänvisning.

Immobilisering: De djur som inte längre kan simma inom 15 sekunder efter varsam skakning av testkärlet anses vara immobiliserade (även om de fortfarande kan röra på antennerna).

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Unga havskräftor, yngre än 24 timmar då testet inleds, exponeras för testämnet i en serie koncentrationer under en period av 48 timmar. Immobilisering registreras vid 24 timmar och 48 timmar och jämförs med kontrollvärden. Resultaten analyseras för beräkning av EC_{50} vid 48 timmar (se avsnitt 1.2 för definitioner). Bestämning av EC_{50} vid 24 timmar är valfri.

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Testämnets vattenlöslighet och ångtryck ska vara kända och en tillförlitlig analysmetod ska finnas tillgänglig för kvantifiering av ämnet i testlösningen, med rapporterad återvinningseffektivitet samt analysgräns. Användbar information inbegriper strukturformel, ämnets renhet, stabiliteten i vatten och i ljus, P_{ow} och resultat från ett test för biologisk nedbrytbarhet (se metod C.4).

Anmärkning: Vägledning för testämnen med fysikalkemiska egenskaper som gör dem svåra att testa ges i (4).

1.5 REFERENSÄMNEN

Ett referensämne kan testas med avseende på EC_{50} som ett sätt att garantera att försöksbetingelserna är tillförlitliga. Giftämnen som används vid internationell ringtestning (1)(5) rekommenderas för detta ändamål ([1]). Försök med ett referensämne ska helst göras varje månad och minst två gånger per år.

([1]) Resultaten av dessa laboratorieförsök och en teknisk rättelse till ISO 6341 ger ett EC_{50} – 24 timmar för kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$) i intervallet 0,6 mg/l till 1,7 mg/l.

▼B

1.6 KVALITETSKRITERIER

För att ett försök ska vara giltigt gäller följande kriterier för prestanda:

— I kontrollerna, inbegripet den kontroll som innehåller solubiliseringsagenset, får inte mer än 10 % av hinnkräftorna immobiliseras.

— Koncentrationen av löst syre i slutet av försöket ska vara > 3 mg/l i kontroll- och testkärl.

Anmärkning: För det första kriteriet ska inte mer än 10 % av kontrollhinnkräftorna uppvisa immobilisering eller andra tecken på sjukdom eller stress, t.ex. missfärgning eller ovanligt beteende såsom infångning vid vattenytan.

1.7 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.7.1 **Utrustning**

Försökskärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testlösningarna bör vara tillverkade helt i glas eller annat kemiskt inert material. I regel används glasprovrör eller glasbägare. Dessa bör rengöras före varje rutinmässigt laboratorieförfarande. Försökskärlen ska vara löst täckta för att minska vattenförlusten på grund av avdunstning och för att förhindra att damm kommer ner i lösningarna. Flyktiga ämnen ska testas i helt fyllda, slutna kärl som är tillräckligt stora för att förhindra att syret blir begränsande eller att det blir syrebrist (se avsnitt 1.6 och första stycket i avsnitt 1.8.3).

Dessutom behövs åtminstone en del av följande utrustning: syrgasmätare (med mikroelektrod eller annan lämplig anordning för att mäta löst syre i lågvolymsprover), pH-meter, adekvat anordning för temperaturkontroll, utrustning för bestämning av totalt organiskt kol (TOC), utrustning för bestämning av kemisk syreförbrukning (COD), utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad.

1.7.2 **Försöksorganism**

Daphnia magna Straus är den föredragna testarten, även om andra lämpliga arter av hinnkräfta kan användas i detta test (t.ex. *Daphnia pulex)*. Vid testets början måste djuren vara yngre än 24 timmar och för att minska variabiliteten är en stark rekommendation att de inte tillhör den första satsen avkomma. De ska komma från en frisk stam (dvs. inte visa tecken på stress, t.ex. hög dödlighet, förekomst av hanar och ephippia, fördröjd produktion av första satsen avkomma, missfärgade djur osv.). Alla organismer som används för ett visst försök ska ha sitt ursprung i odlingar som etablerats från samma stam av hinnkräftor. Stamdjuren måste hållas i samma odlingsbetingelser (ljus, temperatur, medium) som används vid testet. Om annat än normalt odlingsmedium för hinnkräftor används vid testet är det tillrådligt med en acklimatiseringsperiod före testet. Under denna period ska Dapnia-avkomman hållas i utspädningsvatten vid testtemperaturen under minst 48 timmar innan testet inleds.

▼B

1.7.3 **Förvarings- och utspädningsvatten**

Naturligt vatten (yt- eller grundvatten), rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten är godtagbart som förvarings- och utspädningsvatten om hinnkräftorna överlever i det under odling, acklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vatten som uppfyller de kemiska egenskaper som listas i bilaga 1 är lämpliga som testvatten. Vattnet ska hålla konstant kvalitet under testperioden. Rekonstituerat vatten kan framställas genom tillsats av specifika mängder reagens av vedertagen analysrenhetsgrad till avjonat eller destillerat vatten. Exempel på rekonstituerat vatten ges i (1) (6) och i bilaga 2. Observera att medier som innehåller kända kelateringsmedel, t.ex. M4- och M7-medium i bilaga 2, ska undvikas för testämnen som innehåller metaller. pH ska ligga i området 6 till 9. En hårdhetsgrad på mellan 140 och 250 mg/l (i form av $CaCO_3$) rekommenderas för *Daphnia Magna,* medan även lägre hårdhetsgrader kan vara lämpliga för andra *Daphnia*-arter. Utspädningsvattnet kan luftas före testet så att koncentrationen av löst syre når mättnad.

Om naturligt vatten används ska kvalitetsparametrarna mätas minst två gånger per år eller närhelst man kan misstänka att dessa egenskaper kan ha ändrats väsentligt (se stycket ovan och bilaga 1). Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) ska också göras. Om avklorerat kranvatten används är en daglig kloranalys önskvärd. Om utspädningsvattnet kommer från en yt- eller grundvattenkälla ska konduktivitet samt totalt organiskt kol (TOC) eller kemisk syreförbrukning (COD) mätas.

1.7.4 **Testlösningar**

Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna bör helst beredas genom upplösning av testämnet i utspädningsvattnet. Så långt det är möjligt bör bruk av lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel undvikas. Sådana föreningar kan dock krävas i vissa fall för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Vägledning när det gäller lämpliga lösningsmedel, emulgeringsmedel och dispergeringsmedel ges i (4). Testämnets halt i testlösningarna bör under inga omständigheter överskrida lösligheten i utspädningsvattnet.

Testet ska göras utan pH-justering. Om pH inte ligger kvar i området 6–9 görs ett andra test, med justering av stamlösningens pH till utspädningsvattnets före tillsats av testämne. pH-justeringen ska göras på ett sådant sätt att stamlösningens koncentration inte förändras väsentligt och så att ingen kemisk reaktion eller utfällning av testämnet orsakas. HC1 och NaOH är föredragna.

▼B

1.8 FÖRFARANDE

1.8.1 **Exponeringsförhållanden**

1.8.1.1 *Testgrupper och kontroller*

Testkärlen fylls med lämpliga volymer utspädningsvatten och lösningar av testämne. Kvoten luftvolym/vattenvolym i kärlet ska vara identisk för test- och kontrollgruppen. Hinnkräftorna placeras sedan i testkärlen. Minst 20 djur, helst indelade i fyra grupper om fem vardera, ska användas för varje testkoncentration och för kontrollerna. Minst 2 ml testlösning ska tillhandahållas för varje djur (dvs. en volym på l0 ml för fem hinnkräftor per testkärl). Testet kan utföras med halvstatisk förnyelse eller med genomflödessystem där koncentrationen av testämne inte är stabil.

En kontrollserie med utspädningsvatten och också, om detta är relevant, en kontrollserie som innehåller solubiliseringsagenset måste köras utöver behandlingsserierna.

1.8.1.2 *Testkoncentrationer*

Ett test för att söka intervall kan genomföras för att bestämma koncentrationsområdet för det egentliga testet om ingen information om testämnets toxicitet finns att tillgå. För detta ändamål exponeras hinnkräftorna för en serie koncentrationer av testämnet som ligger långt ifrån varandra. Fem hinnkräftor ska utsättas för varje testkoncentration i 48 timmar eller mindre, och inga replikat krävs. Exponeringstiden kan förkortas (t.ex. 24 timmar eller mindre) om data lämpliga för intervalltestets ändamål kan erhållas på kortare tid.

Minst fem testkoncentrationer ska användas. Dessa arrangeras i geometriska serier med en separationsfaktor som helst inte överskrider 2,2. Om färre än fem koncentrationer används ska detta motiveras. Den högsta testade koncentrationen ska helst ge l00-procentig immobilisering, och den lägsta koncentrationen som testas ska helst inte ge någon observerbar effekt alls.

1.8.1.3 *Inkuberingsförhållanden*

Temperaturen ska ligga i området 18 °C till 22 °C, och för varje enskilt test ska den vara konstant inom ± 1 °C. En dygnscykel med 16 timmar ljus och 8 timmar mörker rekommenderas. Fullständigt mörker är också godtagbart, särskilt om testämnet är instabilt i ljus.

Testkärlen måste luftas under testet. Testet genomförs utan pH-justering. Hinnkräftorna ska inte utfodras under testet.

1.8.1.4 *Varaktighet*

Testets varaktighet är 48 timmar.

1.8.2 **Observationer**

Varje testkärl ska kontrolleras med avseende på immobiliserade hinnkräftor 24 och 48 timmar efter det att testet har påbörjats (se avsnitt 1.2 för definitioner). Utöver immobilisering ska alla onormala förändringar av beteende och utseende rapporteras.

▼B

1.8.3 **Analyser**

Löst syre och pH mäts i början och i slutet av testet i kontrollen eller i kontrollerna och i den högsta testämneskoncentrationen. Koncentrationen av löst syre i kontrollerna ska överensstämma med giltighetskriteriet (se avsnitt 1.6). pH-värdet ska normalt inte variera med mer än 1,5 enheter i något enskilt test. Temperaturen mäts i regel i kontrollkärlen eller som omgivningstemperatur och ska helst registreras kontinuerligt under testet eller åtminstone i början och i slutet av testet.

Koncentrationen av testämne ska mätas minst vid den högsta och den lägsta testkoncentrationen i början och i slutet av testet (4). Det rekommenderas att resultaten baseras på uppmätta koncentrationer. Om det finns belägg för att koncentrationen av testämnet har hållit sig inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta initiala koncentrationen genom hela testet kan resultaten dock baseras på nominella eller uppmätta initialvärden.

1.9 LIMIT-TEST

Genom användning av de förfaranden som beskrivs i denna metod kan ett så kallat limit-test göras upp vid 100 mg/l testämne eller upp till ämnets löslighetsgräns i testmediet (den av dessa koncentration som är lägst) för att visa att EC_{50} är högre än denna koncentration. Limit-testet ska göras med 20 hinnkräftor (helst indelade i fyra grupper om fem), med samma antal i kontrollen eller kontrollerna. Om någon immobilisering sker ska en fullständig studie genomföras. Allt onormalt beteende som observeras ska registreras.

2. **DATA**

Data ska sammanfattas i tabellform som för varje behandlingsgrupp och kontroll visar antalet hinnkräftor som använts och immobilisering vid varje observation. Procentandelen immobiliserade hinnkräftor vid 24 timmar och 48 timmar plottas mot testkoncentrationerna. Data analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probitanalys osv.) för att beräkna kurvornas lutningar och EC_{50} med 95 % konfidensintervall ($p = 0,05$) (7) (8).

Om standardmetoderna för att beräkna EC_{50} inte går att tillämpa på erhållna data ska den högsta koncentration som inte ger någon immobilisering och den lägsta koncentration som ger 100 % immobilisering användas som approximering för EC_{50} (eftersom detta värde betraktas som det geometriska medelvärdet för dessa båda koncentrationer).

3. **RAPPORTERING**

3.1 FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten måste innehålla följande information:

Testämne:

— Fysikaliskt tillstånd och relevanta fysikalkemiska egenskaper.

▼B

— Kemiska identifieringsdata, inbegripet renhet.

Försöksart:

— Källa och art av *Daphnia,* leverantör av källan (om denna är känd) och odlingsbetingelser (inbegripet fodrets källa, typ och mängd samt utfodringsfrekvens).

Försöksförhållanden:

— Beskrivning av försökskärlen: typ av kärl, lösningsvolym, antal hinnkräftor per försökskärl (replikat) per koncentration.

— Beredningsmetoder för stam- och testlösningar, inbegripet användning av lösningsmedel eller dispergeringsmedel, använda koncentrationer.

— Detaljerade uppgifter om utspädningsvattnet: källa och detaljerade uppgifter om vattenkvalitet (pH, hårdhetsgrad, Ca/Mg-kvot, Na/K-kvot, alkalinitet, konduktivitet osv.) samt sammansättning om rekonstituerat vatten används.

— Inkuberingsförhållanden: temperatur, ljusintensitet och periodicitet, löst syre, pH osv.

Resultat:

— Antal och procentandel hinnkräftor som immobiliserats eller visat tecken på negativ inverkan (inbegripet onormalt beteende) i kontrollerna och i varje behandlingsgrupp vid varje observationstidpunkt samt en beskrivning av de effekter som observerats.

— Resultat och datum för tester som utförts med referensämnen, om detta finns att tillgå.

— De nominella testkoncentrationerna och resultaten av alla analyser för bestämning av koncentrationen av testämne i försökskärlen. Även metodens återvinningseffektivitet och analysgräns ska rapporteras.

— Alla fysikalkemiska mätningar av temperatur, pH och löst syre som gjorts under testet.

— EC_{50} vid 48 timmar för immobilisering med konfidensintervall och diagram över den anpassade modell som använts för att beräkna dessa värden, lutningarna för dos-responskurvorna och deras standardfel; statistiska förfaranden som använts för bestämning av EC_{50}; (dessa data för immobiliseringen vid 24 timmar ska också rapporteras om de mäts).

— Förklaring till eventuell avvikelse från testmetoden och uppgift om huruvida avvikelsen påverkade resultaten.

4. HÄNVISNINGAR

1. ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Kanada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris, 2000.

5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. Pp65–84.

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Bilaga 1

VISSA KEMISKA EGENSKAPER FÖR ETT GODTAGBART SPÄDNINGSVATTEN

Ämne	Koncentration
Partiklar	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Icke-joniserat ammonium	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd pesticider med organiskt fosfat	< 50 ng/l
Total mängd pesticider med organiskt klor plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/1
Totalt organiskt klor	< 25 ng/1

▼B

Bilaga 2

EXEMPEL PÅ LÄMPLIGT REKONSTITUERAT TESTVATTEN

ISO för testvatten (1)

Stamlösningar (enstaka ämnen)		För framställning av rekonstituerat vatten, sätt följande volymer av stamlösningarna till 1 liter vatten (*)
Ämne	Mängd tillsatt 1 liter vatten (*)	
Kalciumklorid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnesiumsulfat $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natriumbikarbonat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kaliumklorid K Cl	0,23 g	25 ml

(*) Vatten av lämplig renhet, t.ex. avjonat, destillerat eller renat med omvänd osmos med en konduktivitet som inte överskrider l0 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendt M7- och M4-medium

Acklimatisering till Elendt M4- och M7-medium

Vissa laboratorier för över hinnkräftorna direkt till M4- och M7-medier. En viss framgång har uppnåtts med gradvis acklimatisering, dvs. överflyttning från eget medium till 30 % Elendt, sedan till 60 % Elendt och slutligen till 100 % Elendt. Acklimatiseringsperioderna kan behöva vara upp till en månad långa.

Beredning

Spårelement

Separata stamlösningar (I) av enskilda spårelement bereds först i vatten av lämplig renhet, t.ex. avjoniserat, destillerat eller renat med omvänd osmos. Från dessa olika stamlösningar (I) bereds en andra stamlösning (II) som innehåller alla spårelement (kombinerad lösning), dvs.:

Stamlösning(ar) I (enskilt ämne)	Mängd satt till 1 l vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	För beredning av den kombinerade stamlösningen II tillsätts följande mängd av stamlösning I till 1 l vatten (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-faldig	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-faldig	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-faldig	1,0	0,25

▼B

Stamlösning(ar) I (enskilt ämne)	Mängd satt till 1 l vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	För beredning av den kombinerade stamlösningen II tillsätts följande mängd av stamlösning I till 1 l vatten (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-faldig	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-faldig	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-faldig	1,0	0,25
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-faldig	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-faldig	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-faldig	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_20$	200	20 000-faldig	1,0	1,0
KI	65	20 000-faldig	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-faldig	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000-faldig	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-faldig	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-faldig	—	—

Både Na_2EDTA- och $FeSO_4$-lösningarna förbereds var för sig, hälls samman och autoklaveras omedelbart.

Detta ger:

21 Fe-EDTA-lösning		1 000-faldig	20,0	5,0

M4- och M7-medier

M4- och M7-medier bereds med stamlösning II, makro-näringsämnen och vitaminer enligt följande:

	Mängd tillsatt vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	Mängd stamlösning II som tillsätts för beredning av medium (ml/l)	
			M4	M7
Stamlösning II (kombinerad med spårelement)		20-faldig	50	50
Stamlösningar för makronäringsämnen (enskilt ämne)				
$CaCl_2\ .\ 2H_20$	293 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$MgSO_4\ .\ 7H_2O$	246 600	2 000-faldig	0,5	0,5
KC1	58 000	10 000-faldig	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3\ .\ 9H_2O$	50 000	5 000-faldig	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-faldig	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000-faldig	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-faldig	0,1	0,1

▼B

	Mängd tillsatt vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	Mängd stamlösning II som tillsätts för beredning av medium (ml/l)	
			M4	M7
Kombinerad vitaminstamlösning	—	10 000-faldig	0,1	0,1

Den kombinerade vitaminstamlösningen bereds genom tillsats av de tre vitaminerna till 1 l vatten, såsom visas nedan:

Tiaminhydroklorid	750	10 000-faldig		
Cyanokobalamin (B_{12})	10	10 000-faldig		
Biotin	7,5	10 000-faldig		

Den kombinerade vitaminstamlösningen lagras fryst i små alikvoter. Vitaminer sätts till medierna strax före användning.

Märk: För att undvika utfällning av salter vid beredning av kompletta medier ska alikvoter av stamlösningar sättas till cirka 500–800 ml avjonat vatten som sedan späds upp till 1 liter.

Märk: Den första publiceringen av M4-mediet finns i Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M1

C.3 BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS SÖTVATTENSALGER OCH CYANOBAKTERIER

1. METOD

Metoden motsvarar OECD TG 201 (2006) (1).

1.1 INLEDNING

Testmetoder utvärderas och moderniseras med jämna mellanrum som en anpassning till den vetenskapliga utvecklingen. Det var nödvändigt att revidera metoden C.3 för att ta med ytterligare arter och för att uppfylla kraven beträffande farobedömning och klassificering av kemikalier. Revideringen har gjorts på grundval av tre faktorer: en betydande praktisk erfarenhet, den vetenskapliga utvecklingen när det gäller toxicitetstester på alger, samt en omfattande användning av den tidigare versionen av dokumentet för normerande ändamål.

1.2 DEFINITIONER

I denna metodbeskrivning används följande definitioner och förkortningar:

biomassa: torrvikten av all levande substans i en population, uttryckt per volymenhet, t.ex. mg alger/liter testlösning. Biomassa definieras vanligen som en massa, men i det här testet används alltså i stället massa/volym. Begreppet biomassa används också i testet för att ange resultatet av alternativa mätmetoder, t.ex. cellräkning och mätning av fluorescens.

variationskoefficient: dimensionslöst mått på en parameters variabilitet, definierat som förhållandet mellan standardavvikelsen och medelvärdet. Detta kan också uttryckas i procent. Variationskoefficientens medelvärde för den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten i kontrollreplikaten beräknas enligt följande:

1. Beräkna variationskoefficienten (i procent) för den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten utifrån de dagliga sektionsvisa tillväxthastigheterna för respektive replikat.

2. Beräkna medelvärdet för alla värden som erhållits i punkt 1 för att få fram den genomsnittliga variationskoefficienten för den dagliga sektionsvisa specifika tillväxthastigheten i kontrollreplikaten.

EC_x: den koncentration av testsubstansen, löst i testmediet, som minskar testorganismens tillväxt med x % (t.ex. 50 %) inom en bestämd exponeringstid (som tydligt måste anges om man avviker från den fulla eller normala testperioden). För att man entydigt ska kunna skilja ett EC-värde som härletts ur tillväxthastigheten från ett som härletts ur den producerade mängden biomassa används symbolerna ”E_rC” resp. ”E_yC”.

odlingsmedium: det kompletta syntetiska medium som algerna växer i när de exponeras för testsubstansen. Testsubstansen är vanligen löst i testmediet.

tillväxthastighet (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): den logaritmiska ökningen av biomassan under exponeringstiden.

▼M1

lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC – ”Lowest Observed Effect Concentration”): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testsubstansen har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla koncentrationer av testsubstansen som överstiger LOEC måste dock ha en negativ effekt som är minst lika stor som den som observeras vid LOEC. Om dessa båda villkor inte är uppfyllda måste en fullständig redogörelse lämnas för hur LOEC (och därmed NOEC) har valts.

högsta koncentration utan observerad effekt (NOEC – ”No Observed Effect Concentration”): den koncentration av testsubstansen som ligger omedelbart under LOEC.

responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta parametrar för biomassa. I den aktuella testmetoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som erhålls genom att biomassan mäts antingen direkt eller genom någon av de angivna alternativa mätmetoderna.

specifik tillväxthastighet: responsvariabel som definieras som kvoten av skillnaden mellan de naturliga logaritmerna för en observerad parameter (i den här testmetoden: biomassa) och motsvarande tidsperiod.

producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden, använt som ett mått på ökningen av biomassa under testet.

1.3 TESTETS TILLÄMPLIGHET

Testmetoden är lättast att tillämpa på vattenlösliga ämnen som under testförhållandena sannolikt kommer att stanna kvar i vattnet. Om man i stället vill testa ämnen som är flyktiga, starkt adsorberande, färgade, svårlösliga i vatten eller som kan påverka tillgången på näringsämnen och mineraler i testmediet kan det krävas vissa modifieringar av den beskrivna metoden (t.ex. slutna system, andra typer av testkärl). Några exempel på lämpliga modifieringar ges i (2)(3) och (4).

1.4 TESTPRINCIP

Syftet med testet är att bestämma vilka effekter ett visst ämne har på tillväxten hos sötvattenslevande mikroalger och cyanobakterier. De exponentiellt växande testorganismerna exponeras för testsubstansen i batchkulturer under en tidsperiod på vanligen 72 timmar. Trots att testperioden är relativt kort kan effekterna på flera generationer bedömas.

Systemets respons innebär att tillväxten i en serie algkulturer (testenheter) som exponeras för olika koncentrationer av en testsubstans minskar. Responsen betraktas som en funktion av exponeringskoncentrationen jämfört med den genomsnittliga tillväxten för icke-exponerade kontrollreplikat. För att testsystemet ska kunna ge full respons på en toxisk testsubstans (optimal känslighet) får kulturerna tillväxa exponentiellt utan några begränsningar, samt med tillräcklig näringstillgång och i kontinuerligt ljus, under den tid som krävs för att minskningen i specifik tillväxthastighet ska bli mätbar.

▼**M1**

Tillväxtens och tillväxtminskningens storlek bestäms genom mätningar av algbiomassans förändring över tiden. Algbiomassa definieras som torrvikten alger per volymenhet, t.ex. mg alger/liter testlösning. Torrvikt är dock svårt att mäta, varför man kan använda sig av olika alternativa parametrar. Bland dessa är celltal vanligast. Andra alternativa parametrar är cellvolym, fluorescens och absorbans. Omräkningsfaktorn mellan uppmätt värde för den alternativa parametern och biomassa ska vara känd.

Som effektmått för testet används tillväxtminskning, där tillväxt definieras som den logaritmiska ökningen av biomassan (genomsnittlig specifik tillväxthastighet) under exponeringstiden. Från de genomsnittliga specifika tillväxthastigheter som uppmätts i en serie testlösningar beräknar man den koncentration av testsubstansen som ger upphov till en viss, fastställd minskning av tillväxthastigheten, x % (t.ex. 50 %). Värdet uttrycks som E_rC_x (t.ex. E_rC_{50}).

För tillämpning av denna metod inom ramen för EU-lagstiftningen bör resultatberäkningen baseras på en genomsnittlig specifik tillväxthastighet av de skäl som anges i avsnitt 2.2 nedan. I den här testmetoden används även producerad mängd biomassa som responsvariabel, något som kan vara nödvändigt för att uppfylla gällande krav i vissa länder. Denna responsvariabel definieras som skillnaden i biomassa mellan exponeringstidens början och slut. Med utgångspunkt i den mängd biomassa som producerats i en serie testlösningar beräknar man den koncentration av testsubstansen som ger upphov till en viss, fastställd minskning av mängden producerad biomassa, x % (t.ex. 50 %). Detta värde uttrycks som E_yC_x (t.ex. E_yC_{50}).

Den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) kan också bestämmas statistiskt.

1.5 TESTSUBSTANS

Uppgifter om testsubstansen kan vara av värde då man bestämmer testförhållandena. Exempel på sådana uppgifter är strukturformel, renhetsgrad, ljusbeständighet, stabilitet under testbetingelserna, ljusabsorberande förmåga, pKa, samt resultat från undersökningar av ämnets omvandling – bland annat genom biologisk nedbrytning – i vatten.

Testsubstansens vattenlöslighet, fördelningskoefficient oktanol/vatten (P_{ow}) och ångtryck ska vara kända, och det ska finnas en validerad metod för kvantitativ bestämning av ämnet i testlösningarna. Metodens utbyte och detektionsgräns ska vara kända.

1.6 REFERENSSUBSTANS

Referenssubstanser, t.ex. 3,5-diklorfenol, som används i det internationella ringtestet (4), kan testas för att kontrollera testförfarandet. För grönalger kan även kaliumdikromat användas som referenssubstans. Referenssubstanser bör testas minst två gånger per år.

1.7 RESULTATENS GILTIGHET

För att testresultaten ska vara giltiga måste följande villkor vara uppfyllda:

▼M1

— Biomassan i kontrollkulturerna ska ha ökat exponentiellt med minst en faktor 16 inom testperioden (72 timmar). Detta motsvarar en specifik tillväxthastighet på 0,92/dygn. De mest använda arterna har vanligen en betydligt högre tillväxthastighet (se tillägg 1). Kravet kan dock inte alltid uppfyllas när man använder sig av arter som växer långsammare än de i tillägg 1. Testperioden ska då förlängas så att man erhåller en minst 16-faldig tillväxt i kontrollkulturerna, och tillväxten måste vara exponentiell under hela testperioden. Testperioden kan även förkortas ända ner till 48 timmar om detta krävs för att uppnå obegränsad exponentiell tillväxt under testet. Ett villkor för detta är dock att tillväxten är minst 16-faldig.

— Variationskoefficientens medelvärde för sektionsvis specifika tillväxthastigheter (dag 0–1, 1–2 och 2–3 för 72-timmarstester) i kontrollkulturerna (se avsnitt 1.2 under ”variationskoefficient”) får inte överskrida 35 %. I andra stycket i avsnitt 2.2.1 beskrivs hur man beräknar sektionsvis specifik tillväxthastighet. Detta kriterium tillämpas på medelvärdet för de variationskoefficienter som räknats fram för kontrollreplikaten.

— I tester med *Pseudokirchneriella subcapitata* och *Desmodesmus subspicatus* får variationskoefficienten för genomsnittlig specifik tillväxthastighet i kontrollreplikaten inte överskrida 7 % under hela testperioden. För arter som inte används så ofta i testsammanhang får värdet inte överstiga 10 %.

1.8 METODBESKRIVNING

1.8.1 **Utrustning**

Testkärl och annan utrustning som kommer i kontakt med testlösningarna ska vara helt av glas eller annat kemiskt inert material. Utrustningen ska rengöras omsorgsfullt så att inga organiska eller oorganiska föroreningar påverkar algernas tillväxt eller testlösningarnas sammansättning.

Som testkärl används vanligen glaskolvar som rymmer en tillräckligt stor volym algkultur för att möjliggöra mätningar under testet. Kolvarna ska också medge ett tillräckligt högt utbyte av CO_2 med den omgivande luften (se andra stycket i avsnitt 1.8.9). Observera att vätskevolymen måste vara tillräckligt stor för analytiska bestämningar (se femte stycket i avsnitt 1.8.11).

Följande utrustning krävs också (helt eller delvis):

— Odlingsutrymme. Man bör använda ett odlingsskåp eller en odlingskammare där inkuberingstemperaturen kan regleras med en noggrannhet av ± 2 °C.

— Instrument för ljusmätning. Observera att mätvärdena för ljusintensitet påverkas av mätmetoden, särskilt typen av ljussensor. Mätningarna bör helst göras med en sfärisk (4 π) sensor (som mäter både direkt och reflekterat ljus från alla vinklar ovanför och under mätplanet), eller en 2 π-sensor (som mäter ljus från alla vinklar ovanför mätplanet).

▼M1

— Utrustning för att bestämma algbiomassa. Cellräkning, som är den oftast använda alternativa mätmetoden för algbiomassa, kan utföras med elektronisk partikelräknare, mikroskop utrustat med räknekammare eller flödescytometer. Andra alternativa parametrar för biomassa kan mätas med hjälp av flödescytometer, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter. Man bör helst ta reda på omräkningsfaktorn mellan celltal och torrvikt. När koncentrationen av biomassa är låg kan det vid spektrofotometriska mätningar vara nödvändigt att använda sig av kyvetter med en strålgång på minst 4 cm för att få fram användbara mätvärden.

1.8.2 **Testorganismer**

Ett stort antal arter av icke-fastsittande mikroalger och cyanobakterier kan användas för testet. En förteckning över lämpliga stammar återfinns i tillägg 1.

Om man använder sig av andra arter ska stammen och/eller ursprunget anges. Man måste också kunna visa att de alger som används kan tillväxa exponentiellt under hela testperioden vid rådande testförhållanden.

1.8.3 **Odlingsmedium**

Det rekommenderas att man använder antingen OECD eller AAP som odlingsmedium. Sammansättningen av dessa medier framgår av tillägg 2. Observera att de två medierna har olika utgångsvärde för pH och olika buffringsförmåga (motverkar pH-ökningar), vilket gör att de kan ge olika testresultat. Detta gäller särskilt när man testar joniserande ämnen.

Det kan ibland vara nödvändigt att modifiera odlingsmedierna, t.ex. då man testar metaller eller kelatbildare, eller då testerna görs vid skilda pH-värden. Man ska alltid ange skälen till en sådan modifiering, och det modifierade mediet ska beskrivas i detalj (3)(4).

1.8.4 **Biomassans startkoncentration**

Biomassans startkoncentration ska vara densamma för alla testkulturer. Den ska också vara tillräckligt låg för att möjliggöra exponentiell tillväxt under hela inkuberingen utan att några näringsämnen tar slut. Startvärdet får inte överskrida 0,5 mg/l, räknat på torrvikt. Följande cellkoncentrationer bör användas:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3–10^4	celler/ml
Desmodesmus subspicatus	2–5×10^3	celler/ml
Navicula pelliculosa	10^4	celler/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	celler/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4–10^5	celler/ml

1.8.5 **Testsubstansens koncentration**

Det koncentrationsintervall där det är troligt att testsubstansen ger effekter kan bestämmas på grundval av resultat från särskilda tester (”range-finding tests”). För det slutliga testet används minst fem koncentrationer i en geometrisk serie vars faktor inte överstiger 3,2. För testsubstanser med plan dos-respons-kurva kan det vara befogat att använda en högre faktor. Koncentrationsserien bör helst omfatta ett intervall som minskar tillväxthastigheten med 5–75 %.

▼M1

1.8.6 **Replikat och kontroller**

För varje koncentration av testsubstansen ska det finnas tre replikat. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas. Minst tre kontrollreplikat ska användas, och helst bör de vara dubbelt så många som antalet replikat för varje koncentration av testsubstansen.

En extra serie testlösningar kan beredas för analytisk bestämning av testsubstansens koncentration (se fjärde och sjätte stycket i avsnitt 1.8.11).

Om ett lösningsmedel används för testsubstansen måste man ta med ytterligare kontroller där koncentrationen av lösningsmedel är densamma som i testkulturerna.

1.8.7 **Beredning av ympkultur**

En ympkultur bereds i testmedium 2–4 dagar innan testet påbörjas. Syftet med detta är att algerna ska kunna anpassa sig till testförhållandena och befinna sig i exponentiell tillväxtfas när de senare ympas i testlösningarna. Algbiomassan regleras så att ympkulturen fortsätter att tillväxa exponentiellt till dess att testet inleds. Ympkulturen inkuberas under samma förhållanden som testkulturerna. En mätning görs av ökningen av ympkulturens biomassa, så att man kan förvissa sig om att tillväxten befinner sig inom det normala intervallet för den använda stammen under rådande odlingsbetingelser. I tillägg 3 ges ett exempel på en metod för algodling. Det kan krävas ett andra förökningssteg för ympkulturen om man vill undvika att celldelningarna under testet sker synkront.

1.8.8 **Beredning av testlösningar**

Alla testlösningar ska innehålla samma koncentration av odlingsmediet, och samma startkoncentration av algbiomassan. Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds vanligen genom att man blandar en stamlösning av testsubstansen med odlingsmedium och ympkultur. Stamlösningar brukar beredas genom att man löser ämnet i fråga i testmedium.

Lösningsmedel som aceton, tert-butylalkohol och dimetylformamid kan användas som bärare när man tillsätter ämnen med låg vattenlöslighet till testmediet (2)(3). Koncentrationen av lösningsmedel ska inte överstiga 100 µl/l, och det tillsatta lösningsmedlet ska vara av samma koncentration för alla kulturer (inklusive kontroller) i testserien.

1.8.9 **Inkubering**

Testkärlen försluts med luftgenomsläppliga proppar, skakas om, och placeras sedan i odlingsutrymmet. För att hålla algerna i suspension under hela testet och för att säkra ett tillräckligt stort utbyte av CO_2 måste kärlen hela tiden skakas eller innehållet röras om. Kulturerna inkuberas vid 21–24 °C, och temperaturen ska kunna regleras med en noggrannhet av ± 2 °C. När det gäller arter som inte förtecknas i tillägg 1 (t.ex. tropiska arter) kan det vara lämpligt med en högre temperatur. Detta förutsätter dock att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda. Kolvarna bör placeras slumpvis i inkubatorn och sedan flyttas om dagligen.

▼M1

Kontrollmediets pH får inte öka med mer än 1,5 enheter under testet. När det gäller metaller samt ämnen som delvis joniseras vid det använda pH-värdet, kan det vara nödvändigt att justera för pH-förändringar för att få fram reproducerbara och tydliga resultat. Det går att begränsa pH-svängningar till mindre än 0,5 enheter om man ser till att utbytet av CO_2 mellan testlösningen och den omgivande luften är tillräckligt högt, t.ex. genom att öka skakapparatens hastighet. En annan möjlighet är att reducera behovet av CO_2 genom att minska biomassans startkoncentration eller testets längd.

Den yta där kulturerna inkuberas ska kontinuerligt belysas med fluorescerande ljus av enhetligt slag, t.ex. kallt vitt ljus eller dagsljus. Olika stammar av alger och cyanobakterier kan ha olika ljuskrav, och ljusets intensitet ska anpassas efter den testorganism som används. För de rekommenderade grönalgsarterna ska intensiteten, mätt vid testlösningarna, ligga inom intervallet 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ när mätningen görs i det fotosyntetiskt verksamma våglängdsområdet 400–700 nm med lämplig sensor. Vissa arter, särskilt *Anabaena flos-aquae*, tillväxer utan problem vid låga ljusintensiteter och kan även skadas av höga intensiteter. För sådana arter ska den genomsnittliga ljusintensiteten ligga på 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (För mätinstrument som kalibrerats i lux motsvarar den rekommenderade ljusintensiteten 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ för kallt vitt ljus ungefär 4 440–8 880 lux.) Ljusintensiteten över inkuberingsytan får inte variera mer än ± 15 % jämfört med genomsnittsvärdet.

1.8.10 **Testets varaktighet**

Testet ska normalt pågå i 72 timmar. Man kan dock använda kortare eller längre testperioder, förutsatt att samtliga kriterier för testresultatens giltighet i avsnitt 1.7 är uppfyllda.

1.8.11 **Mätningar och analytiska bestämningar**

Algbiomassan i varje kolv bestäms minst en gång per dag under testperioden. Om mätningarna görs på små volymer som pipetterats från testlösningarna ska dessa volymer inte ersättas.

Biomassan bestäms genom manuell cellräkning i mikroskop eller med hjälp av en elektronisk partikelräknare (mätning av celltal eller biovolym). Alternativa metoder, t.ex. flödescytometri, klorofyllfluorescens *in vitro* eller *in vivo* (6)(7) och absorbans kan också användas, förutsatt att man kan påvisa en tillfredsställande korrelation med biomassan för de värden på densamma som kan förekomma i testet.

Lösningarnas pH mäts i början och slutet av testet.

Om det finns en analytisk bestämningsmetod för testsubstansen i det valda koncentrationsintervallet ska testlösningarna analyseras för att kontrollera startkoncentrationerna och för att se till att exponeringskoncentrationerna inte förändras under testet.

▼M1

Om det är troligt att exponeringskoncentrationerna under testet kommer att variera med mindre än 20 % från de nominella värdena kan det räcka med att man i början och slutet av testet bestämmer testsubstansens koncentration på tre nivåer: en hög koncentration, en låg koncentration, och en koncentration runt det förväntade EC_{50}-värdet. Om koncentrationerna av testsubstansen sannolikt inte kommer att hålla sig inom 80–120 % av de nominella värdena bör man i stället bestämma samtliga koncentrationer av testsubstansen vid testets början och slut. För flyktiga, instabila eller starkt adsorberande testsubstanser bör ytterligare prov för analys tas med 24 timmars mellanrum under hela exponeringstiden. På så vis får man ett säkrare mått på hur mycket testsubstans som försvinner. Sådana ämnen kräver också att man använder extra replikat. Under alla omständigheter behöver bestämningar av testsubstansens koncentration bara göras på ett replikatkärl för varje koncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat).

Testmedier som beretts särskilt för bestämning av exponeringskoncentrationer under testet ska behandlas på samma sätt som dem som används för tester, dvs. de ympas med alger och inkuberas under identiska förhållanden. Om den lösta testsubstansens koncentration måste bestämmas kan det vara nödvändigt att isolera algerna från mediet. Separeringen bör helst göras genom centrifugering vid lågt g-tal (men tillräckligt högt för att algerna ska kunna avskiljas).

Om man kan visa att testsubstansens koncentration under hela testet på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen, kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen är större än ± 20 % ska analysen i stället grunda sig på det geometriska medelvärdet för koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver hur testsubstansens koncentration minskar (3)(8).

Bestämning av tillväxthämning hos alger är en mer dynamisk metod än de flesta andra akvatiska toxicitetstester med kort testperiod. De faktiska exponeringskoncentrationerna kan därför vara svåra att bestämma, särskilt för adsorberande ämnen som testas vid låga koncentrationer. Om ämnet i sådana fall adsorberas till den ökande algbiomassan och därför inte längre återfinns i lösningen, innebär detta dock inte att ämnet försvinner från testsystemet. Vid analysen av testresultat ska man undersöka om en minskad koncentration av ämnet under testperioden kan korreleras med en reducerad tillväxthämning. Om så är fallet bör man överväga att genom en lämplig modell beskriva testsubstansens minskande koncentration (8). I annat fall kan det vara motiverat att basera resultatanalysen på testsubstansens nominella eller uppmätta startkoncentration.

1.8.12 **Övriga iakttagelser**

Kontrollera i mikroskop att ympkulturen ser normal och frisk ut. I slutet av testet ska man också notera eventuella avvikelser från normalt utseende (som kan ha orsakats av exponeringen för testsubstansen).

▼M1

1.8.13 **Gränstest**

Under vissa omständigheter, t.ex. när ett förberedande test tyder på att testsubstansen inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l – eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet, om denna gräns är lägre – kan man utföra ett gränstest. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller lika med löslighetsgränsen). Det rekommenderas starkt att jämförelsen kompletteras med en bestämning av exponeringskoncentrationen. Alla tidigare beskrivna testbetingelser och kriterier för provresultatens giltighet gäller även för gränstestet, sånär som på att testreplikaten ska vara minst sex till antalet. Responsvariablerna i kontroll- och testgruppen kan analyseras med hjälp av ett statistiskt test där man jämför medelvärden, t.ex. Students t-test. Om de två grupperna inte har samma varians måste t-testet anpassas efter detta.

1.8.14 **Anpassning för starkt färgade ämnen**

Bestrålningen (ljusets intensitet) bör ligga i den övre delen av det intervall som beskrivs i denna testmetod, dvs. 120μE m-2 s-1 eller högre.

Strålgången bör kortas genom att lösningarnas volym minskas (med mellan 5 och 25 ml).

Man bör sörja för tillräcklig omrörning (till exempel genom måttlig skakning) så att algerna frekvent utsätts för hög ljusbestrålning vid odlingens yta.

2. **DATA**

2.1 PLOTTNING AV TILLVÄXTKURVOR

Mängden biomassa i testkärlen kan uttryckas i enheten för den alternativa parameter som använts vid mätningen (t.ex. celltal, fluorescens).

De framräknade värdena för biomassans koncentration i testkulturer och kontroller förs in i en tabell, tillsammans med testmaterialets koncentrationer och mättidpunkterna (noterade med en upplösning på minst hela timmar). Tabellvärdena används sedan för att ta fram plottade tillväxtkurvor. Både logaritmiska och linjära skalor kan vara användbara på detta inledande stadium, men logaritmiska skalor är obligatoriska, och de ger också i allmänhet en bättre uppfattning om variationer i tillväxtmönstret under testperioden. Observera att exponentiellt ökande mätvärden ger en rak linje när de plottas på en logaritmisk skala, och att kurvans lutning anger den specifika tillväxthastigheten.

Kontrollera med hjälp av plottarna om kontrollkulturerna har tillväxt exponentiellt och med förväntad hastighet under hela testet. Alla datapunkter och kurvor bör undersökas kritiskt, och rådata samt metoder bör kontrolleras med avseende på eventuella fel. Kontrollera särskilt alla datapunkter som verkar avvika på grund av systematiska fel. Om man konstaterar uppenbara eller mycket sannolika fel i testutförandet ska de berörda datapunkterna markeras som avvikande värden (”outliers”) och inte tas med i den efterföljande statistiska analysen. (Om algkoncentrationen är noll i hälften eller en tredjedel av kärlen med replikat kan detta tyda på att kärlen inte ympats på rätt sätt eller inte rengjorts ordentligt.) Det ska tydligt framgå av testrapporten varför en datapunkt betraktats som avvikande och därför inte använts. Det enda giltiga skälet är (enstaka) misstag i utförandet av testet. Dålig precision räknas däremot inte som ett giltigt skäl. Statistiska metoder för att identifiera avvikande värden är av begränsat värde när det gäller den här typen av problem, och de kan inte ersätta expertbedömningar. Avvikande värden (som markerats som sådana) bör helst behållas bland de datapunkter som visas i senare presentationer av data i grafisk form eller tabellform.

▼M1

2.2 RESPONSVARIABLER

Syftet med testet är att bestämma testsubstansens effekt på tillväxten hos alger. Eftersom olika medlemsländer har olika prioriteringar och bestämmelser används två responsvariabler, a och b. Effekten ska bedömas med båda variablerna för att testresultaten ska kunna godtas i alla medlemsländer.

a) Genomsnittlig specifik tillväxthastighet: responsvariabel som beräknas utifrån den logaritmiska ökningen i biomassa under testperioden, uttryckt per dygn.

b) Producerad mängd biomassa: responsvariabel som motsvarar skillnaden mellan den ursprungliga mängden biomassa och biomassan vid testets slut.

För tillämpning av denna metod inom ramen för EU-lagstiftningen bör resultatberäkningen baseras på en genomsnittlig specifik tillväxthastighet av de skäl som anges nedan. Observera att toxicitetsvärden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad måste framgå när man tillämpar testresultaten. Om testet utförts på det sätt som beskrivs i den här handledningen kommer EC_x-värden baserade på genomsnittlig specifik tillväxthastighet (E_rC_x) vanligen att ligga högre än sådana värden som grundar sig på producerad mängd biomassa (E_yC_x). Detta ska dock inte tolkas som skillnader i känslighet mellan de två responsvariablerna; avvikelserna beror i stället på att de båda metoderna är olika matematiskt konstruerade. Variabeln genomsnittlig specifik tillväxthastighet är baserad på den (vanligen exponentiella) tillväxten hos alger i obegränsade kulturer, där toxiciteten bestäms på grundval av dess effekter på tillväxthastigheten, utan att vara beroende av vare sig det absoluta värdet på kontrollens specifika tillväxthastighet, på dos-respons-kurvans lutning, eller på testets varaktighet. Resultat som i stället grundar sig på producerad mängd biomassa är däremot beroende av alla dessa övriga variabler. E_yC_x är beroende av den specifika tillväxthastigheten för den algart som används i varje enskilt test samt av den maximala specifika tillväxthastigheten – som kan variera mellan olika arter och t.o.m. mellan olika stammar av en och samma art. Denna responsvariabel ska därför inte användas för att jämföra känsligheten för toxiska ämnen mellan arter eller stammar. Det är ur vetenskaplig synvinkel att föredra om toxiciteten bestäms utifrån den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten. På grund av gällande bestämmelser i vissa länder omfattar den här testmetoden dock även toxicitetsbestämningar baserade på producerad mängd biomassa.

2.2.1 **Genomsnittlig tillväxthastighet**

Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten under en period beräknas som den logaritmiska ökningen i biomassa för varje enskilt kärl med kontroller och testlösningar, enligt formeln:

$$\mu_{i\text{-}j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (dygn}^{-1}\text{)}$$

där:

μ_{i-j}: genomsnittlig specifik tillväxthastighet under tidsperioden *i–j*;

X_i: biomassa vid tidpunkten *i*

X_j: biomassa vid tidpunkten *j*

▼M1

För varje test- och kontrollgrupp ska ett medelvärde för tillväxthastigheten liksom en uppskattning av variansen räknas fram.

Beräkna den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för hela testperioden, dvs. vanligen dag 0–3. Som startvärde används det nominella värdet för ympad biomassa. (Motsvarande uppmätta värde ska inte användas eftersom det minskar precisionen.) Om utrustningen för mätning av biomassa (t.ex. flödescytometer) ger ett tillräckligt noggrant värde på den lilla mängd som ympats, kan biomassans uppmätta startkoncentration användas. Bestäm också den sektionsvisa tillväxthastigheten genom att beräkna den specifika tillväxthastigheten för varje dag under hela testperioden (dag 0–1, 1–2 och 2–3), och undersök om kontrollens tillväxthastighet förblir konstant (se kriterierna för testresultatens giltighet i avsnitt 1.7). En påtagligt lägre specifik tillväxthastighet dag ett jämfört med totalvärdet för genomsnittlig specifik tillväxthastighet kan tyda på att kulturen befinner sig i lagfas. I kontrollkulturer kan lagfasen praktiskt taget elimineras genom att förkulturen förökas på lämpligt sätt. I exponerade kulturer kan en lagfas däremot tyda på att algerna återhämtar sig efter inledande toxisk stress eller på att exponeringen minskat på grund av förlust av testsubstans (t.ex. genom adsorption till algbiomassan) efter den inledande exponeringen. Den sektionsvisa tillväxthastigheten kan därför användas när man bestämmer testsubstansens effekter under exponeringstiden. Stora skillnader mellan den sektionsvisa tillväxthastigheten och den genomsnittliga tillväxthastigheten tyder på att tillväxten inte varit konstant exponentiell. I sådana fall bör tillväxtkurvorna undersökas noggrant.

Beräkna den procentuella minskningen av tillväxthastigheten för varje replikat med testlösning, genom formeln:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

där:

$\%I_r$: procentuell minskning av genomsnittlig specifik tillväxthastighet,

μ_C: medelvärdet för genomsnittlig specifik tillväxthastighet (μ) i kontrollgruppen,

μ_T: genomsnittlig specifik tillväxthastighet för replikatet med testlösning.

Om man använder sig av lösningsmedel vid beredning av testlösningarna ska man vid beräkningen av procentuell tillväxthämning jämföra de erhållna värdena med motsvarande värden för kontroller som också innehåller lösningsmedel.

2.2.2 **Producerad mängd biomassa**

Den producerade mängden biomassa motsvarar biomassan i slutet av testet minus den ursprungliga biomassan. Beräkningen görs för varje enskilt kärl med kontroller och testlösningar. För varje koncentration av testsubstans och kontroll ska ett medelvärde för producerad mängd biomassa liksom en uppskattning av variansen räknas fram. Den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa ($\%I_y$) beräknas för varje replikat med testlösning genom formeln:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

där:

$\% I_y$: procentuell minskning av producerad mängd biomassa,

Y_C: medelvärdet för producerad mängd biomassa i kontrollgruppen,

Y_T: producerad mängd biomassa i replikatet med testlösning.

2.3 PLOTTNING AV DOS-RESPONS-KURVA

Plotta den procentuella tillväxthämningen mot logaritmen för testsubstansens koncentration och undersök plotten noggrant. Datapunkter som konstaterats vara avvikande i den första fasen ska inte beaktas. För att man ska få en preliminär uppfattning om förhållandet mellan koncentration och respons sammanbinds datapunkterna genom en mjuk linje, antingen på fri hand eller med hjälp av datorbaserad interpolation. Använd därefter en mer ingående metod, helst en datorbaserad statistisk sådan. Beroende på ett flertal faktorer – t.ex. avsett användningsområde för data, datakvalitet (precision), datamängd, tillgängliga analysverktyg för data – kan man (ibland med goda skäl) bestämma sig för att avsluta utvärderingen av data på det här stadiet och enbart avläsa nyckelvärdena EC_{50} och EC_{10} (och/eller EC_{20}) från den frihandsritade kurvan (se även avsnittet om tillväxtstimulering nedan). Det finns flera giltiga skäl för att inte använda en statistisk metod, bland annat:

— Det är inte troligt att man utifrån befintliga data får fram mer pålitliga resultat med hjälp av datorbaserade metoder än genom expertbedömningar. I sådana situationer kan det t.o.m. hända att vissa dataprogram ger ett helt opålitligt resultat (iterationer kanske inte konvergerar t.ex.).

— Stimulerande tillväxtresponser kan inte hanteras på lämpligt sätt av programvaran (se nedan).

2.4 STATISTISK BEHANDLING

Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (9). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oundvikliga oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli uppförstorade genom linjäriseringen och därigenom störa analysen (9). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit-, eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, t.ex. dödlighet–överlevnad) och därför måste modifieras för att kunna användas för data om tillväxt eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (10)(11) och (12). Tillämpningen av icke-linjär regressionsanalys beskrivs utförligare i tillägg 4.

▼M1

För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x-värden. Om möjligt ska den 95-procentiga konfidensgränsen bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper. Om det är svårt eller omöjligt att göra en icke-linjär kurvanpassning på grund av alltför stor spridning i data kan man i stället göra regressionen utifrån gruppmedelvärden. Detta är en praktisk metod för att minska påverkan från misstänkta avvikande värden. Om man använder sig av denna möjlighet ska det tas med i testrapporten som en avvikelse från det normala förförandet, och motiveras med att kurvanpassningar med enskilda replikat inte gav tillfredsställande resultat.

När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan EC_{50}-skattningar och konfidensgränser också erhållas genom linjär interpolation med s.k. bootstrapping (13).

För skattningar av LOEC (och därmed även av NOEC) och av testsubstansens inverkan på tillväxthastigheten jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (14, 15, 16, 17 och 18). Man måste avgöra om ANOVA-kriteriet om varianshomogenitet är uppfyllt. Detta kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (18), t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle kriteriet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga att göra analysen med t.ex. Jonkheeres trendtester av ”step-down”-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (12).

Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värden. I stället rekommenderas att man använder punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta algtest har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} bör anges i testrapporten.

2.5 TILLVÄXTSTIMULERING

Ibland förekommer tillväxtstimulering (negativ hämning) vid låga koncentrationer. Detta kan antingen bero på hormesis (”toxisk stimulering”) eller på att stimulerande tillväxtfaktorer överförts från testmaterialet till det minimalmedium som används. Observera att tillsats av oorganiska näringsämnen inte bör ha någon direkt effekt, eftersom testmediet innehåller ett överskott av näringsämnen i förhållande till algernas behov under testperioden. Vid beräkningen av EC_{50} kan man vanligen bortse från stimulering vid låga koncentrationer, såvida inte stimuleringen är extremt stor. I det senare fallet – samt då man beräknar EC_x för låga värden på x – kan det krävas särskilda åtgärder. Man ska så långt det är möjligt ta med stimulerande responser vid analysen av data, och om befintliga dataprogram för kurvanpassning inte kan hantera låggradig stimulering kan man i stället använda sig av linjär interpolation med bootstrapping. Om stimuleringen är extremt stor kan man överväga att använda en hormesis-modell (19).

▼M1

2.6 ICKE-TOXISK TILLVÄXTHÄMNING

Ljusabsorberande testmaterial kan påverka tillväxthastigheten negativt eftersom de minskar mängden tillgängligt ljus. Sådana fysikaliska effekter måste kunna särskiljas från toxiska effekter genom att man ändrar testförhållandena, och fysikaliska effekter ska rapporteras separat. Riktlinjer återfinns i (2) och (3).

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testsubstans:

— fysikalisk form samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, inbegripet löslighetsgräns i vatten,

— kemiska identifieringsuppgifter, inklusive renhetsgrad.

Testart:

— stam, leverantör eller ursprung, samt odlingsförhållanden.

Testförhållanden:

— datum då testet inleds samt dess varaktighet,

— testets upplägg: testkärl, kulturernas volym, biomassans koncentration i början av testet,

— mediets sammansättning,

— testsubstansens koncentrationer, replikat (t.ex. antal replikat, antal koncentrationer av testsubstansen samt geometrisk serie),

— metod för beredning av testlösningar, inbegripet användning av lösningsmedel m.m.,

— odlingsutrymme,

— ljusets intensitet och kvalitet (ljuskälla, homogenitet),

— temperatur,

— koncentrationer som använts i testet: de nominella koncentrationerna av testsubstansen och samtliga resultat från bestämningar av testsubstansens koncentration i testkärlen; metodens utbyte och bestämningsgräns i matrisen,

— alla avvikelser från testmetoden,

— metod för bestämning av biomassa, samt belägg för att det finns en korrelation mellan den uppmätta parametern och biomassans torrvikt.

Resultat:

— pH-värden vid testets början och slut i alla testlösningar,

— biomassa för varje kolv och varje mätpunkt, samt metod för att mäta biomassa,

▼M1

— tillväxtkurvor (plott där biomassan avsatts mot tiden),

— responsvariabler som beräknats för varje replikat med testlösning, med medelvärden och variationskoefficient för replikat,

— grafisk framställning av förhållandet mellan koncentration och effekt,

— toxicitetsbestämningar för responsvariablerna, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20} samt dithörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen,

— om ANOVA-metoder använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad),

— alla belägg för tillväxtstimulering i någon av testlösningarna,

— övriga observerade effekter, t.ex. morfologiska förändringar hos algerna,

— analys av testresultaten, liksom en bedömning av hur de kan ha påverkats av eventuella avvikelser från testmetoden.

4. **LITTERATUR**

1. OECD TG 201 (2006). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

2. ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

3. OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, nr 23.

4. ISO 1998: Water quality – Sampling – Del 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

5. ISO 1993: Water quality – Algal growth inhibition test. ISO 8692.

6. Mayer, P., Cuhel, R. och Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31, 2525–2531.

7. Slovacey, R.E. och Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), 919–925.

8. Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. och Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem. 22, 2073–2079.

9. Christensen, E.R. och Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713–718.

▼**M1**

10. Nyholm, N., Sørensen, P.S., Kusk, K.O. och Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157–167.

11. Bruce, R.D. och Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.

12. OECD (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

13. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.

14. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50, 1096–1121.

15. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482–491.

16. Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117.

17. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 510–531.

18. Draper, N.R. och Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, 2:a uppl. Wiley, New York.

19. Brain P. och Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research 29, 93–96.

▼M1

Tillägg 1

Rekommenderade stammar

Grönalger

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (äldre namn: *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (äldre namn: *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Kiselalger

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobakterier

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Stammarnas ursprung

De rekommenderade stammarna finns att tillgå som monokulturer från följande samlingar (alfabetisk ordning):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110–2209

FÖRENTA STATERNA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

STORBRITANNIEN

SAG: Sammlung von Algenkulturen

Albrecht-von-Haller-Institut

Universität Göttingen

Nikolausberger Weg 18

37073 Göttingen

TYSKLAND

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

FÖRENTA STATERNA

▼M1

Form och övriga egenskaper hos rekommenderade arter

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Form	Böjda och vridna enskilda celler	Ovala, vanligen enskilda celler	Stavar	Kedjor av ovala celler	Stavar
Storlek (längd × bredd) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volym (μm^3/cell)	40–60 (*)	60–80 (*)	40–50 (*)	30–40 (1)	2,5 (2)
Torrvikt (mg/cell)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Tillväxthastighet (3) (/dygn)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Uppmätt med elektronisk partikelräknare.
(2) Beräknat på grundval av storleken.
(3) Den vanligast observerade tillväxthastigheten i OECD-medium vid en ljusintensitet på ungefär 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ och temperaturen 21 °C.

Särskilda rekommendationer om odling och hantering av rekommenderade testarter

Pseudokirchneriella subcapitata och *Desmodesmus subspicatus*

Dessa grönalger brukar vara lätta att hålla i olika odlingsmedier. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna. Cellerna är vanligen enskilda, och celltätheten kan enkelt bestämmas med hjälp av elektronisk partikelräknare eller mikroskop.

Anabaena flos-aquae

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Det är mycket viktigt att batchkulturen fortfarande befinner sig i logfas då den förnyas, eftersom den annars har svårt att återhämta sig.

Anabaena flos-aquae bildar aggregat bestående av hopnystade kedjor av celler. Aggregatens storlek kan variera beroende på odlingsförhållandena. Om biomassan bestäms genom räkning i mikroskop eller med hjälp av en elektronisk partikelräknare kan det vara nödvändigt att först bryta sönder aggregaten.

Sonikering av prov kan användas för att bryta sönder kedjor av celler och därigenom minska variabiliteten vid räkning. Längre sonikering än vad som krävs för att bryta sönder kedjorna i småfragment kan dock förstöra cellerna. Sonikeringens intensitet och varaktighet ska vara densamma för varje testlösning.

Räkna tillräckligt många fält på hemocytometern (minst 400 celler) för att kompensera för variabiliteten. På så vis ökar tillförlitligheten hos de mikroskopiska täthetsbestämningarna.

Den totala cellvolymen för *Anabaena* kan bestämmas med hjälp av en elektronisk partikelräknare. Först måste dock cellkedjorna brytas sönder genom försiktig sonikering. Anpassa sonikeringsenergin så att cellerna inte sprängs.

Använd vortexblandare eller liknande för att se till att den algsuspension som används för att ympa testkärlen är väl blandad och har homogen konsistens.

▼M1

Testkärlen placeras i ett skakbord med rund- eller längsgående rörelse, hastighet ca 150 rpm. Ett alternativ är att man med jämna mellanrum skakar kärlen för att undvika att *Anabaena* bildar klumpar. Om sådana ändå bildas måste man se till att de prov som tas för mätning av biomassa är representativa. Det kan vara nödvändigt att skaka kärlen kraftigt före provtagning för att klumparna ska lösas upp.

Synechococcus leopoliensis

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna.

Synechococcus leopoliensis växer som enskilda, stavformiga celler. Cellerna är mycket små, vilket försvårar bestämning av biomassan genom räkning av celler i mikroskop. Elektroniska partikelräknare anpassade för partiklar ned till ung. 1 μm kan användas, och man kan även göra fluorimetriska mätningar *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna. Observera att mediet måste innehålla silikat.

Navicula pelliculosa kan under vissa odlingsförhållanden bilda aggregat. Detta beror på att fett som producerats av algerna ansamlas i en ytfilm till vilken de enskilda algcellerna lätt vidhäftas. När detta sker måste man se till att de prov som tas för bestämning av biomassa är representativa, t.ex. genom kraftig skakning i vortexblandare.

▼M1

Tillägg 2

Odlingsmedier

Man kan välja mellan två odlingsmedier:

OECD-medium: originalmedium enligt OECD TG 201, samt enligt ISO 8692

AAP-medium enligt amerikanska naturvårdsverket (EPA), samt enligt ASTM

Medierna bereds med kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet samt avjonat vatten.

Sammansättning av AAP-medium (enl. EPA) och OECD TG 201-medium

Kemikalie	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Det molara förhållandet mellan EDTA och järn ska vara något större än 1. På så vis förhindras utfällning av järn samtidigt som kelateringen av tungmetalljoner minimeras.

I testet med kiselalgen *Navicula pelliculosa* berikas båda medierna med $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ så att koncentrationen av kisel (Si) blir 1,4 mg/l.

Mediets pH hålls i jämvikt genom karbonatsystemet i mediet och partialtrycket för CO_2 i den omgivande luften. Ett ungefärligt förhållande mellan pH vid 25 °C och den molara koncentrationen av bikarbonat ges av formeln:

$$PH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼**M1**

Med 15 mg $NaHCO_3$/l är pH_{eq} = 7,5 (AAP-medium enl. EPA), och med 50 mg $NaHCO_3$/l är pH_{eq} = 8,1 (OECD-medium).

Testmediernas grundämnessammansättning

Grundämne	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Beredning av OECD-medium

Näringsämne	Koncentration i stamlösningen
Stamlösning 1: makronäringsämnen	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Stamlösning 2: järn	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Stamlösning 3: mikronäringsämnen	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Stamlösning 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Sterilisera stamlösningarna genom membranfiltrering (genomsnittlig pordiameter 0,2 μm) eller autoklavering (120 °C, 15 min). Lösningarna förvaras i mörker vid 4 °C.

Stamlösningarna 2 och 4 ska inte autoklaveras. De steriliseras i stället genom membranfiltrering.

▼**M1**

Odlingsmediet bereds genom att man tillsätter lämpliga volymer av stamlösningarna 1–4 till vatten.

Till 500 ml sterilt vatten tillsätts:

— 10 ml av stamlösning 1

— 1 ml av stamlösning 2

— 1 ml av stamlösning 3

— 1 ml av stamlösning 4

Späd till 1 000 ml med sterilt vatten.

Vänta till dess att mediet befinner sig i jämvikt med den omgivande luften med avseende på CO_2. Vid behov kan processen påskyndas genom att mediet bubblas med steril, filtrerad luft i några timmar.

Beredning av AAP-medium

A1.1 Tillsätt 1 ml av var och en av stamlösningarna i A1.2.1–A1.2.7 till ung. 900 ml avjonat eller destillerat vatten och späd till 1 liter.

A1.2 Stamlösningar med makronäringsämnen bereds genom att kemikalierna nedan löses i 500 ml avjonat eller destillerat vatten. Reagenserna A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 och A1.2.4 kan kombineras till en stamlösning.

A1.2.1 $NaNO_3$ – 12,750 g

A1.2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g

A1.2.3 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g

A1.2.4 *Stamlösning med mikronäringsämnen* – (se A1.3)

A1.2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 g

A1.2.6 K_2HPO_4 – 0,522 g

A1.2.7 $NaHCO_3$ – 7,500 g

A1.2.8 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – se anm. A1.1

Anm.; A1.1 – Används bara för kiselalger. Kemikalien kan tillsättas direkt (202,4 mg) eller via en stamlösning. Slutkoncentrationen av kisel (Si) i mediet ska i båda fallen vara 20 mg/l.

A1.3 Stamlösningen med mikronäringsämnen bereds genom att kemikalierna nedan löses i 500 ml avjonat eller destillerat vatten.

A1.3.1 H_3BO_3 – 92,760 mg

A1.3.2 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 207,690 mg

A1.3.3 $ZnCl_2$ – 1,635 mg

A1.3.4 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 79,880 mg

A1.3.5 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,714 mg

A1.3.6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,630 mg

A1.3.7 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,006 mg

A1.3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ – 150,000 mg

[dinatrium(etylendinitril)tetraacetat]

▼**M1**

A1.3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005 mg. Se anm. A1.2.

Anm.; A1.2 – Används bara för stamkulturer av kiselalger.

A1.4 Justera pH till 7,5 ± 0,1 med 0,1 *N* eller 1,0 *N* NaOH eller HCl.

A1.5 Om man använder sig av en elektronisk partikelräknare ska mediet filtreras över till ett sterilt kärl genom ett membranfilter med en pordiameter på 0,22 µm. Om partikelräknare inte används ska filtrets pordiameter i stället vara 0,45 µm.

A1.6 Mediet lagras i mörker vid ungefär 4 °C tills det används.

▼M1

Tillägg 3

Exempel på en metod för algodling

Allmänna påpekanden

Syftet med odlingen är att få fram algkulturer för toxicitetstester.

Man måste vidta lämpliga åtgärder för att förhindra att algkulturerna kontamineras med bakterier. Utgångsmaterialet ska bestå av monokulturer, och helst axeniska sådana.

Alla moment ska utföras under sterila förhållanden för att undvika kontaminering med bakterier eller andra alger.

Utrustning och material

Se avsnitt 1.8.1.

Odling av algkulturer

Beredning av näringslösningar (näringsmedier):

Alla närsalter i mediet bereds som koncentrerade stamlösningar och lagras i mörker vid låg temperatur. Lösningarna steriliseras genom filtrering eller autoklavering.

Mediet bereds genom att man tillsätter angiven mängd stamlösning till sterilt destillerat vatten. Kontaminering med mikroorganismer måste undvikas. För fasta medier tillsätts 0,8 % agar.

Stamkultur:

Stamkulturerna är små algkulturer som används som utgångsmaterial för tester. De ska med jämna mellanrum överföras till färskt odlingsmedium. Om kulturerna inte används regelbundet ska de strykas ut på böjda agarrör. Dessa överförs till färskt medium minst en gång varannan månad.

Stamkulturerna odlas i E-kolvar med lämpligt medium (volym ca 100 ml). Om algerna inkuberas vid 20 °C i kontinuerligt ljus måste överföringar göras en gång i veckan.

Vid detta moment överför man med hjälp av en steril pipett en viss mängd ”gammal” kultur till en kolv med färskt medium. Startkoncentrationen för snabbväxande arter ska vara ungefär 100 gånger lägre än i den gamla kulturen.

Tillväxthastigheten för en viss art kan bestämmas med hjälp av tillväxtkurvan. Med hjälp av detta värde kan man sedan räkna fram vid vilken celltäthet kulturen ska överföras till nytt medium. Detta måste göras innan kulturen når deklinationsfasen.

Förkultur:

Avsikten med förkulturen är att få fram alger som är lämpliga för ympning av testkulturer. Förkulturen inkuberas under testbetingelser och används medan den ännu befinner sig i exponentiell tillväxtfas, vanligen efter en inkuberingstid på 2–4 dagar. Algkulturer som innehåller deformerade eller avvikande celler slängs.

▼M1

Tillägg 4

Analys av data med icke-linjär regression

Allmänna påpekanden

Responsen i algtester och andra tester som gäller mikrobiologisk tillväxt (en typ av biomassetillväxt) är per definition en kontinuerlig, eller metrisk, variabel. Det rör sig om hastigheten hos en process i de fall man mäter tillväxthastighet, och integralen av motsvarande kurva om man i stället mäter biomassa. Båda variablerna jämförs sedan med motsvarande genomsnittsrespons för icke-exponerade kontrollreplikat som uppvisar maximal respons under de rådande förhållandena – med ljus och temperatur som viktigaste faktorer i algtestet. Systemet kan vara uppdelat eller homogent, och biomassan kan anses utgöra en helhet där man inte behöver ta hänsyn till enskilda celler. Variansfördelningen för responsen i ett sådant system beror uteslutande på experimentella faktorer (där felen vanligen är lognormalfördelade eller normalfördelade). Detta ska jämföras med typiska responser i biologiska tester med dikotoma data, där toleransen (som vanligen är binomialfördelad) hos enskilda organismer ofta antas vara det dominerande elementet i variansen. Responsen i kontrollerna är i detta fall noll eller har samma värde som bakgrundsnivån.

I det enklaste fallet minskar den normaliserade eller relativa responsen r monotont från värdet 1 (ingen tillväxthämning) till 0 (100 % tillväxthämning). Man bör vara medveten om att alla responser innehåller fel, och att uppenbar negativ hämning vid beräkningen uteslutande anses bero på slumpmässiga fel.

Regressionsanalys

Modeller

Syftet med en regressionsanalys är att kvantitativt beskriva dos-respons-kurvan i form av en matematisk regressionsfunktion, $Y = f(C)$ eller – vanligare – $F(Z)$, där $Z = \log C$. Använd på motsatt sätt kan funktionen $C = f^{-1}(Y)$ utnyttjas för beräkning av EC_x-värden, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20}, samt motsvarande 95-procentiga konfidensgränser. Ett flertal enkla matematiska funktioner har visat sig vara lämpliga för att beskriva förhållandet mellan koncentration och respons vid bestämning av tillväxthämning hos alger, t.ex. den logistiska ekvationen, den icke-symmetriska Weibull-ekvationen samt funktionen för lognormalfördelning. De är alla sigmoida kurvor som asymptotiskt närmar sig värdet 1 då $C \rightarrow 0$, och värdet 0 då $C \rightarrow$ oändligheten.

Ett nyligen framlagt alternativ till asymptotiska modeller är modeller som bygger på kontinuerliga tröskelfunktioner (t.ex. Kooijman-modellen för tillväxthämning avseende populationer, se Kooijman et al. 1996). Modellen bygger på antagandet att effekten under ett visst tröskelvärde EC0+ är noll. Detta tröskelvärde bestäms genom extrapolation av dos-respons-kurvan till den punkt där den korsar koncentrationsaxeln. Man använder sig då av en enkel kontinuerlig funktion som inte är differentierbar i startpunkten.

Observera att analysen kan bestå av en enkel minimering av residualkvadratsummor (om man antar att variansen är konstant) eller av viktade kvadrater, om man kompenserar för variansens heterogenitet.

▼M1

Förfarande

Förfarandet är i korthet följande: Välj en lämplig funktion, Y = f (C), och anpassa den till data genom icke-linjär regression. För att man ska kunna få ut så mycket information som möjligt från mätdata bör man använda mätvärden från varje enskild kolv i stället för medelvärden för samtliga replikat. Om variansen å andra sidan är hög visar erfarenheten att medelvärden för replikaten troligen kan ge en matematisk uppskattning som är mer tillförlitlig och mindre påverkad av slumpmässiga fel i data, än en metod där man behåller varje enskild datapunkt.

Plotta den anpassade kurvan och erhållna mätdata, och kontrollera att kurvans anpassning är godtagbar. Analys av residualer kan vara ett mycket värdefullt hjälpmedel i sammanhanget. Om den valda funktionen för anpassning av dos-respons-kurvan ger en otillfredsställande beskrivning av hela kurvan eller en väsentlig del av denna, t.ex. responsen vid låga koncentrationer, bör man välja en annan typ av kurvanpassning som inte är symmetrisk, t.ex. Weibull-funktionen. Negativ hämning kan ge problem då man använder sig av t.ex. funktionen för lognormalfördelning. Också i detta fall bör man välja en alternativ regressionsfunktion. Det är inte lämpligt att sådana negativa värden tilldelas värdet noll eller ett lågt positivt värde eftersom detta rubbar felfördelningen. Det kan vara befogat att göra separata anpassningar för olika delar av kurvan. Exempelvis kan värdet på $EC_{low\ x}$ uppskattas från den del av kurvan där tillväxthämningen är låg. Beräkna från den anpassade ekvationen (genom ”omvänd uppskattning”, $C = f^{-1}(Y)$), karaktäristiska punktskattningar för EC_x-värden. I rapporten ska åtminstone EC_{50} samt en eller två uppskattningar av $EC_{low\ x}$ tas med. Den praktiska erfarenheten har visat att algtestet vanligen medger en rimligt noggrann uppskattning vid 10 % tillväxthämning, förutsatt att det finns tillräckligt många datapunkter. Undantaget är de fall är då tillväxtstimulering skett vid låga koncentrationer av testsubstansen. Uppskattningar av EC_{20} brukar ha betydligt högre precision än uppskattningar av EC_{10}, eftersom EC_{20} vanligen befinner sig på den approximativt linjära delen av den centrala dos-respons-kurvan. Ibland kan EC_{10}-värden vara svåra att tolka på grund av tillväxtstimulering, så trots att man vanligen får fram EC_{10} med tillräckligt hög precision bör EC_{20} också alltid rapporteras.

Viktningsfaktorer

Eftersom den experimentella variansen vanligen inte är konstant och normalt sett innehåller en proportionell komponent bör man rutinmässigt göra en viktad regression. Viktningsfaktorerna vid en sådan analys antas vanligen vara omvänt proportionella mot variansen:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Många regressionsprogram har en funktion för viktad regressionsanalys där viktningsfaktorerna tas från en tabell. Det är lämpligt att man normaliserar viktningsfaktorerna genom att multiplicera dem med $n/\sum w_i$ (där n är antalet datapunkter) så att summan av dem blir ett.

Normalisering av responser

Normalisering med genomsnittsresponsen för kontrollerna innebär vissa principiella problem, och leder också till en ganska komplicerad variansstruktur. Om man delar responsvärdena med medelvärdet för kontrollernas responser för att få fram den procentuella tillväxthämningen, inför man samtidigt ett nytt fel på grund av det fel som är kopplat till medelvärdet för kontrollerna. Om detta fel inte är att betrakta som försumbart måste viktningsfaktorerna för regression och konfidensgränser korrigeras för kovariansen med kontrollen (17). För att den totala variansen för den relativa responsen ska kunna minimeras är det viktigt att det uppskattade medelvärdet för kontrollernas respons har en hög precision. Variansen uttrycks på följande sätt:

▼M1

(Nedsänkt *i* hänför sig till koncentrationsnivån i, och nedsänkt 0 till kontrollerna.)

$$Y_i = \text{Relativ respons} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

med variansen

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

och eftersom

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0 \text{ och } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

med normalt fördelade data och replikaten m_i och m_0

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

blir den totala variansen hos den relativa responsen, Y_i

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

Det fel som medelvärdet för kontrollerna är behäftat med är omvänt proportionellt mot kvadratroten av genomsnittsvärdet för antalet kontrollreplikat. Det kan ibland vara befogat att ta med historiska data för att kraftigt minska felet. En alternativ metod går ut på att man inte normaliserar data eller anpassar de absoluta responserna – inbegripet responsvärden för kontroller – utan i stället tar med responsvärdena för kontroller som en extra parameter som anpassas genom icke-linjär regression. Om man använder sig av en regressionsekvation av standardtyp med 2 parametrar kräver metoden anpassning av 3 parametrar, vilket innebär att det krävs fler datapunkter än vid icke-linjär regression av data som normaliserats med hjälp av en förvald kontrollrespons.

Omvända konfidensintervall

Beräkningen av konfidensintervall vid icke-linjär regression genom omvänd uppskattning är ganska komplex och förekommer inte som standardfunktion i normala statistikprogram. Ungefärliga konfidensgränser kan erhållas med hjälp av standardprogram för icke-linjär regression med omparametrisering (Bruce och Versteeg, 1992), vilket innebär att den matematiska ekvationen skrivs om med önskade punktskattningar, t.ex. med EC_{10}- och EC_{50}-värden som de parametrar som ska uppskattas. Låt funktionen vara $I = f(\alpha, \beta, \text{koncentration})$ och använd definitionsrelationerna $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ och $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ för att ersätta $f(\alpha, \beta, \text{koncentration})$ med en likvärdig funktion $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentration})$.

En mer direkt beräkning (Andersen et al, 1998) kan göras genom att man behåller den ursprungliga ekvationen och använder sig av en Taylorexpansion runt medelvärdena för r_i och r_0.

Metoder med bootstrapping har blivit populära på senare tid. De går ut på att man uppskattar en empirisk variansfördelning med hjälp av erhållna mätdata i kombination med återkommande omsampling som styrs av en slumptalsgenerator.

Litteratur

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O., och Nyholm, N. (1996). No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research 30, 1625–1632.

Bruce, R.D. och Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem. 11, 1485–1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. och Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics 3, 405–420.

▼B

C.4 BESTÄMNING AV ”LÄTT” BIONEDBRYTBARHET

DEL I. ALLMÄNNA PRINCIPER

I.1 INLEDNING

Sex metoder för screening av kemikalier för lätt bionedbrytning i ett aerobt vattenmedium beskrivs:

a) Eliminering av upplöst organiskt kol (DOC) (Metod C.4-A).

b) Modifierat OECD-screeningtest – eliminering av DOC (Metod C.4-B).

c) Koldioxid (CO_2) utvärdering (Modifierat Sturmtest) (Metod C.4-C).

d) Manometrisk respiration (Metod C.4-D).

e) Closed Bottle Test (Metod C.4-E).

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japan) (Metod C.4-F).

Del 1 innehåller allmänna och generella kommentarer till alla sex tester. I del II–VI1 finns det som är specifikt för de enskilda testerna. Tilläggen innehåller definitioner, formler och vägledande upplysningar.

1988 genomförde OECD ett ringtest som visade att metoderna ger inbördes överensstämmande resultat. En bestämd metod kan dock föredras allt efter det undersökta ämnets fysiska egenskaper.

I.2 VAL AV METOD

För att kunna välja den lämpligaste metoden är det viktigt att känna till kemikaliens löslighet, ångtryck och adsorptionsegenskaper. Den kemiska strukturen eller formeln bör vara känd för att kunna beräkna teoretiska värden och kontrollera uppmätta värden av parametrar, t.ex. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC och COD (se bilagorna 1 och 2).

Testkemikalier som är lösliga i vatten med 100 mg/liter kan utvärderas genom samtliga metoder, under förutsättning att de är icke-flyktiga och icke adsorberande. Av tabell 1 framgår vilka metoder som är lämpliga för kemikalier som är svårlösliga i vatten, flyktiga eller adsorberande. I bilaga I beskrivs hur man ska göra med kemikalier som är svårupplösliga i vatten och flyktiga kemikalier. Moderat flyktiga kemiska ämnen kan testas genom DOC elimineringsmetoden om det finns tillräckligt med luftrum i testkärlet (som ska stängas på lämpligt sätt). 1 detta fall måste en abiotisk kontroll användas som tillåter eventuell fysisk förlust.

▼B

Tabell 1

Tillämpning av testmetoder

Test	Analytisk metod	Lämplighet för ämnen som är		
		svårlösliga	flyktiga	adsorberande
DOC-eliminering	Upplöst organiskt kol	—	—	+/-
Mod. OECD DOC-elim.	Upplöst organiskt kol	—	—	+/-
CO_2 utvärdering	Respirometri: CO_2 bedömning	+	—	+
Manometrisk respirometri	Manometrisk respirometri: syreförbrukning	+	+/-	+
Closed bottle	Respirometri: upplöst syre	+/-	+	+
MITI	Respirometri: syreförbrukning	+	+/-	+

Uppgifter om de relativa proportionerna av testmaterialets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testkemikaliens toxicitet för bakterier (bilaga IV) kan vara till nytta vid valet av lämpliga testkoncentrationer och vara avgörande vid tolkningen av låga bionedbrytbarhetsvärden.

I.3 REFERENSÄMNEN

För att kontrollera förfarandet används referensämnen som uppfyller kriterierna för lätt bionedbrytbarhet och som testas i en separat kolv parallellt med de övriga proverna.

Anilin (färskt destillerat), natriumacetat och natriumbensoat är lämpliga kemikalier. Alla dessa referenskemikalier bryts ned vid dessa metoder även när inget inokulat tillsätts.

Det har föreslagits att man borde söka efter en referenskemikalie som är lätt nedbrytbar men som kräver tillsättning av inokulat. Kaliumhydrogenftalat har föreslagits men det behövs mer bevis innan detta ämne kan godtas som ett referensämne.

I metoder som baseras på respirometri kan kvävehaltiga föreningar påverka syreupptagningen på grund av nitri-fikation (se bilagor II och V).

I.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet upplöses eller uppslammas i ett oorganiskt testmedium, inokuleras och inkuberas under aeroba förhållanden i mörker eller diffust ljus. Den del av DOC i lösningen som stammar från inokulat ska vara så lågt som möjligt i jämförelse med den del som stammar från testämnet. Man ska ta hänsyn till inokulatets endogena aktiviteter genom att köra parallella blindprov med inokulat men utan testämne i lösningen, även om cellernas endogena aktivitet under närvaro av ämnet inte exakt motsvarar denna i den endogena kontrollen. Ett referensämne används parallellt för att kontrollera hur förfarandena fungerar.

▼B

I allmänhet följs nedbrytning genom bestämning av parametrar, såsom DOC, CO_2-produktion och syreupptagning, och mätningar görs tillräckligt ofta för att möjliggöra identifiering av början och slutet av bionedbrytningen. Mätningarna görs kontinuerligt med automatiska respirometrer. Under tiden mäts både DOC och en annan parameter, men detta sker normalt endast i början och slutet av testet. Specifika kemiska analyser kan också användas för att bedöma primär nedbrytning av testämnet, och för bestämning av koncentrationen av eventuella mellanprodukter (obligatoriskt i MITI-testet).

Testet vara normalt i 28 dagar. När bionedbrytningskurvan har nått en platå vid minst 3 mätningar kan dock testet avbrytas. Om kurvan visar att bionedbrytning har börjat men ännu inte nått en platå inom 28 dagar kan testet förlängas utöver denna period.

I.5 KVALITETSKRITERIER

I.5.1 **Repeterbarhet**

Till följd av bionedbrytningens natur och den blandade bakteriepopulationen i inokulat, bör minst dubbla bestämningar göras.

Det är en allmän erfarenhet att variationen mellan replikat blir mindre ju större startkoncentrationer av mikroorganismer i testmediet är. Ringtester har dessutom visat att det kan finnas stora variationer mellan resultat som erhållits av olika laboratorier, men generellt uppnås god överensstämmelse med lätt bionedbrytbara föreningar.

I.5.2 **Testets giltighet**

Ett test anses giltigt om skillnaden mellan de två yttersta värdena för testämnets försvinnande vid en multibestämning i platåfasen, vid avslutning av testet eller vid avslutningen av 10-dagarsfönstret är mindre än 20 % och om den procentuella nedbrytbarheten av referensämnet har nått nivån för lätt bionedbrytbarhet inom 14 dagar. Om inte båda villkoren uppfylls upprepas testet. På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Om nedbrytningen i ett toxicitetstest med både testämne och referenskemikalie är mindre än 35 % (baserad på DOC) eller 25 % (baserad på ThOD eller $ThCO_2$) inom 14 dagar måste man anta att testämnet är hämmande (se även bilaga 4). Testserien upprepas, om möjligt med lägre testämneskoncentrationer och högre inokulatkoncentration, dock högst 30 mg/fast ämne/liter.

I.6 ALLMÄNNA FÖRFARANDEN OCH FÖRBEREDELSER

Allmänna villkor som gäller för testerna sammanfattas i tabell 2. Apparatur och andra försöksbetingelser som gäller specifikt för ett individuellt test beskrivs senare under rubriken för det testet.

▼B

Tabell 2

Testbetingelser

Test	DOC- elimine-ring	CO_2-utveckling	Manometrisk respirometri	Modifierad OECD screening	Closed bottle	MITI(I)
Koncentration av testämnet						
som mg/l			100		2–10	100
mg/DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg/TbOD/l			50–100		5–10	
Koncentration av inokulat (i celler/l, cirka)	≤ 30 mg/l SS eller ≤ 100 ml utflöde/l (10^7–10^8)			0,5 ml se-kundärt utflöde/l ($I0^5$)	≤ 5 ml av utflöde/l (10^4–10^6)	30 mg/l SS (10^7–10^8)
Koncentration av element i mineralme-dium (i mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05–0,1				0,05–0,1	0,15
pH-värde	7,4 ± 0,2					helst 7,0
Temperatur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Upplöst organiskt kol ThOD = Teoretiskt syre-behov SS = Suspenderat fast ämne

I.6.1 **Utspädningsvatten**

Avjoniserat eller destillerat vatten utan innehåll av toxiska substanser (t.ex. Cu^{++} joner) används. Det får inte innehålla mer än 10 % av det organiska kol som tillförs med testämnet. Denna höga renhet är nödvändig för att undvika höga blindvärden. Föroreningar kan stamma från naturliga orenheter och från jonbyteshartser och material från bakterier och alger. Till en testserie får endast vatten från samma behållare användas och detta vatten ska kontrolleras i förväg genom DOC-analys. En sådan kontroll är inte nödvändig för Closed Bottle-test, men syreförbrukningen från vattnet ska vara låg.

▼B

I.6.2 **Stamlösningar av oorganiska medier**

Stamlösningar framställs av oorganiska medier med passande koncentrationer av salt för användning vid framställning av testlösningarna. Följande stamlösningar kan (med olika förtunningsförhållanden) användas för DOC-eliminering, modifierad OECD-screening, CO_2-utveckling, manometrisk respirometri och Closed Bottle-test.

Stamlösningar:

a) Monokaliumdiväteortofosfat, KH_2PO_4 8,50 g

Dikaliumväteortofosfat, K_2HPO_4 21,75 g

Dinatriumväteortofosfat-dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,40 g

Ammoniumklorid, NH_4Cl 0,50 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls. pH-värdet ska vara 7,4.

b) Kalciumklorid $CaCl_2$ 27,50 g

eller kalciumklorid, dihydrat, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 36,40 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls

c) Magnesiumsulfat-heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls

d) Järn(III)klorid-hexahydrat $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls (1.6.1.1).

Kommentar: För att undvika att behöva framställa denna lösning omedelbart före användning tillsätts 1 droppe koncentrerat HC1 eller 0,40 g etylendiaminotetraättiksyra (EDTA) per liter.

I.6.3 **Stamlösningar av kemikalier**

Om lösligheten är större än 1 g/l upplöses t.ex. 1–10 g av test- eller referenskemikalien i avjoniserat vatten, och det förtunnas till 1 liter. I motsatt fall framställs stamlösningen i det oorganiska mediet, eller kemikalier tillsätts direkt till det oorganiska mediet. Jämför tillägg III för hantering av mindre lösliga kemikalier. I MITI-testet (metod C.4-F) får dock varken lösningsmedel eller emulgatorer användas.

▼B

I.6.4 **Inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor, t.ex. aktivt slam, spillvattensavlopp (ej klorerat), ytvvatten och ytjord eller en blandning av dessa. Aktivt slam för DOC-eliminering, CO_2-utveckling och manometrisk respirometri ska tas från ett reningsverk eller ett laboratorium, som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Inokulat från andra källor har visat sig leda till större spridning av resultaten. För modifierad OECD-screening och Closed Bottle-testet krävs ett mer utspätt inokulat utan slampartiklar, och som källa föredras sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk som behandlar avloppsvatten från hushåll eller en anläggning i laboratorieskala. För MITI-testet framställs inokulat från en blandning av källor, vilket beskrivs under detta specifika test.

I.6.4.1 *Inokulat från aktiverat slam*

Ett färskt prov av aktiverat slam tas från en luftningsbassäng vid ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Vid behov avlägsnas grova partiklar genom filtrering genom en finmaskigt sikt och slammet hålls därefter aerobt.

Alternativt utfälls eller centrifugeras slammet (t.ex. vid 1 100 g i 10 minuter) sedan grova partiklar tagits bort. Supernatanten avlägsnas. Slammet kan tvättas i oorganiskt medium. Det koncentrerade slammet uppslammas till en koncentration av 3–5 g uppslammat torrämne per liter, varefter det luftas fram till användning.

Slammet ska tas från en ordentligt fungerande normal anläggning. Om det är nödvändigt att ta slammet från ett starkt belastat reningsverk, eller om man anser att det innehåller hämmande ämnen, måste det tvättas. Utfäll eller centrifugera det omsuspenderade slammet efter noggrann blandning, avlägsna supernatanten och slamma återigen upp det tvättade slammet i en ytterligare mängd oorganiskt medium.

Strax före användning tas ett prov av det fullständigt uppslammade slammet eller av det obehandlade slammet, för bestämning av mängden uppslammat torrämne.

Ett annat alternativ är att homogenisera aktiverat slam (3–5 g uppslammat torrämne per liter). Slammet behandlas i en mekanisk blandare i 2 minuter vid medelhastighet. Det homogeniserade slammet får utfälla i 30 minuter eller vid behov längre, och vätskan dekanteras för användning som inokulat i en mängd av 10 ml per liter oorganiskt medium.

I.6.4.2 *Andra inokulatkällor*

Det kan framställas av sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Ett färskt prov tas och förvaras under aerobiska förhållanden under transporten. Detta får utfälla i 1 timma eller filtreras genom ett grovt filterpapper och denna vätska förvaras under aeroba förhållanden fram till användning. Upp till 100 ml av detta slags inokulat kan användas per liter medium.

▼B

Ytvatten är en ytterligare inokulatkälla. I detta fall tas ett prov av lämpligt ytvatten, t.ex. flod- eller sötvatten, som förvaras under aeroba förhållanden fram till användning. Vid behov kan inokulat koncentreras genom filtrering eller centrifugering.

I.6.5 **Förbehandling av inokulat**

Det framställda inokulatet kan förbehandlas till försöksbetingelserna, men får inte tillvänjas till testkemikalien. Förbehandlingen består i luftning av aktivt slam i oorganiskt medium eller av sekundärt avloppsvatten i 5–7 dagar vid rumstemperatur. Förbehandling för MITI-test anses onödigt.

I.6.6 **Abiotisk kontroll**

Vid behov kontrolleras eventuell abiotisk nedbrytning av testämnet genom bestämning av DOC-förlust, syreupptagning och koldioxidutveckling i sterila kontrollprover som inte innehåller okulat. Sterilisering sker genom membranfiltrering (0,2–0,45 um) eller genom tillsättning av ett passande toxiskt ämne i passande koncentration. Om membranfiltrering används ska proverna tas aseptiskt för att upprätthålla steriliteten. Såvida inte adsorption av testämnet har uteslutits på förhand ska test som mäter bionedbrytning som DOC-förlust inkludera en abiotisk kontroll som inokuleras och förgiftas. Detta gäller särskilt för inokulat med aktiverat slam.

I.6.7 **Antal kolvar**

För varje test beskrivs antalet kolvar i en typisk försöksserie under rubriken för varje test.

Följande kolvtyper kan användas:

— Testuppslamning: innehåller testämne och inokulat.

— Inokulatblind: innehåller endast inokulat.

— Förfarandekontroll: innehåller referensämne och inokulat.

— Abiotisk steril kontroll: sterilt, innehåller testämne (1.6.6).

— Adsorptionskontroll: innehåller testämne, inokulat och steriliserat ämne.

— Toxicitetskontroll: innehåller testämne, referensämne och inokulat.

Bestämningar i testuppslamningen och inokulatblind ska obligatoriskt göras parallellt. Dessutom rekommenderas parallella bestämningar i den andra kolven.

Detta är dock inte alltid möjligt. Man måste se till att tillräckligt många prover tas eller att tillräckligt många avläsningar görs för att kunna värdera den procentuella elimineringen i 10-dagarsfönstret.

▼B

1.7 DATA OCH UTVÄRDERING

Vid beräkning av den procentuella nedbrytningen D_t används genomsnittsvärdena av de dubbla bestämningarna av parametern i testuppslamningen och inokulatblindproven. Formlerna ges i avsnitten om de enskilda testmetoderna. Nedbrytningens förlopp visas grafiskt med angivelse av 10-dagarsfönstret. Den procentuella elimineringen vid avslutningen av 10-dagarsfönstret och vid platån eller testets avslutning beräknas och rapporteras.

I metoder som baseras på respirometri kan kvävehaltiga föreningar påverka syreupptagningen på grund av nitrifikation (se bilagor II och V).

I.7.1 **Nedbrytning mätt genom DOC-bestämning**

Den procentuella nedbrytningen (D_t) vid varje provtagningstillfälle ska beräknas särskilt för kolvarna som innehåller testämne varvid genomsnittsvärdena av de dubbla bestämningarna av DOC används för att kunna bedöma testets pålitlighet (se 1.5.2). Den beräknas genom användning av följande formel:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

där:

D_t = % nedbrytning vid tidpunkten t

C_o = genomsnittlig startkoncentration av DOC i kulturmediet med testämne och inokulat (mg DOC/l)

C_t = genomsnittskoncentrationen av DOC i kulturmediet med oorganiskt medium och inokulat mg DOC/l)

C_{bo} = genomsnittlig startkoncentration av DOC i blindprov med oorganiskt medium och inokulat (mg DOC/1)

C_{bt} = genomsnittskoncentration av DOC i blindprov med oorganiskt medium och inokulat vid tidpunkten t (mg DOC/1)

Alla koncentrationer bestäms experimentellt.

I.7.2 Nedbrytning mätt genom specifik analys

Om specifika analysdata föreligger beräknas den primära bionedbrytningen genom formeln

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

där:

D_t = % nedbrytning vid tidpunkten t, normalt 28 dagar

S_a = restmängd testämne i medium med inokulat vid testets avslutning (mg)

S_b = restmängd testämne i blindprov endast med vatten/medium och testämne (mg)

▼B

I.7.3 Abiotisk nedbrytning

När abiotisk nedbrytning används beräknas den procentuella abiotiska nedbrytningen med användning av

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

där:

$C_{s(o)}$ = DOC-koncentration, sterilkontrollen på dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentration, sterilkontrollen på dag t.

I.8 RAPPORTERING

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande:

— Test- och referenskemikalie och deras renhet.

— Testbetingelser.

— Inokulat: art och provtagningsställe, koncentration och eventuell förbehandling.

— Art och andel av industriavloppsvatten i avloppsvattnet, om känt.

— Testets varaktighet och temperatur.

— I fråga om svårlösliga testkemikalier: genomförd behandling.

— Använd testmetod; ändringar av förfarandet ska vara vetenskapligt motiverat.

— Försöksresultaten uppställda i tabellform.

— Eventuellt observerade hämningsfenomen.

— Eventuellt observerad abiotisk nedbrytning.

— Eventuella data från specifika kemiska analyser.

— Om möjligt analytiska data om nedbrytningsprodukter.

— Avbildning av den procentuella nedbrytningen mot tiden för både test- och referensämnen med tydlig angivelse av ”lag”-fas, nedbrytningstid, 10-dagarsfönster och lutning (se bilaga I). Om man i testet använder pålitlighetskriterier kan genomsnittet av nedbrytningsprocenten i kolvarna innehållande testämnet användas för framställning av grafen.

— Procentuell eliminering efter 10-dagarsfönstret och vid platån eller testets avslutning.

DEL II. **DOC-ELIMINERING (DOC DIE-AWAY)** (Metod C.4-A)

II.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10–40 mg/l), luftas i mörker eller diffust ljus vid 22 ± 2 °C.

▼B

Nedbrytningen följs genom regelbunden DOC-analys i 28 dagar. Bionedbrytningen beräknas genom att uttrycka koncentrationen av avlägsnat DOC (korrigerat för koncentration i inokulatblindprovet) i procent av startkoncentrationen av DOC. Den primära bionedbrytningen kan också beräknas utifrån kompletterande kemisk analys vid inkubationsperiodens början och slut.

II.2 METODBESKRIVNING

II.2.1 **Apparatur**

a) Koniska kolvar, t.ex. från 250 ml till 2 liter, beroende på den volym som krävs för DOC-analysen.

b) Skakapparatur för de koniska kolvarna, antingen med automatisk temperaturkontroll eller placerad i en lokal med konstant temperatur, och tillräckligt kraftig för att hålla förhållandena aeroba i alla kolvarna.

c) Filtreringsapparatur med passande membran.

d) DOC-analysator.

e) Apparatur för bestämning av upplöst syre.

f) Centrifug.

II.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se 1.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blanda med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

II.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se 1.6.4, 1.6.4.1, 1.6.4.2 och 1.6.5.

II.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Som ett exempel kan 800 ml portioner av oorganiskt medium överföras till koniska 2-literskolvar, varefter det tillsätts så mycket av stamlösningarna av test- och referensämne till de olika kolvarna att kemikaliekoncentrationen blir 10–40 mg DOC per liter. Kontrollera pH-värden och justera om nödvändigt till 7,4. Inokulat från aktiverat slam eller en annan källa tillsätts (se I.6.4) till en slutkoncentration av högst 30 mg uppslammat torrämne per liter. Inokulatprover förbereds också i oorganiskt medium utan test- och referenskemikalier.

Vid behov inkluderas även en kolv för kontroll av om testkemikalien har en hämmande verkan, genom tillsättning av jämförbart lika stora mängder test- och referenskemikalie till oorganiskt medium innehållande inokulat.

Man kan också vid behov inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemikalien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6).

▼B

Om man misstanker att testkemikalien i väsentlig grad kan adsorberas till gas, slampartiklar eller liknande, företas dessutom en preliminär värdering av denna adsorption och därmed av testens lämplighet för den berörda testkemikalien (se tabell 1). Använd en kolv innehållande testämnet, inokulat och det steriliserande ämnet.

Alla kolvar fylls upp till 1 liter med oorganiskt medium, och efter blandning uttas ett prov från varje kolv för bestämning av startkoncentrationen av DOC (se bilaga II, punkt 4). Kolvarnas öppning sluts, t.ex. med aluminiumfolie, på ett sådant sätt att luften fritt kan passera in och ut ur kolvarna. Därefter inleds testet genom att kolvarna placeras i skakapparaturen.

II.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

II.2.6 **Utförande av testet**

Under testet görs dubbla bestämningar av DOC-koncentrationerna i alla kolvarna med bestämda tidsintervaller och så ofta att både 10-dagarsfönstret och den procentuella förlusten vid 10-dagarsfönstrets avslutning kan konstateras. Endast så mycket av testuppslamningen tas som är nödvändigt för analysen.

Före provtagningen kompenseras för eventuell förångningsförlust från kolvarna genom tillsättning av vatten (1.6.1). Innan proven tas blandas kulturmediet noggrant och det säkerställs att materialet på kolvens sidor löses upp eller uppslammas före provtagning. Omedelbart efter provtagningen membran-filtreras eller centrifugeras provet (se tillägg 4). Det filtrerade eller centrifugerade provet analyseras samma dag. Det kan förvaras i högst 48 timmar vid 2–4 °C eller längre vid högst – 18 °C.

II.3 DATA OCH RAPPORTERING

II.3.1 **Behandling av resultaten**

Den procentuella nedbrytningen vid tidpunkt t beräknas enligt 1.7.1 (DOC-bestämning) och eventuellt enligt 1.7.2 (specifik analys).

Alla resultat antecknas på tillhörande scheman.

▼B

II.3.2 **Resultatens giltighet**

Se I.5.2.

II.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

II.4 FORMULÄR

Nedanför visas ett exempel på ett resultatschema.

DOC-ELIMINERING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet: t_0: .... mg/l ämne

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **KOLBESTÄMNINGAR**

Kolanalyser:

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalien med inokulat	1	a_1					
		a_2					
		a, medel $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medel $C_{b(t)}$					

▼B

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Inokulatblindprovet utan testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, medel $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medel $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **UTVÄRDERING AV RÅDATA**

Kolv nr.		% nedbrytning efter n dagar				
		Q	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
medel (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Genomsnittet av D, och D_2 ska inte tas om det är en betydande skillnad.

Anmärkning: Motsvarande formler kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproverna.

7. **ABIOTISK KONTROLL (valfritt)**

	Tid (dagar)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontroll	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYS (valfritt)**

	Restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/l)	% primär nedbrytning
Sterilkontroll	s_b	

▼B

	Restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/l)	% primär nedbrytning
Inokulerat testmedium	s_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL III. **MODIFIERAT OECD-SCREEENINGTEST** (metod C.4-B)

III.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10–40 mg/l), luftas i mörker eller diffust ljus vid 22 ± 2 °C.

Nedbrytningen följs genom regelbunden DOC-analys i 28 dagar. Bionedbrytningen beräknas genom att uttrycka koncentrationen av avlägsnat DOC (korrigerat för koncentration i inokulatblindprovet) i procent av startkoncentrationen av DOC. Den primära bionedbrytningen kan också beräknas utifrån kompletterande kemisk analys vid inkubationsperiodens början och slut.

III.2 METODBESKRIVNING

III.2.1 Apparatur

a) Koniska kolvar, t.ex. från 250 ml till 2 liter, beroende på den volym som krävs för DOC-analysen.

b) Skakapparatur för de koniska kolvarna, antingen med automatisk temperaturkontroll eller placerad i en lokal med konstant temperatur, och tillräckligt kraftig för att hålla förhållandena aeroba i alla kolvarna.

c) Filtreringsapparatur med passande membran.

d) DOC-analysator.

e) Apparatur för bestämning av upplöst syre.

f) Centrifug.

III.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blandas med 80 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

I denna metod används endast 0,5 liter spillvatten per liter som inokulat, och därför kan det vara nödvändigt att tillsätta ytterligare spårämnen och växtfaktorer till mediet. Detta görs genom tillsättning av 1 ml av var och en av följande lösningar per liter medium (slutvolymen):

▼B

Lösningar av spårämnen:

Mangansulfat tetrahydrat, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Borsyra, H_3BO_3	57,2 mg
Zinksulfat heptahydrat, $ZnSO_4 .7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdat $(NH_4)_6M0_7O_{24}$	34,7 mg
Järn-chelat ($FeCl_3$ etylendiamintetraättiksyra)	100,0 mg
löses i vatten och förtunnas till 1 000 ml	
Vitaminlösning:	
Jästextrakt	15,0 mg

löses i 100 ml vatten. Det steriliseras genom filtrering genom 0,2 μm membranfilter om lösningen framställs färsk varje gång.

III.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa. Se 1.6.4.2 och 1.6.5.

0,5 ml per liter oorganisk lösning används.

III.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Som ett exempel kan 800 ml portioner av oorganiskt medium överföras till koniska 2-literskolvar, varefter det tillsätts så mycket av stamlösningarna av test- och referensämne till de olika kolvarna att kemikaliekoncentrationen blir 10–40 mg DOC per liter. Kontrollera pH-värden och justera till 7,4 om nödvändigt. 0,5 ml spillvatten tillsätts per liter (se I.6.4.2) till kolvarna som inokulat. Inokulatprover förbereds också i oorganiskt medium utan test- och referenskemikalier.

Vid behov inkluderas även en kolv för kontroll av om testkemikalien har en hämmande verkan, genom tillsättning av jämförbart lika stora mängder test- och referenskemikalie till oorganiskt medium innehållande inokulat.

Man kan också vid behov inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemika-lien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6).

Om man misstänker att testkemikalien i väsentlig grad kan adsorberas till gas, slampartiklar eller liknande, företas dessutom en preliminär värdering av denna adsorption och därmed av testens lämplighet för den berörda testkemikalien (se tabell 1). Använd en kolv innehållande testämnet, inokulat och det steriliserande ämnet.

Alla kolvar fylls upp till 1 liter med oorganiskt medium, och efter blandning uttas ett prov från varje kolv för bestämning av startkoncentrationen av DOC (se bilaga II, punkt 4). Kolvarnas öppning sluts, t.ex. med aluminiumfolie, på ett sådant sätt att luften fritt kan passera in och ut ur kolvarna. Därefter inleds testet genom att kolvarna placeras i skakapparaturen.

▼B

III.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

III.2.6 **Utförande av testet**

Under testet görs dubbla bestämningar av DOC-koncentrationerna i alla kolvarna med bestämda tidsintervaller och så ofta att både 10-dagarsfönstret och den procentuella förlusten vid 10-dagarsfönstrets avslutning kan konstateras. Endast så mycket av testuppslamningen tas som är nödvändigt för analysen.

Före provtagningen kompenseras för eventuell förångningsförlust från kolvarna genom tillsättning av förtunningsvatten (I.6.1). Innan proven tas blandas kulturmediet noggrant och det säkerställs att materialet på kolvens sidor löses upp eller uppslammas innan provtagning. Omedelbart efter provtagningen membranfiltreras eller centrifugeras provet (se tillägg 4). Det filtrerade eller centrifugerade provet analyseras samma dag. Det kan förvaras i högst 48 timmar vid 2–4 ^{o}C eller längre vid högst – 18 ^{o}C.

III.3 DATA OCH RAPPORTERING

III.3.1 **Behandling av resultaten**

Den procentuella nedbrytningen vid tidpunkt t beräknas enligt 1.7.1 (DOC-bestämning) och eventuellt enligt 1.7.2 (specifik analys).

Alla resultat antecknas på tillhörande scheman.

III.3.2 Resultatens giltighet

Se. I.5.2.

III.3.3 Rapportering

Se I.8.

III.4 FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MODIFIERAT OECD-SCREENINGTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

▼B

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet, till: .... mg/l ämne

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämnen i reaktionsblandningen:
... mg/l

5. **KOLBESTÄMNINGAR**

Kolanalyser:

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	N_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalie med inokulat	1	a_1					
		a_2					
		a, medel $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medel $C_{b(t)}$					
Inokulatblindprov utan testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, medel $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medel $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **UTVÄRDERING AV RÅDATA**

Kolv nr		% nedbrytning efter n dagar				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Kolv nr		% nedbrytning efter n dagar				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
medel (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Genomsnittet av D_1 och D_2 ska inte tas om det är en betydande skillnad.

Anmärkning: Motsvarande formler kan användas för referenskemikalie och toxicitetskontrollproverna.

7. **ABIOTISK KONTROLL** (valfritt)

	Tid (dagar)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontroll	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYS** (valfritt)

	Restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/l)	% primär nedbrytning
Sterilkontroll	s_b	
Inokulerat testmedium	s_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL IV. CO_2-UTVECKLING (metod C.4-C)

IV.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10–40 mg DOC eller TOC/l), luftas genom genomledning av koldioxidfri luft med kontrollerad hastighet i mörker eller diffust ljus. Nedbrytningen följs i 28 dagar genom bestämning av den bildade mängden koldioxid i det att det samlas upp i barium- eller natriumhydroxid och mäts antingen genom titrering av resterade hydroxid eller som oorganiskt kol. Den mängd koldioxid som utvecklats av testkemikalien (korrigerat för inokulatblindvärden) uttrycks i procent av startkoncentrationen av $ThCO_2$. Graden av bionedbrytning kan också beräknas utifrån kompletterande DOC-analyser vid inkubationsperiodens början och slut.

▼B

IV.2 METODBESKRIVNING

IV.2.1 **Apparatur**

a) Kolvar 2–5 liter, alla försedda med luftningsrör, som nästan når ned till botten av behållaren, och avgångsöppning.

b) Magnetomrörare, när svårlösliga kemikalier testas.

c) Gasabsorptionskolvar.

d) Utrustning för kontroll och mätning av luftgenomströmningen.

e) Apparatur för tvättning av koldioxid, för framställning av koldioxidfri luft. Alternativt kan CO_2-fri syre och CO_2-fritt kväve användas i stålkolvar i det riktiga blandningsförhållandet (20 % O_2 och 80 % N_2).

f) Utrustning för bestämning av koldioxid, antingen trimetriskt eller genom en annan form av analys för oorganiskt kol.

g) Membranfiltreringsapparatur (valfritt).

h) DOC-analysator (valfritt).

IV.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se 1.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blandas med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

IV.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 och I.6.5.

IV.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Följande volym- och viktangivelser gäller som exempel för 5-literskolvar med 3 l uppslamning. Om mindre volymer används anpassas värdena, dock ska den bildade mängden koldioxid kunna bestämmas korrekt.

2 400 ml oorganiskt medium överförs till varje 5-literskolv. Man tillsätter så mycket förberett aktiverat slam (se I.6.4.1 och I.6.5) att koncentrationen av uppslammat torrämne blir högst 30 mg/l i 3 liter slutblandning. Alternativt kan det förberedda slammet först förtunnas med oorganiskt medium till en uppslamning innehållande 500–1 000 mg/l, varefter en det av detta tillsätts till 5-literkolvens innehåll till en koncentration av 30 mg/l. Detta ger större precision. Andra inokulatkällor kan användas (se I.6.4.2).

Dessa blandningar luftas över natten med CO_2-fri luft så all koldioxid drivs ut ur systemet.

▼B

Test- och referensämne tillsätts var för sig som kända mängder av stamlösningar till replikatkolvarna så att man uppnår en koncentration av 10–20 mg DOC eller TOC per liter. Till vissa av kolvarna tillsätts inga kemikalier och dessa fungerar som inokulatkontrollprover. Svårlösliga testämnen tillsätts direkt till kolvarna på vikt- eller volyrnbasis, eller hanteras i enlighet med bilaga III.

Om det är nödvändigt används en kolv för att kontrollera om testkemikalien verkar hämmande. Detta görs genom att tillsätta både test- och referenskemikalie av samma koncentration som i de andra kolvarna.

Det kan vara nödvändigt att inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemikalien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6). Sterilisera genom tillsättning av ett giftigt ämne i passande koncentration.

Alla kolvarna fylls upp till en uppslamningsvolym av 3 liter genom tillsättning av oorganiskt medium, som i förväg har genomluftats med CO_2-fri luft. Eventuellt kan man ta prover för DOC-analys (se bilaga II.4) och specifik analys. Absorptionskolvarna förbinds till kolvarnas avgångsöppning.

Om banumhydroxid används ansluts de 3 absorptionskolvarna, var och en innehållande 100 ml 0,0125 M bariumhydroxidlösning, i en serie till varje 5-literskolv. Lösningen ska vara fri från fällt sulfat och karbonat och dess styrka ska bestämmas omedelbart före användning. Om natriumhydroxid används ansluts 2 kolvar varvid den sista fungerar som kontroll av att koldioxiden är absorberad i den första. Absorptionskolvar med serum-kolvstängning är lämpliga. 200 ml 0,05 natriumhydroxid placeras i varje kolv, vilket är tillräckligt för att absorbera hela den mängd koldioxid som utvecklas när testkemikalien bryts ned fullständigt. Natriumhydroxidlösning kommer, även om färskt framställd, dock att innehålla spår av karbonat. Detta korrigeras genom subtraktion av blindprovens karbonatinnehåll.

IV.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

IV.2.6 **Utförande av testet**

Testet inleds genom genombubbling av uppslamningarna med 30–100 ml CO_2-fri luft per minut. Prover tas regelbundet av kodioxidabsorbenten för analys av CO_2-innehåll. Det rekommenderas att man under de första 10 dagarna gör analyser varannan eller var tredje dag och därefter var femte dag fram till dag 28, så att 10-dagarsfönstret kan identifieras.

▼B

Den 28:e dagen tas (eventuellt) prover för DOC-analys och specifik analys, uppslamningarnas pH mäts och 1 ml koncentrerad saltsyra tillsätts till varje kolv. Kolvarna luftas över natten så att all koldioxid drivs ut av testuppslamningarna. Dag 29 företas den sista analysen av utvecklad koldioxid.

De dagar då CO_2 bestäms avlägsnas den bariumhydroxidabsorbtionskolv som är närmast kolven och innehåller titreras med 0,05 M HCl med fenoftalein som indikator. De övriga absorbtionskolvarna flyttas fram en plats närmare kolven och en ny kolv innehållande 100 ml färskt framställt 0,0125 M bariumhydroxid placeras längst bak i serien. Titreringarna görs enligt behov, t.ex. när betydande fällning syns i den första kolven men inget syns i den andra, dock minst en gång i månaden. Om NaOH används om absorbtionsmedel tas med en injektionsspruta ett litet prov (beroende på den använda kolämnesanaiysatorn) av natriumhydroxidlösningen i den kolv som är närmast kolven. Provet sprutas in i IC-delen av kolämnesanalysatorn för direkt analys av den utvecklade koldioxiden.

Innehållet i den andra absorbtionskolven analyseras först vid testets avslutning så att man kan korrigera för eventuell överföring av koldioxid

IV.3 DATA OCH RAPPORTERING

IV.3.1 **Behandling av resultaten**

Den absorberade CO_2-mängden är efter titrering given genom

$$mgCO_2 = (100 \times C_B\text{-}0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

där:

V = den mängd HCl som förbrukas vid titrering av de 100 ml absorptionsmedel (ml)

C_B = bariumhydroxidlösningens koncentration (M)

C_A = saltsyreupplösningens koncentration (M)

Om C_B = 0,0125 M och C_A = 0,05 M ska man använda 50 ml för titrering av 100 ml bariumhydroxid, och CO_2-mängden är given genom:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrated} = \times \text{ml HCI}$$

I detta fall ska man alltså använda en faktor på 1,1 vid omräkning av den volym HCl som går åt vid titrering, till det antal mg Cl_2 som utvecklats.

Den viktmängd CO_2 som bildas av bara inokulat och av inokulat med testkemikalie, beräknas utifrån de gällande titreringsvärdena, och skillnaden är den viktmängd CO_2 som endast testkemikalien utvecklar.

Om t.ex. enbart inokulat kräver 48 ml för titrering och inokulat plus testkemikalie kräver 45 ml fås

CO_2 från inokulat = 1,1 × (50.48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 från inokulat plus testkemikalie = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg,

och den viktmängd CO_2 som testkemikalien har utvecklat blir alltså 3,3 mg.

Den procentuella bionedbrytningen beräknas genom

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ utvecklat } \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg tillsatt testkemikalie}},$$

eller

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ utvecklat } \times 100}{\text{mg tillsatt TOC i testet } \times 3,67}$$

varvid 3,67 är omräkningsfaktorn (44/12) från kol till koldioxid.

Den procentuella nedbrytningen efter en viss tid beräknas genom att lägga ihop de enskilda procentdelarna av $ThCO_2$ som är uppmätta fram till den gällande tidpunkten.

Om natriumhydroxid används som absorptionsmedel beräknas den utvecklade CO_2-mängden, uttryckt som IC (mg), genom att multiplicera absorbtionsmedlets IC-koncentration med dess volym.

Den procentuella nedbrytningen beräknas genom

$$\% \text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC i testkolv } - \text{ mg IC i blindprov}}{\text{mg TOC tillsatt som testkemikalie}} \times 100$$

IV.3.2 **Resultatens giltighet**

IC-innehållet i testkemikalieuppslamningen i oorganiskt medium vid testets inledning ska vara mindre än 5 % av TC, och den utvecklade CO_2-mängden i inokulatblindprovet får vid testets avslutning inte överstiga 40 mg per liter medium. Om det finns värden på över 70 mg CO_2 per liter granskas data och försökstekniker noggrant.

Se också I.5.2.

IV.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

IV.4 FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

KOLDIOXIDUTVECKLING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

▼B

Startkoncentration i mediet: .... mg/l ämne

Total C tillsatt till kolven: .... mg C

$ThCO_2$: ... mg CO_2

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen:
... mg/l:

5. **KOLDIOXIDUTVECKLING OCH NEDBRYTBARHET**

Metod: $Ba(OH)_2$/NaOH/annat

Tid (dagar)	Utvecklat CO_2 test (mg)		Utvecklat CO_2 blind (mg)		utvecklat CO_2 kumulerat (mg) (test minus blindprov)		% $ThCO_2$ $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	medel	3 / 4	medel	1	2	1	2	medel
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Anmärkning: Motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalie och toxicitetskontrollproverna.

6. **KOLANALYS (valfritt)**

Kolanalysator:

Tid (dagar)	Blindprov mg/l	Testkemikalie mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	c_t

(*) Eller vid inkuberingens avslutning.

▼B

$$\% \text{ DOC avlägsnat } = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISK NEDBRYTNING (valfritt)**

$$\% \text{ abiotic degradation } = \frac{CO_2 \text{ utveckling i steril kolv efter 28 dagar (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

DEL V. **MANOMETRISK RESPIROMETRITEST** (metod C.4-D)

V.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (100 mg testämne per liter motsvarande minst 50–100 mg ThOD per liter) rörs om i en stängd kolv vid konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i upp till 20 dagar. Syreförbrukningen bestäms antingen genom mätning av den mängd syre (elektrolytiskt framställt) som krävs för att upprätthålla konstant gasvolym i respirometerkolven, eller utifrån volym- eller tryckändringen (eller en kombination av dessa) i apparaten. Utvecklat koldioxid absorberas i en kaliumhydroxidlösning eller annat lämpligt absorptionsmedel. Den syremängd som testkemikalien har tagit upp (korrigerat mot den parallella inokulatblindprovets upptagning) uttrycks i procent av ThOD eller COD. Frivilligt kan primär bionedbrytning också beräknas genom kompletterande specifik analys vid inkubationsperiodens början och slut, och fullständig bionedbrytning genom DOC-analys.

V.2 TESTMETODSBESKRIVNING

V.2.1 **Apparatur**

a) Lämplig respirator.

b) Temperaturreglering inom ± 1 °C eller mindre.

c) Membranfiltreringsapparatur (valfritt).

d) Kolanalysator (valfritt).

V.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen a) blandas med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning b), c) och d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med utspädningsvatten.

V.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 och I.6.5.

V.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Utifrån stamlösningarna framställs det särskilda lösningar av test- och referensämne i oorganiskt medium med en kemikaliekoncentration av normalt 100 mg/l (motsvarande minst 50–100 mg ThOD per liter).

▼B

ThOD beräknas på grundval av ammoniumsalt, såvida inte nitrifikation förväntas, i vilket fall beräkningen baseras på nitratbildning (se bilaga II.2).

pH justeras vid behov till 7,4± 0,2.

Svårlösliga ämnen tillsätts vid en senare tidpunkt.

Om testämnets toxicitet ska bestämmas framställs ytterligare en lösning i oorganiskt medium, som innehåller både test- och referensämne i samma koncentration som i de individuella lösningarna.

Om det är nödvändigt att bestämma den fysiska-kemiska syreupptagningen framställs en lösning av testämne i en koncentration av normalt 100 mg ThOD per liter som steriliseras vid tillsättningen av ett passande giftigt ämne (se I.6.6).

Den nödvändiga mängden av test- respektive referensämneslösningarna överförs till minst två kolvar (dubbel bestämning). Ytterligare kolvar med enbart oorganiskt medium förbereds (inokulatblindprover) och om det är nödvändigt med den blandade test- och referensämneslösningen och med den sterila lösningen.

Om testämnet är svårlösligt tillsätts det direkt vid denna tidpunkt, antingen på grundval av vikt eller volym eller genom hanteringen enligt bilaga III. Dessutom tillsätts kaliumhydroxid, natriumhydroxidparlor eller ett annat absorptionsmedel till CO_2-kamrarna.

V.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslammning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas, och vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

V.2.6 **Utförande av testet**

Låt behållarna stå tills de har nått den önskade temperaturen och tillsätt förberett aktiverat slam eller ett annat inokulat till de ifrågavarande behållarna så att en koncentration av uppslammat torrämne på högst 30 mg/l erhålls. Montera apparaturen, starta omrörningen, kontrollera lufttätheten och börja mäta syreupptagningen. Normalt krävs det ingen annan passning än de nödvändiga avläsningarna och daglig kontroll av att temperaturen är korrekt och omrörningen tillräcklig.

Syreupptagningen beräknas på grundval av ofta förekommande regelbundna avläsningar som görs enligt apparaturtillverkarens anvisningar. Vid inkubationstidens avslutning, normalt 28 dagar, mäts pH-värdet i kolvarna, särskilt om syreupptagningen har varit mycket låg eller större än $ThOD_{NH4}$ (för kvävehaltiga föreningar).

▼B

Om det är nödvändigt tas prover från respirometerkolvarna före och efter inkuberingen för DOC-analys eller specifik kemisk analys (se bilaga II.4). Man ska se till att volymen av den testuppslamning som kvarstår i kolven efter den första provtagningen är känd. Om testämnet är N-haltigt bestäms koncentrationsökningen av nitrit och nitrat under 28 dagar, och korrektionen för syreförbrukningen genom nitrifikation beräknas (bilaga V).

V.3 DATA OCH RAPPORTERING

V.3.1 **Behandling av resultaten**

Testkemikaliens syreupptagning (mg) efter en viss tid (korrigerad för inokulatblindprovens syreupptagning under samma tid) divideras med vikten av använd mängd testämne. Av detta framkommer BOD uttryckt i mg syre per mg testämne, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämne } - \text{ mg } O_2 \text{ upptaget av blindproven})}{(\text{mg testämne i kolven})}$$

= mg O_2 per mg testämne

Den procentuella bionedbrytningen beräknas antingen genom

$$\%\ \text{bionedbrytning } = \%\ \text{ThOD } = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalie})} \times 100$$

eller

$$\%\ \text{COD } = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalie})} \times 100$$

Det bör noteras att de två metoderna inte nödvändigtvis ger samma resultat. Den förstnämnda metoden föredras.

För testämnen som innehåller kväve används passande ThOD (NH_4 eller NO_3) i enlighet med vad som är känt eller förväntas om förekomst av nitrifikation (bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukning till nitrifikation på grundval av ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

Om man beslutar sig för att göra bestämningar av organiskt kol och en specifik kemikalie beräknas den procentuella nedbrytningen i enlighet med punkt I.7.

Alla resultat noteras på tillhörande formulär.

V.3.2 **Resultatens giltighet**

Inokulatblindprovens syreupptagning är normalt 20–30 mg O_2/l på 28 dagar och bör inte vara större än 60 mg/l. Om det finns värden över 60 mg/l måste data och försökstekniker granskas noggrant. Om pH ligger utanför intervallet 6–8,5 och testämnets syreupptagning är mindre än 60 % upprepas testet med lägre testämneskoncentrationer.

Se också I.5.2.

▼B

V.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

V.4 **FORMULÄR**

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MANOMETRISK RESPIROMETRI

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet: C_o: .... mg/l ämne

Volymen i testkolv (V): .... ml

ThOD eller COD: ... mg O_2/mg testämne (NH_4, NO_3).

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen:
... mg/l:

5. **SYREUPPTAGNING: BIONEDBRYTNING**

		Tid (dagar)											
		0		7		14			21			28	
O_2 uppt. (mg) tescämne	1												
	2												
	a, medel												
O_2 uppt. (mg) blindprov	3												
	4												
	b, medel												
Korrigerat BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD per mg testämne	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tid (dagar)											
		0		7		14			21			28	
% nedbrytning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	medel (*)												

V = volymen av medium i testkolven.
(*) Genomsnittet av D_1 och D_2 ska inte tas om det föreligger en väsentlig skillnad.

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproven.

6. **KORREKTION FÖR NITRIFIKATION (se bilaga V)**

Dag		0	28	skillnad
i)	Nitratkoncentration (mg N/l)			(N)
ii)	Syreekvivalent (4,57 x N x V) (mg)	—	—	
iii)	Nitritkoncentration (mg N/l)			(N)
iv)	Syreekvivalent (3,43 x N x V) (mg)	—	—	
ii + iv)	Total syreekvivalent	—	—	

7. **KOLBESTÄMNING** (valfritt)

Kolanalysator:

Tid (dagar)	Blindprov mg/l	Testkemikalie mg/l
0	(C_{blo})	(C_0)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) Eller vid inkuberingens slut.

$$\% \text{ DOC avlägsnat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMIKALIEBESTÄMNING (valfritt)**

S_b = koncentrationen av testkemikalien i steril kontrollkolv efter 28 dagar

S_a = koncentrationen av testkemikalien i kolv med inokulat efter 28 dagar

$$\% \text{ bionedbrytning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISK NEDBRYTNING (valfritt)**

a = syreförbrukningen i sterila kolvar efter 28 dagar (mg)

$$\text{Syreförbrukning pr mg testämne} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(se avsnitt 1 och 3)

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

DEL VI. **CLOSED BOTTLE-TEST (metod C.4-E)**

VI.1 TESTMETODSPRINCIP

Till en normal 2–5 mg/l lösning av testämnet i oorganiskt medium tillsätts inokulat bestående av ett förhållandevis litet antal mikroorganismer från en blandad population, och lösningen förvaras i mörker vid konstant temperatur i helt fyllda slutna kolvar. Nedbrytningen följs under 28 dagar genom analys av upplöst syre. Den syremängd som testämnet har förbrukat korrigeras för den syremängd som har förbrukats i det parallella inokulatblindprovet, och uttrycks i procent av ThOD eller COD.

VI.2 TESTMETODSBESKRIVNING

VI.2.1 **Apparatur**

a) BOD-kolvar med glaspropp, t.ex. 250–300 ml.

b) Vattenbad eller inkuberingsapparat, som kan hålla kolvarna vid konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i mörker.

c) Stora glasflaskor (2–5 l) för framställning av medium och uppfyllning av BOD-kolvarna.

d) Syreelektrod och syremätare eller utrustning och reagenser för Winkler-titrering.

VI.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

1 ml lösning a), b), c) och d) förtunnas till 1 liter med vatten.

VI.2.3 **Framställning av inokulat**

Inokulat tas normalt från sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. En alternativ inokulatkälla är ytvatten. Normalt används från en droppe (0,5 ml) till 5 ml filtrat per liter medium. Av-provningar kan vara nödvändiga för att klarlägga den optimala volymen för ett visst avloppsvatten (se I.6.4.2 och I.6.5).

VI.2.4 **Förberedelse av kolvar**

Det oorganiska mediet luftas kraftigt i minst 20 minuter. En given försöksserie utförs med oorganiskt medium från samma sats. Normalt är mediet färdigt för användning efter att ha stått i 20 minuter vid testtemperaturen. Som kontroll bestäms koncentrationen av upplöst syre. Värdena ska ligga omkring 9 mg/l vid 20 °C. All överföring och uppfyllning med det luftmättade mediet utförs utan att det bildas bubblor, t.ex. genom användning av hävert.

▼B

Parallella grupper av BOD-kolvar förbereds för samtidiga försök med test- och referensämne. Minst så många BOD-kolvar, inbegripet inokulatblindprover, samlas så att minst dubbla bestämningar kan företas av syreförbrukningen med önskade regelbundenhet, t.ex. efter 0, 7, 14, 21 och 28 dagar. Det kan vara nödvändigt att använda flera kolvar om man säkert ska kunna identifiera 10-dagarsfönstret.

De stora kolvarna fylls upp till en tredjedel med fullt luftat oorganiskt medium. Därefter tillsätts så mycket stamlösning av test- och referensämne till olika kolvar att deras slutkoncentration normalt inte blir större än 10 ml/l. Till en särskild kolv med kontrollmedium tillsätts inga kemikalier.

För att vara säker på att inokulataktiviteten inte begränsas får koncentrationen av upplöst syre inte understiga 0,5 mg/l i BOD-kolvarna, vilket begränsar testkemikaliens koncentration till ca 2 mg/l. Av svårt nedbrytbara ämnen och ämnen med lågt ThOD kan det dock användas 5–10 mg/l. I vissa fall rekommenderas parallella serier med testämne i två olika koncentrationer, t.ex. 2 och 5 mg/l. Normalt beräknas ThOD på grundval av bildandet av ammoniumsalt, men om nitrifikation förväntas beräknas värdena på grundval av nitratbildning ($ThOD_{NO3}$; se bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker korrigeras det för ändringar i nitrit- och nitratkoncentrationen, som är bestämd genom analys (se bilaga V).

Ytterligare en serie kolvar krävs om testämnets toxicitet ska undersökas (t.ex. om ett lågt bionedbrytbarhetsvärde tidigare påvisats).

För detta förbereds ytterligare en stor kolv med luftat oorganiskt medium (ca en tredjedel full) plus testämne och referensämne normalt i samma slutkoncentration som i de andra kolvarna.

Inokulat tillsätts till kolvarna i form av sekundärt avloppsvatten (från 1 droppe [0,5 ml] till 5 ml per liter) eller t.ex. flodvatten (se I.6.4.2). Slutligen fylls det upp med luftat oorganiskt medium med användning av en slang som når ända ner till botten, så att tillräcklig omrörning säkerställs.

VI.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

I en typisk testserie används följande antal kolvar:

— minst 10 med testämne och inokulat (testuppslamning),

— minst 10 med inokulat (inokulatblindprov),

— minst 10 med referensämne och inokulat (procedurkontroll),

▼B

— och i vissa fall 6 kolvar med testämne, referensämne och inokulat (toxicitetskontroll). För att säkert kunna identifiera 10-dagarsfönstet krävs dock dubbelt antal kolvar.

VI.2.6 Genomförande av testet

De framställda lösningarna fördelas omedelbart i de berörda grupperna av BOD-kolvar, i det att de sugs upp från den nedersta fjärdedelen (inte botten) av den passande stora kolven med en slang, och således att alla BOD-kolvarna fylls helt. Eventuella luftbubblor avlägsnas genom lätta slag på kolvens sida. Starttidskolvarna analyseras omedelbart för upplöst syre antingen genom Winkler-metoden eller med elektrod. Innehållet i kolvarna kan förvaras för senare analys med Winkler-metoden om man omedelbart tillsätter mangan(II)sulfat och natriumhydroxid (den första Winkler-reagensen). De väl tillproppade kolvarna, där syret är fixerat som brunt hydratiserat mangan(III)oxid kan förvaras i mörker vid 10–20 °C i högst 24 timmar innan Winkler-testet avslutas. Resterande kolvar tillproppas och man ser till att inga luftbubblor innesluts, och de inkuberas vid 20 °C i mörker. Parallellt med varje serie ska det göras en fullständig serie för bestämning av inokulatblindvärden. Under de 28 dagarnas inkubering uttas med bestämda intervaller (minst en gång i veckan) minst 2 kolvar av varje serie för analys av upplöst syre.

Med veckovis provtagning skulle det procentuella avlägsnandet kunna bedömas i ett 14-dagarfönster, medan det vid provtagning var 3–4 dag, vilket skulle kräva ca dubbelt så många kolvar, blir möjligt att identifiera 10-dagarfönstret.

För N-haltiga ämnen måste det korrigeras för syreförbrukning vid eventuell nitrifikation. För detta används en O_2-elektrod för bestämning av koncentrationen av upplöst syre, varefter det tas ett prov från BOD-kolven för analys av nitrit och nitrat. Den förbrukade syremängden beräknas på grundval av ökningen av nitrit- och nitratkoncentrationen (se bilaga V).

VI.3 DATA OCH RAPPORTERING

VI.3.1 **Behandling av resultat**

Först beräknas BOD efter varje tidsintervall genom att dra ifrån syreförlusten (mg O_2 per liter) i inokulatblindproven från syreförlusten i kolven med testämne. Denna korrigerade syreförlust divideras med testämnets koncentration (mg/l), varefter den specifika BOD framkommer i mg syre per mg testämne. Den procentuella bionedbrytbarheten beräknas genom att dividera den specifika BOD med den specifika ThOD (beräknad i enlighet med bilaga II.2) eller COD (bestämt genom analys, se bilaga II.3), dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämne} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blindproven})}{(\text{mg test chemical in flask})}$$

▼B

= mg O_2 per mg testämne

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg testämne)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg testämne)}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg testämne)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg testämne)}} \times 100$$

Observera att dessa två metoder inte nödvändigtvis ger samma resultat. Den först nämnda metoden rekommenderas.

Den ThOD (NH_4 eller NO_3) som motsvarar det föreliggande kännedomen om nitrifikation (bilaga II.2) används. Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukningen till nitrifikationen ut i från ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

VI.3.2 **Resultatens giltighet**

Inokulatblindprovens syreförlust bör inte vara större än 1,5 mg upplöst syre per liter efter 28 dagar. Om det finns högre värden måste försöksteknikerna granskas kritiskt. Restkoncentrationen av syre i testkolvarna får inte understiga 0,5 mg/l vid något tillfälle. Mätningar av så lågt syreinnehåll är endast giltiga om den använda mätmetoden för upplöst syre tillåter noggrann mätning av så lågt innehåll.

Se också I.5.2.

VI.3.3 **Rapportering**

Se 1.8.

VI.4 FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

CLOSED BOTTLE TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

   Namn:

   Stamlösningens koncentration: .... mg/l

   Startkoncentration i kolven: .... mg/l

   ThOD eller COD: ... mg O_2/mg testämne

4. **INOKULAT**

   Källa:

   Behandling:

▼B

Eventuell förbehandling:

Koncentration i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **DOC-BESTÄMNING**

Metod: Winkler/elektrod

Kolvanalys

Inkuberingstid (dagar)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blindprov (utan testämne)	1	C_1				
	2	C_2				
Genomsnitt	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testämne	1	a_1				
	2	a_2				
Genomsnitt	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproverna.

6. **KORREKTION FÖR NITRIFIKATION (se bilaga V)**

Inkuberingstid (dagar)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Nitratkoncentration (mg N/l)				
ii)	Ändring i nitratkoncentration (mg N/l)	—			
iii)	Syreekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Nitritkoncentration (mg N/l)				
v)	Ändring i nitritkoncentration (mg N/l)	—			
vi)	Syreekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Total syreekvivalent (mg/l)	—			

7. **FÖRLUST AV DO: % NEDBRYTNING**

	Förlust efter n dagar (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLV 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KOLV 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Förlust efter n dagar (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLV 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. av test} \times \text{ThOD för ämne}}$				
KOLV 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. av test} \times \text{ThOD för ämne}}$				
$\%\ D \text{ genomsn. } (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Ta inte genomsnittet om det föreligger väsentlig skillnad med replikaterna.

m_{to} = värde i testkolven vid tid 0

m_{tx} = värde i testkolven vid tid x

m_{bo} = genomsnittsblindvärde vid tid 0

m_{bx} = genomsnittsblindvärde vid tid x

Dessutom företas korrektion för nitrifikation i enlighet med punkt 6.

8. **BLINDPROVER FÖR FÖRLUST AV DO**

Syreförbrukningen i blindprov: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/l. Denna förbrukning är av betydelse för testets giltighet och får högst vara 1,5 mg/l.

DEL VII. **MITI TEST (metod C.4-F)**

VII.1 TESTMETODSPRINCIP

Syreupptagningen i en omrörd lösning eller uppslamning av testämnet i oorganiskt medium, som är tillsatt inokulat i form av särskild odlade ej tillvanda mikroorganismer, mäts automatiskt under 28 dagar i en mörklagd sluten respirometer vid 25 ± 1 °C. Den utvecklade koldioxiden absorberas i natriumhydroxid. Bionedbrytbarheten uttrycks som den upptagna syremängden (korrigerat för blindprovens upptagning) i procent av den teoretiska syreupptagningen (ThOD). Även den procentuella primära bionedbrytbarheten beräknas, på grundval av kompletterande specifika kemiska analyser vid inkuberingens början och slut och eventuellt genom DOC-analys.

VII.2 TESTMETODSBESKRIVNING

VII.2.1 **Apparatur**

a) Automatisk elektrolytisk BOD-mätare eller respirometer, normalt med 6 kolvar på vardera 300 ml och med skålar för CO_2-absorbtionsmedel.

▼B

b) Lokal med konstant temperatur och vattenbad på 25 ± 1 °C eller mindre.

c) Membranfiltreringsutrustning (valfritt).

d) Kolanalysator (valfritt).

VII.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Följande stamlösningar framställs av reagenser av analyskvalitet och vatten (I.6.1):

a)	monokaliumdihydrogenorthofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	dikaliummonohydrogenorthofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	dinatriummonohydrogenorthofosfat dodecahydrat, Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	ammoniumklorid, NH_4CI	1,70 g
	Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.	
	Upplösningens pH ska vara 7,2.	
b)	magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.	
c)	Kalciumklorid, vattenfritt, $CaCl_2$	27,50 g
	Upplöses i vatten och förrunnas till 1 liter.	
d)	Järn(III)klorid hexahydrat, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.	

3 ml tas av lösning a, b, c och d och förtunnas till 1 liter.

VII.2.3 **Framställning av inokulat**

Friska prover samlas in från minst 10 platser, huvudsakligen områden där det används och utleds olika kemikalier. Från sådana platser som reningsverk, floder, sjöar och havsområden insamlas 1-liters prover av slam, ytjord, vatten, etc. och allt blandas ordentligt. Material som flyter ovanpå avlägsnas och efter ett tag anpassas supernatanten till pH 7 ± 1 med natriumhydroxid och fosforsyra.

En passande mängd filtrat används för att fylla en ”fill-and-draw” aktiv slambehållare, och vätskan luftas i ca 23 timmar 30 minuter. 30 minuter efter det att luftningen avslutats hälls omkring en tredjedel av den samlade supernatant-volymen bort och det tillsätts en lika stor mängd av en lösning (med pH 7) som innehåller 0,1 % glukos, 0,1 % pepton och 0,1 % monokaliumorthoforfat, och luftningen påbörjas. Detta sker varje dag. Slamenheten drivs efter god praxis: avloppsvattnet ska vara klart, temperaturen ska hållas vid 25 ± 2 °C, pH ska vara 7 ± 1, slam ska bottenfällas bra, tillräcklig luftning ska upprätthållas för att hålla blandningen konstant aerob, protozoer ska finns till hands och slamaktiviteten ska testas mot referensämnet minst var tredje månad. Slammet får tidigast användas som inokulat efter en månads drift och inte senare än efter fyra månaders drift. Därefter uttas regelbundet prover från minst 10 platser var tredje månad.

▼B

För att hålla det friska och det gamla slammet på samma aktivitet blandas den filtrerade supernatanten från aktivt slam genom användning av lika mycket filtrerat supernatant från en färskt insamlat blandning från 10 källor, och denna vätska odlas i enlighet med ovan. 18–24 timmar efter det att enheten fyllts upp kan det tas slam för användning som inokulat.

VII.2.4 **Förberedelse av kolvar**

Sex kolvar förbereds enligt följande:

Nr 1: testämne i förtunningsvatten, 100 mg/l

Nr 2, 3 och 4: testämne förtunnat med oorganiskt medium till 100 mg/l

Nr 5: referensämne (t.ex. anilin) förtunnat med oorganiskt medium till 100 mg/l

Nr 6: rent oorganiskt medium

Svårlösliga testämnen tillsätts direkt på vikt- eller volymbasis eller hanteras i enlighet med bilaga III, bortsett från att varken lösningsmedel eller emulgatorer får användas. CO_2-absorptionsmedel placeras i alla kolvar i den särskilda skålen. pH i kolv nr 2, 3 och 4 justeras till 7,0.

VII.2.5 **Genomförandet av testet**

En liten mängd inokulat tillsätts till kolv nr 2, 3 och 4 (testuppslamningar), nr 5 (aktivitetskontroll) och nr 6 (inokulatblinprov) så att koncentrationen av uppslammat torrämne blir 30 mg/l. Inokulat tillsätts inte till kolv nr 1 som tjänar som abiotisk kontroll. Utrustningen samlas ihop, lufttätheten kontrolleras, omrörarna startas och syreupptagningsmätningen startas i mörker. Temperaturen, omrörningen och den coulometeriska syreupptagningsskrivaren kontrolleras dagligen och eventuella färgändringar i kolvarna noteras. Syreupptagningen i de 6 kolvarna avläses direkt med hjälp av en passande metod, t.ex. på sexkanalsskrivaren, som ger en BOD-kurva. Vid inkuberingens slut, normalt efter 28 dagar, mäts pH i kolvarna, och koncentrationen av resterande testämne och av eventuella biprodukter och, när det gäller vattenlösliga ämnen, eventuellt DOC-koncentrationen bestäms (bilaga II.4). Särskild försiktighet måste iakttas om det är tal om flyktiga kemikalier. Om nitrifikation förväntas bestäms om möjligt nitrat- och nitritkoncentrationen.

VII.3 DATA OCH RAPPORTERING

VII.3.1 **Behandling av resultat**

Testämnets syreförbrukning (mg) efter en viss tid, korrigerat för syreupptagningen i inokulatblinproven efter samma tid, divideras med den använda viktmängden testämne. Av detta framkommer BOD uttryck som mg syre per mg testämne, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämnet} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blinproven})}{(\text{mg testämne i kolven})}$$

= mg O_2 per mg testämne

▼B

Den procentuella bionedbrytningen framkommer av:x

$$\%\ \text{bionedbrytning} \;=\; \%\ \text{ThOD} \;=\; \frac{\text{BOD (mg } O_2 \text{ per mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2 \text{ per mg kemikalie)}} \times 100$$

För blandningar beräknas ThOD på samma sätt som för enskilda ämnen, nämligen på grundval av grundämnesanalysen. Det ThOD som används ($ThOD_{NH4}$ eller $ThOD_{NO3}$) beror på om nitrifikationen är frånvarande eller fullständig (bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukningen till nitrifikationen utifrån ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

Den procentuella primära bionedbrytningen beräknas på grundval av den mängd av den specifika (ursprungliga) kemikalie som försvinner (se I.7.2).

$$D_t \;=\; \frac{S_b \;-\; S_a}{S_b} \;\times\; 100\ \%$$

Om förlust av testämne har skett i kolv nr 1, som mäter fysisk och kemisk nedbrytning, antecknas detta och testämnets koncentration (S_b) i denna kolv efter 28 dagar används för att beräkna den procentuella bionedbrytningen.

Om (valfria) bestämningar görs av DOC beräknas den procentuella fullständiga bionedbrytningen genom:

$$D_t \;=\; \left(1 \;-\; \frac{C_t \;-\; C_{bt}}{C_o \;-\; C_{bo}}\right) \;\times\; 100\ \%$$

i enlighet med punkt I.7.1. Om testämne (DOC) har försvunnit från kolv nr 1, som mäter fysisk och kemisk nedbrytning, används DOC-koncentrationen i denna kolv för att beräkna den procentuella bionedbrytningen.

Alla resultat noteras på de tillhörande formulären.

VII.3.2 **Resultatens giltighet**

Inokulatblinprovens syreförbrukning är normalt 20–30 mg O_2/l efter 28 dagar och bör inte vara större än 60 mg/l. Om det finns värden över 60 mg/l måste data och försöksteknikerna granskas kritiskt. Om pH ligger utanför intervallet 6–8,5 och testämnets syreförbrukning är mindre än 60 % upprepas testet med lägre testämneskoncentrationer.

Se även I.5.2.

Om den procentuella nedbrytningen av anilin, beräknat utifrån syreförbrukningen, inte är större än 40 % efter 7 dagar och 65 % efter 14 dagar anses testet vara ogiltigt.

VII.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

VII.4 RESULTATFORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MITI (I) TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

▼B

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i kolven, C_0: .... mg/l ämne

Reaktionsblandningens volym, V: .... ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **INOKULAT**

Platser för provtagningen:

1) .... 6) ....

2) .... 7) ....

3) .... 8) ....

4) .... 9) ....

5) .... 10) ....

Koncentrationen av uppslammat torrämne i det aktiva slammet efter acklimatisering med syntetiskt avloppsvatten: .... mg/l.

Volym av aktivt slam per liter slutmedium: ... ml.

Slamkoncentration i slutmedium: … mg/l

5. **SYREUPPTAGNING: BIONEDBRYTBARHET**

Respirometertyp:

			Tid (dagar)				
			0	7	14	21	28
O_2 upptag. (mg) testämne	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 upptag. (mg) blindprov	b						
Korrigerat O_2 upptag. (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BOD per mg testämne	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	Kolv 1					
		Kolv 2					
		Kolv 3					
% nedbrytning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		genomsn. (*)					

(*) Ta inte genomsnittet om det föreligger en väsentlig skillnad mellan replikaterna.

▼B

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproven.

6. **KOLANALYS** (valfritt)

Kolanalysator:

Kolv	DOC				% DOC avlägsnat	Genomsnitt
	Mätt		Korrigerat			
Vatten + testämne	a				—	—
Slam + testämne	b_1		$b_1 - c$			
Slam + testämne	b_2		$b_2 - c$			
Slam + testämne	b_3		$b_3 - c$			
Kontrollblind	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC removed}: \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA FRÄN SPECIFIK KEMISK ANALYS**

	Restmängd av testämne vid testets avslutning	% nedbrytning
Blindprov med vatten	S_b	
Medium med inokulat	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

% nedbrytning beräknas för kolv a_1, a_2 och a_3.

8. **ANMÄRKNINGAR**

En kurva över BOD mot tiden ska bifogas, om sådan föreligger.

▼B

Bilaga I

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

DO: Upplöst syre (mg/l) definieras som koncentrationen av upplöst syre i ett vattnigt prov.

BOD: Biokemisk syreförbrukning (g) definieras som den mängd syre som mikroorganismer förbrukar vid metabolism av testämnet. Resultatet uttrycks också som gram upptaget syre per gram testat ämne (se metod C.5).

COD: Kemisk syreförbrukning (g) definieras som den mängd syre som förbrukas vid oxidering av testämnet med varm dikromat i sur vätska. Det är ett mått på den motsvarande mängden oxiderbart ämne; uttrycks också i g förbrukat syre per g testämne (se metod C.6).

DOC: Upplöst organiskt kol definieras som den mängd organiskt kol som finns i lösningen, passerar genom ett 0,45 μm filter eller förblir i centrifugatet efter centrifugering vid 40 000 m • s^{-2} (± 4 000 g) i 15 minuter.

ThOD: Teoretisk syreförbrukning (mg) definieras som den samlade mängden syre som krävs för fullständig oxidering av ett kemiskt ämne. Det beräknas på grundval av bruttoformeln (se bilaga II, punkt 2) och uttrycks också i mg syre per mg testämne.

$ThCO_2$: Teoretiskt koldioxid (mg) definieras som den mängd koldioxid som enligt beräkningar på grundval av testämnets kända eller mätta kolinnehåll skulle bildas vid fullständig nedbrytning av testämnet. Det uttrycks också i mg utvecklad koldioxid per mg testämne.

TOC: Ett provs totala innehåll av organiskt kol definieras som summan av organiskt kol i lösning och uppslamning.

IC: Oorganiskt kol.

TC: Ett provs totala kolinnehåll definieras som summan av organiskt och oorganiskt kol.

Primär bionedbrytning

definieras som en ändring av ett ämnes kemiska struktur, framkallad på biologisk väg, som resulterar i att ämnet mister sina specifika egenskaper.

Fullständig bionedbrytning (aerob)

definieras som den nedbrytningsgrad som har nåtts när mikroorganismer har förbrukat ett testämne fullständigt samtidigt som koldioxid, vatten, oorganiska salter och nya celldelar bildas (biomassa).

Lätt bionedbrytning

kännetecknar en godtycklig klass kemikalier som har klarat vissa specifika screeningtester för fullständig bionedbrytning. Dessa tester är så krävande att sådana ämnen snabbt kommer att fullständigt brytas ned i vattnig miljö under aeroba förhållanden.

▼B

Inherent (potentiell) bionedbrytbarhet

karakteriserar en klass kemikalier för vilka det finns klara bevis på bionedbrytning (primär eller fullständig) vid varje erkänt test av bionedbrytbarhet.

Behandlingsmöjlighet

definieras som möjligheten av avlägsna ett ämne genom biologisk avloppsvattenrening utan att avloppsvattenreningsprocessernas normala förlopp påverkas. Generellt är alla lätt bionedbrytbara ämnen behandlingsbara, men inte alla inherent bionedbrytbara ämnen. Abiotiska processer kan också inverka på detta.

Lag-period

definieras som den tid som går vid ett elimineringstest från inokuleringen tills dess att nedbrytningsprocenten är minst 10 %. Lag-perioden varierar ofta stort och är svår att reproducera.

Nedbrytningstid

definieras som tiden mellan lagperiodens slut och den tid då nedbrytningen har nått 90 % av sitt maximala värde.

10-dagarsfönstret

definieras som den period på 10 dagar som börjar när nedbrytningen har nått upp till 10 %.

▼B

Bilaga II

BERÄKNING OCH BESTÄMNING AV LÄMPLIGA HUVUDPARAMETRAR

Beroende på den metod som väljs kan olika huvudparametrar behövas. I detta avsnitt beskrivs hur dessa värden utleds. Parametrarnas användning beskrivs i de individuella metoderna.

1. Kolhalt

Kolhalten kan antingen beräknas på grundval av testämnets grundämnessammansättning eller bestämmas genom elementäranalys.

2. Teoretisk syreförbrukning (ThOD)

Den teoretiska syreförbrukningen (ThOD) kan beräknas, om grundämnessammansättningen är känd, och annars bestämmas genom elementäranalys. För föreningen

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

är det utan nitrifikation

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

och med nitrifikation

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. Kemisk syreförbrukning (COD)

Den kemiska syreförbrukningen (COD) bestäms enligt metod C.6.

4. Upplöst organiskt kol (DOC)

Upplöst organiskt kol (DOC) definieras som den organiska mängd kol i en kemikalie eller en kemikalieblandning som i vattnig lösning kan passera genom ett 0,45 μm filter.

Prover tas från testbehållarna och filtreras omedelbart genom filtreringsutrustningen som är försedd med ett passande membranfilter. De första 20 ml av filtratet kasseras (vid små filter kan denna mängd minskas). 10–20 ml samlas upp för kolanalys (vid insprutning mindre, beroende på den använda kolanalysatorn). DOC-koncentrationen bestäms med hjälp av en organisk kolämnesanalysator som gör det möjligt att noggrant bestämma en kolkoncentration på mindre än 10 % av startkoncentrationen av DOC i testet.

Om filtrerade prover inte kan analyseras samma arbetsdag kan de förvaras i högst 48 timmar i kylskåp vid 2–4 °C eller längre tid vid – 18 °C.

Anmärkningar:

Membranfilter är ofta behandlade med ytaktiva ämnen för att göra dem mer hydrofila. De kan därför innehålla upp till flera mg upplösligt organiskt kol som kommer att påverka bionedbrytbarhetsbestämningen. De ytaktiva ämnena och andra upplösliga organiska ämnen avlägsnas från filtren genom kokning i avjoniserat vatten i tre gånger 1 timme. Om engångsfilter används måste varje parti kontrolleras för att bekräfta att de inte avger upplösligt organiskt kol.

▼B

På vissa typer av membranfilter kan absorption av testämnet inträffa. Kontroll av att testämnet inte hålls kvar på filtret rekommenderas därför.

Centrifugering vid 40 000 ms^{-2} (4 000 g) i 15 minuter kan användas i stället för filtrering när man ska skilja mellan TOC och DOC. Metoden är inte pålitlig vid en startkoncentration av < 10 mg DOC per liter, då antingen inte alla bakterier avlägsnas eller något av kolet i bakteriernas cytoplasma återupplöses.

HÄNVISNINGAR

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, s. 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol. 46, s. 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 412 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarisches Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauer-stoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschüβ Wasserwesen (NAW) in DINN Deutsche Institut für Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1948, Vol. 13 (1), s. 169.

▼B

Bilaga III

BEDÖMNING AV SVÅRLÖSLIGA ÄMNENS BIONEDBRYTBARHET

Vid test av svårlösliga ämnens bionedbrytbarhet bör särskild uppmärksamhet ges åt nedanstående.

Trots att homogena vätskor sällan kommer att vålla problem vid provtagningen rekommenderas att homogenisera fasta material på lämpligt sätt, så att fel till följd av inhomogenitet undviks. Särskild omsorg ska ske vid uttagning av ett representativt prov på några få mg av blandningar av kemikalier och av ämnen som innehåller stora mängder orenheter.

Under testet kan man använda olika metoder för omrörning. Omrörningen ska dock vara så kraftig att kemikalien hålls dispergerad, och att överhettning, stark skumning och våldsam förskjutning undviks.

En emulgator kan användas för att framställa en stabil dispersion av kemikalien. Emulgatoren får inte vara toxisk för bakterier och får varken kunna brytas ned biologiskt eller vara skumbildande under testförhållandena.

Samma kriterier som för emulgatorer gäller för lösningsmedel.

Användning av fasta bärarmaterial till fasta testämnen rekommenderas inte, däremot kan de vara lämpliga till oljeaktiga ämnen.

När tillsatsämnen såsom emulgatorer, lösningsmedel och bärarmaterial används utförs ett blindprov med tillsatsämnen.

Alla tre respirometertesterna, CO_2, BOD och MITI kan användas för att undersöka svårlösliga ämnens bionedbrytbarhet.

HÄNVISNINGAR

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, s. 833.

— Gerike, P., The Biodegradation of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, s. 169.

▼B

Bilaga IV

BEDÖMNING AV BIONEDBRYTBARHETEN HOS KEMISKA ÄMNEN SOM MISSTÄNKS VARA TOXISKA FÖR INOKULAT

Om ett kemiskt ämne som underkastas ett test för lätt bionedbrytbarhet inte verkar vara bionedbrytbart rekommenderas följande förfarande om man vill skilja mellan hämning av bristande bionedbrytbarhet (Reynolds et al., 1987).

Samma eller motsvarande inokulat används för toxicitetstest som för bionedbrytbarhetstest.

För att kunna bedöma toxiciteten hos kemikalier som undersöks i test av lätt bionedbrytbarhet kan man använda en eller en kombination av följande metoder: Hämning av slammets respirationshastighet (aktiverat slam – respirationshämningstest – direktiv 88/302/EEG); BOD och tillväxthämningstest.

Om hämning till följd av toxicitet ska undvikas rekommenderas användning av testämneskoncentrationer i test av lätt bionedbrytbarhet, som högst är 1/10 av de EC_{50}-värden (eller högst de EC_{20}-värden) som erhållits vid toxicitetstest. Ämnen vars EC_{50} är större än 300 mg/l kommer troligtvis inte att ha toxiska verkningar i test för lätt bionedbrytbarhet.

Ett EC_{50} på mindre än 20 gl/l kommer troligtvis att skapa betydande svårigheter vid den efterföljande testningen. Testkoncentrationerna ska vara låga, vilket kräver användning av det strikta och känsliga Closed Bottle-testet eller av ^{14}C-markerat material. Alternativt kan det vid tillvänjning av inokulat bli möjligt att använda högre testämneskoncentrationer. I det sistnämnda fallet mister testet för lätt bionedbrytbarhet dock sin specifika karaktär.

HÄNVISNINGAR

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, s. 2259.

▼B

Bilaga V

KORREKTION AV NITRIFIKATIONENS INTERFERENS PÅ SYREUPPTAGNINGEN

Fel till följd av att inte ta hänsyn till nitrifikation vid bedömning av bionedbrytbarheten hos testämnen, som inte innehåller N, är minimal (högst 5 %) även om oxidationen av mediets innehåll av ammonium-N sker sporadiskt från testprovet till blindprovet. För testämnen som innehåller N kan dock väsentliga fel uppstå.

Om ofullständig nitrifikation sker kan reaktionsblandningens iakttagna syreupptagning korrigeras för den syremängd som har förbrukats för oxidation av ammonium till nitrit och nitrat om ändringarna i nitrit- och nitrat-koncentrationen under inkuberingen bestäms med hänsyn tagen till följande reaktionsutjämningar:

$$2NH_4C1 + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

brutto:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Från ekvation (1) blir syreupptagningen vid oxidation av 28 g kväve i form av ammoniumklorid (NH_4C1) till nitrit 96 g, dvs. en faktor av 3,43 (96/28). På motsvarande sätt blir syreupptagningen vid oxidation av 28 g kväve till nitrat (3) 128 g, dvs. en faktor av 4,57 (128/28).

Eftersom reaktionerna är *sekvensiella,* då de sker på grund av deras individuella bakteriearter, kan nitratkoncentrationen öka eller minska. I det sistnämnda fallet kommer en ekvivalent mängd nitrat att bildas. Till följd av detta blir syreförbrukningen vid nitratbildning 4,57 gånger ökningen i nitratkoncentrationen, men den syremängd som är involverad i nitritbildningen blir dock 3,43 gånger ökningen av nitritkoncentrationen, eller vid en minskning av nitritkoncentrationen, en syreförlust av -3,43 gånger koncentrationsminskningen.

Dvs.

O_2-förbrukningen vid nitratbildning = 4,57 × N-nitratkoncentrationsökningen (4)

och

O_2-förbrukningen vid nitritbildning = 3,43 × N-nitritkoncentrationsökningen (5)

och

O_2-förlusten vid nitritförsvinnande = -3,43 × N-nitritkoncentrationsminskningen (6)

och därför blir

O_2-förbrukningen till nitrifikation = ± 3,43 × N-nitntkoncentrationsändringen + 4,57 × N-nitratkoncentrationsökningen (7)

och därmed

O_2-förbrukningen till C-oxidation = total iakttagen förbrukning – förbrukning till nitrifikation (8)

Alternativt kan syreupptagningen till följd av nitrifikation som en första uppskattning sättas till 4,57 × tillväxten av oxiderat N, om endast totalt oxiderat N bestäms.

Det korrigerade värdet för syreförbrukningen till C-oxidation jämförs sedan med ThOD NH_3, beräknat enligt bilaga II.

▼B

C.5 NEDBRYTNING – BIOKEMISK SYREFÖRBRUKNING

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta den biokemiska syreförbrukningen (BOD) för fasta eller flytande organiska ämnen.

Data som erhålls vid detta test avser vattenlösliga föreningar. Dock kan, åtminstone principiellt, även flyktiga föreningar undersökas.

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid de koncentrationer som används i testet inte inverkar hämmande på bakterier. Om testämnet inte är lösligt vid testkoncentrationen kan det vara nödvändigt att vidta särskilda åtgärder, t.ex. att använda ultraljudsdispersion, för att uppnå en god dispersion av testämnet.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

BOD definieras som den mängd upplöst syre som krävs för den biokemiska oxideringsprocessen för en angiven mängd lösning av testämnet under testbetingelser.

Resultaten uttrycks som gram BOD per gram testat ämne.

1.3 REFERENSÄMNEN

Det är önskvärt att lämpligt kontrollämne används för att kontrollera inokulatets aktivitet.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i ett väl syrsatt medium, inokuleras med mikroorganismer och inkuberas i mörker vid en konstant, definierad passande temperatur.

BOD bestäms genom skillnaden mellan mängden upplöst syre i början och i slutet av testet. Testet ska pågå i minst fem dagar och högst 28 dagar.

Parallellt med testet ska utföras ett blindprov utan innehåll av testämnet.

1.5 KVALITETSKRITERIER

BOD-bestämningen kan inte anses vara en giltig bestämning av ett ämnes bionedbrytbarhet. Detta test kan endast betraktas som ett screenmg-test.

1.6 METODBESKRIVNING

En preliminär lösning eller dispersion av ämnet förbereds för att uppnå en BOD-koncentration som är förenlig med den använda metoden. BOD bestäms därefter enligt lämplig nationell eller internationell standardmetod.

▼B

2. **DATA OCH UTVÄRDERING**

BOD-innehållet i lösningen beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram BOD per gram testat ämne.

3. **RAPPORTERING**

Den använda metoden ska anges.

Den biokemiska syreförbrukningen ska vara ett medeltal av minst tre giltiga mätningar.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, särskilt avseende ämnets sammansättning, orenheter, fysiskt tillstånd och toxiska effekter som kan påverka resultaten.

Eventuella tillsatser som använts för att hämma biologisk nitrifikation ska rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

Lista över standardiserade metoder, t.ex.:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6 NEDBRYTNING – KEMISK SYREFÖRBRUKNING

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta den kemiska syreförbrukningen (COD) för fasta eller flytande organiska ämnen på ett godtyckligt standardsätt under givna laboratoriebetingelser.

Uppgifter om ämnets formel är till nytta vid utförandet av testet och tolkningen av resultaten (t.ex. halogensalter, ferrosalter av organiska föreningar, organiska klorföreningar).

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Den kemiska syreförbrukningen är ett mått på ett ämnes förmåga att oxideras, uttryckt som den ekvivalenta mängden syre i en oxiderande reagens som förbrukas av ämnet under givna laboratoriebetingelser.

Resultatet uttrycks i gram COD per gram testat ämne.

1.3 REFERENSÄMNEN

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen ska först och främst användas till att emellanåt kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i vatten, oxideras av kaliumbikromat i ett starkt svavelsyremedium med silversulfat som katalysator under återflöde i två timmar. Restmängden bikromat bestäms genom titrering med standard järnammoniumsulfat.

Vid klorhaltiga ämnen tillsätts kvicksilversulfat ([1]) för att reducera inverkan av klor.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Till följd av det godtyckliga sättet att bestämma COD ska resultatet mera betraktas som en ”indikator på oxideringsförmågan” än som ett mått på mängden organiskt ämne.

Klorid kan inverka på detta test. Oorganiska reducerande eller oxiderande ämnen kan också inverka på BOD-bestämningen.

Vissa cykliska föreningar oxideras inte till fullo vid detta test.

1.6 METODBESKRIVNING

En inledande lösning eller dispersion av ämnet bereds så att ett COD mellan 250 och 600 mg per liter erhålls.

([1]) Efter användning ska lösningar som innehåller kvicksilversalt behandlas för att undvika spridning av kvicksilver i miljön.

▼B

Anmärkningar:

Vid svårlösliga ämnen och ämnen som inte dispergerar kan finpulvriserat eller flytande ämne motsvarande ungefär 5 mg COD överföras till försöksapparaten tillsammans med vatten.

Den kemiska syreförbrukningen (COD) bestäms ofta, och särskilt för svårlösliga ämnen, i förväg med en variant av metoden, nämligen ett slutet system med tryckutjämning (H. Kelkenberg, 1975). Med denna modifikation kan det ofta med framgång företas kvantitativ bestämning av föreningar som endast med svårighet kan bestämmas genom konventionella metoder, t.ex. ättiksyra. Metoden duger dock inte för pyridin. Ökning av kaliumdikromatkoncentrationen till 0,25 N (0,0416 M) i enlighet med hänvisning 1 kan underlätta den direkta invägningen av 5–10 mg ämne, vilket är ett villkor för COD-bestämning på ämnen som är svårlösliga i vatten (hänvisning 2).

För övrig bestäms COD därefter med hjälp av en lämplig nationell eller internationell standardmetod.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

COD-innehållet i testkolven beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram COD per gram testat ämne.

3. **RAPPORTERING**

Den använda referensmetoden ska anges.

Den kemiska syreförbrukningen ska vara ett medeltal av minst tre mätningar. Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, särskilt avseende orenheter, ämnets fysiska tillstånd och egenskaper (om de är kända) som kan påverka resultaten.

Om kvicksilversulfat har använts för att minimera inverkan av klor ska detta rapporteras.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Kelkenberg, H. Z., von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8., s. 146.

2. Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, s. 169.

Lista över standardiserade metoder, t.ex.:

NBN T 91-201: Determination of the oxygen demand.

ISBN O 11 7512494: Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NTF 90-101: Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis:Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: Chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7 **Nedbrytning – ABIOTISK NEDBRYTNING: Hydrolys som funktion av pH**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 111 (2004).

1.1 INLEDNING

Kemikalier kan nå ytvatten genom direktutsläpp, vindavdrift, avrinning, dränering, avfallsdeponering, avloppsvatten från industrier, hushåll eller jordbruk och genom atmosfärisk deposition, och de kan där omvandlas genom kemiska (t.ex. hydrolys, oxidation), fotokemiska och mikrobiella processer. I denna riktlinje beskrivs en testmetod för bedömning av abiotisk hydrolytisk omvandling av kemikalier i akvatiska system vid pH-värden som normalt förekommer i miljön (pH 4–9). Riktlinjen grundar sig på nuvarande riktlinjer (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Försöken utförs för att fastställa dels i) testsubstansens hydrolyshastighet som funktion av pH, dels ii) vilken typ av hydrolysprodukter som organismer kan exponeras för samt dessas bildnings- och nedbrytningshastighet. Sådana studier kan vara nödvändiga för kemikalier som släpps ut direkt i vatten eller som kan komma att nå miljön genom de andra vägar som nämns ovan.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Se bilaga 2.

1.3 METODENS ANVÄNDBARHET

Metoden kan generellt användas för kemiska ämnen (omärkta eller märkta) för vilka det finns en tillräckligt noggrann och känslig analysmetod. Den kan användas för halvflyktiga och ickeflyktiga ämnen som är tillräckligt vattenlösliga. Testet bör inte användas för kemikalier som är lättflyktiga från vatten (t.ex. gasningsmedel, organiska lösningsmedel) och som därför inte kan hållas i lösning under de förhållanden som råder under testet. Testet kan vara svårt att utföra med ämnen som har mycket låg löslighet i vatten (8).

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Sterila vattenbaserade buffertlösningar med olika pH-värde (pH 4, 7 och 9) behandlas med testsubstansen och inkuberas i mörker under kontrollerade försöksbetingelser (vid konstant temperatur). Med lämpliga tidsintervall bestäms halterna av testsubstansen och hydrolysprodukter i buffertlösningarna. Om testsubstansen är märkt (t.ex. med ^{14}C) så blir det lättare att upprätta en massbalans.

I testet används en stegvis metod som visas och förklaras i bilaga 1. Varje teststeg utlöses av resultaten från föregående steg.

▼B

1.5 INFORMATION OM TESTSUBSTANSEN

Omärkta eller märkta testsubstanser kan användas vid mätning av hydrolyshastigheten. Märkt material är i regel att föredra vid studier av reaktionsvägar och för att upprätta massbalans. I vissa speciella fall är dock märkning inte helt nödvändig. ^{14}C-märkning rekommenderas, men andra isotoper, t.ex. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, kan också vara användbara. Om möjligt bör märkningen placeras i molekylens mest stabila del(ar). Om det undersökta ämnet exempelvis innehåller en ring så ska märkningen sitta på denna ring. Om ämnet innehåller två eller flera ringar kan det krävas särskilda studier för att utvärdera vad som händer med varje enskild märkt ring och för att få mer information om bildningen av hydrolysprodukter. Testsubstansens renhet bör vara minst 95 %.

Innan ett hydrolystest utförs ska följande uppgifter om testsubstansen finnas tillgängliga:

a) Löslighet i vatten (testmetod A.6)

b) Löslighet i organiska lösningsmedel

c) Ångtryck (testmetod A.4) och/eller Henrys konstant

d) Fördelningskoefficient n-oktanol/vatten (testmetod A.8)

e) Dissociationskonstant (pK_a) (OECD:s riktlinje 112) (9)

f) Nedbrytningshastighet vid direkt och indirekt fotolys i vatten, i tillämpliga fall

Analysmetoder för kvantifiering av testsubstansen och, om så behövs, för identifiering och kvantifiering av hydrolysprodukter i vattenlösningar ska finnas tillgängliga (se även avsnitt 1.7.2).

1.6 REFERENSSUBSTANSER

Om möjligt bör referenskemikalier användas för att identifiera och kvantifiera hydrolysprodukter med hjälp av spektroskopiska och kromatografiska metoder eller andra metoder med lämplig känslighet.

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Analys av minst två identiska prov med buffertlösning eller extrakt av dessa omedelbart efter tillsättning av testsubstansen ger en första indikation på analysmetodens repeterbarhet och på hur enhetligt sättet att tillföra testsubstansen är. Under försökens senare steg erhålls uppgifter om utbyte med hjälp av respektive massbalanser (om märkta material används). Utbytet bör ligga mellan 90 och 110 % för märkta och omärkta kemikalier (7). Om det är tekniskt svårt att få så högt utbyte så kan ett utbyte på 70 % godtas för omärkta kemikalier, men i så fall bör motivering ges.

▼B

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Repeterbarheten hos de analysmetoder som används för att kvantifiera testsubstansen och hydrolysprodukterna i senare skeden kan bestämmas genom analys av dubbelprover av samma buffertlösningar (eller extrakt av dessa) efter det att hydrolysprodukter har bildats i tillräckliga mängder för kvantifiering.

Analysmetoden bör vara så känslig att det är möjligt att kvantifiera testsubstansen i koncentrationer som är högst 10 % av den ursprungliga koncentrationen. I tillämpliga fall bör analysmetoderna också vara så känsliga att det är möjligt att kvantifiera hydrolysprodukter som motsvarar minst 10 % av tillsatsen (i varje skede av undersökningen) och ned till högst 25 % av den högsta koncentrationen.

1.7.3 **Konfidensintervall för kinetiska data för hydrolysen**

Konfidensintervall ska beräknas och redovisas för alla regressionskoefficienter, hastighetskonstanter, halveringstider och andra kinetiska parametrar (t.ex. DT50).

1.8 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.8.1 **Utrustning**

Försöken bör göras i glaskärl (t.ex. provrör eller små kolvar) under mörka och sterila förhållanden om så krävs. Undantag görs om förhandsuppgifter (exempelvis fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten) indikerar att testsubstansen kan fastna på glas. I sådana fall bör ett alternativt material (till exempel teflon) övervägas. Problemet med vidhäftning till glas kan eventuellt avhjälpas med en eller flera av följande metoder:

— Bestämning av den massa av testsubstans och hydrolysprodukter som fastnar på provkärlet.

— Användning av ultraljudsbad.

— Alla glaskärl tvättas med lösningsmedel vid varje provtagningsintervall.

— Användning av bruksfärdiga produkter.

— Användning av en större mängd hjälplösningsmedel för tillförsel av testsubstansen till systemet – hjälplösningsmedlet får dock inte leda till hydrolys av testsubstansen.

Temperaturreglerade skakvattenbad eller termostatreglerade inkubatorer för inkubation av de olika testlösningarna krävs i normala fall.

Normal laboratorieutrustning krävs, och särskilt följande:

— pH-mätare.

▼B

— Analysinstrument såsom gaskromatograf, vätskekromatograf och utrustning för tunnskiktskromatografi samt lämpliga detektionssystem för analys av radioaktivt märkta och omärkta ämnen eller metod för isotoputspädning.

— Instrument för identifiering, t.ex. masspektrometer, gaskromatograf-masspektrometer, vätskekromatograf-masspektrometer, NMR-spektrometer.

— Vätskescintillationsräknare.

— Separertrattar för vätske-vätskeextraktion.

— Instrument för att koncentrera lösningar och extrakt (t.ex. rotationsevaporator).

— Utrustning för temperaturreglering (t.ex. vattenbad).

Kemiska reagens, exempelvis följande:

— Organiska lösningsmedel av analytisk renhetsgrad (p.a.), t.ex. hexan, diklormetan.

— Scintillationsvätska.

— Buffertlösningar (för närmare uppgifter se avsnitt 1.8.3).

Alla glaskärl, vatten av analytisk renhetsgrad (p.a.) och buffertlösningar som används i hydrolystestet bör vara sterila.

1.8.2 **Tillförsel av testsubstans**

Testsubstansen tillförs de olika buffertlösningarna i form av vattenlösning (se bilaga 3). För att underlätta upplösningen kan om så krävs små mängder lösningsmedel som är blandbara med vatten (såsom acetonitril, aceton eller etanol) tillåtas för tillförsel och fördelning av testsubstansen. Koncentrationen bör dock i normala fall inte överskrida en volymprocent. Högre koncentrationer av lösningsmedel (t.ex. när det gäller svårlösliga testsubstanser) kan tillåtas endast om det kan visas att lösningsmedlet inte påverkar hydrolysen av testsubstanserna.

Bruksfärdiga produkter bör inte användas rutinmässigt eftersom det inte kan uteslutas att de ingående beståndsdelarna kan påverka hydrolysprocessen. För testsubstanser som är svårlösliga i vatten eller binder till glas kan dock bruksfärdiga lösningar vara ett lämpligt alternativ.

En och samma koncentration av testsubstansen ska användas, och den bör inte överskrida 0,01 M eller halva mättnadskoncentrationen (se bilaga 1).

▼B

1.8.3 **Buffertlösningar**

Hydrolystestet utförs vid pH-värdena 4, 7 och 9. Buffertlösningar för testet bereds av kemikalier och vatten av analytisk renhetsgrad (p.a.). Några användbara buffertsystem beskrivs i bilaga 3. Det bör noteras att hydrolyshastigheten kan påverkas av det buffertsystem som används. Om sådan påverkan observeras bör ett alternativt buffertsystem användas ([1]).

I varje buffertlösning bör pH kontrolleras med en kalibrerad pH-mätare med en noggrannhet på ± 0,1 eller bättre vid relevant temperatur.

1.8.4 **Testförhållanden**

1.8.4.1 *Testtemperatur*

Hydrolysförsöken ska utföras vid konstanta temperaturer. För extrapolering är det viktigt att temperaturen inte varierar mer än ± 0,5 °C.

Ett inledande test (steg 1) utförs vid 50 °C om testsubstansens hydrolysegenskaper inte är kända. Kinetiska test i senare steg utförs vid minst tre temperaturer (inbegripet testet vid 50 °C) om inte testet i steg 1 visar att testsubstansen är stabil mot hydrolys. Förslagsvis görs testen i temperaturintervallet 10–70 °C (helst minst en temperatur under 25 °C), vilket omfattar rapporteringstemperaturen 25 °C och de flesta temperaturer som förekommer i miljön.

1.8.4.2 *Ljus och syre*

Alla hydrolystest bör utföras med en lämplig metod för att undvika fotolys. Alla lämpliga åtgärder bör vidtas för att avlägsna syrgas (t.ex. att bubbla med helium, kvävgas eller argon i fem minuter innan lösningen bereds.)

1.8.4.3 *Testets varaktighet*

Det inledande testet bör pågå i fem dagar, medan testen i senare steg bör pågå tills 90 % av testsubstansen är hydrolyserad, dock inte längre än 30 dagar.

1.8.5 **Testets utförande**

1.8.5.1 *Inledande test (steg 1)*

Det inledande testet utförs vid 50 ± 0,5 °C och pH 4,0, 7,0 och 9,0. Om mindre än 10 % av hydrolysen har skett efter fem dagar ($t_{0,5}$ 25 °C > 1 år) så bedöms testsubstansen vara hydrolytiskt stabil och i normala fall krävs inga fortsatta tester. Om det är känt att ämnet är instabilt vid normala omgivningstemperaturer ([2]) så krävs inget inledande test. Analysmetoden måste ha tillräcklig precision och känslighet för att kunna påvisa en tioprocentig minskning av ursprungskoncentrationen.

([1]) Mabey och Mill rekommenderar borat- eller acetatbuffert i stället för fosfatbuffert (11).

([2]) Sådan information kan komma från andra källor, såsom litteraturuppgifter om hydrolys av strukturellt likartade föreningar, eller från andra preliminära, semikvantitativa hydrolystest med testsubstansen på ett tidigare utvecklingsstadium.

▼B

1.8.5.2 *Hydrolys av instabila ämnen (steg 2)*

Testet i steg 2 utförs vid de pH-värden där testsubstansen var instabil enligt det inledande testet. Buffertlösningar av testsubstansen hålls vid de valda temperaturerna med hjälp av termostat. Vid test av reaktioner av första ordningen analyseras varje testlösning med tidsintervall som ger minst sex datapunkter som i normala fall är jämnt fördelade mellan 10 och 90 % hydrolys av testsubstansen. Individuella dubbelprov (minst två replikat, i separata reaktionskärl) tas ut och innehållet analyseras vid minst sex provtagningstillfällen (för att få minst tolv replikat av datapunkter). Det bedöms vara olämpligt att använda ett enda bulkprov från vilket enskilda alikvoter av testlösningen tas ut vid varje provtagningsintervall, eftersom detta förfarande inte gör det möjligt att analysera variationen i data och det dessutom kan medföra problem med kontaminering av testlösningen. Test för att bekräfta sterilitet bör utföras i slutet av steg 2 (dvs. vid 90 % hydrolys eller 30 dagar). Om ingen nedbrytning (dvs. omvandling) observeras behöver dock inga sterilitetstest göras.

1.8.5.3 *Identifiering av hydrolysprodukter (steg 3)*

Alla viktiga hydrolysprodukter, åtminstone de som motsvarar > 10 % av den tillförda dosen, bör identifieras med lämpliga analysmetoder.

1.8.5.4 *Valfria test*

Ytterligare test vid andra pH-värden än 4, 7 och 9 kan vara nödvändiga för hydrolytiskt instabila testsubstanser. Exempelvis kan det, för fysiologiska ändamål, vara nödvändigt att göra ett test vid surare förhållanden (t.ex. pH 1,2) och vid en enda fysiologiskt relevant temperatur (37 °C).

2. **DATA**

Mängderna av testsubstans och eventuella hydrolysprodukter bör anges i procent av den tillförda ursprungskoncentrationen eller om så är lämpligt i mg/l för varje provtagningsintervall och för varje pH-värde och testtemperatur. Dessutom bör en massbalans anges i procent av den tillförda ursprungskoncentrationen om en märkt testsubstans har använts.

Testsubstansens koncentration som funktion av tiden bör redovisas grafiskt med logaritmerade värden. Alla viktiga hydrolysprodukter, åtminstone de som motsvarar ≥ 10 % av den tillförda dosen, bör identifieras, och logaritmerade värden av deras koncentrationer bör redovisas grafiskt på samma sätt som för modersubstansen för att visa bildnings- och nedbrytningshastighet.

▼B

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Mer exakta bestämningar av halveringstiderna eller DT50 bör göras med hjälp av lämpliga kinetiska modeller. Halveringstid och DT50-värden (inklusive konfidensintervall) rapporteras för varje pH-värde och temperatur tillsammans med en beskrivning av den modell som använts, kinetisk ordningsgrad och bestämningskoefficient (r^2). Om så är lämpligt bör motsvarande beräkningar göras för hydrolysprodukterna.

Om hastigheterna undersöks vid olika temperaturer bör hastighetskonstanterna (kobs) för hydrolys av pseudoförsta ordningen beskrivas som funktion av temperaturen. Beräkningen bör grundas både på en uppdelning av kobs i hastighetskonstanter för syrakatalyserad, neutral och baskatalyserad hydrolys (k_H, $k_{neutral}$, respektive k_{OH}) och på Arrhenius ekvation:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

där A_i och B_i är regressionskonstanter från skärningspunkten respektive lutningen för en anpassad linje som har erhållits genom linjär regression av ln k_i mot det reciproka värdet av den absoluta temperaturen i Kelvin (T). Genom att använda Arrheniusrelationerna för syrakatalyserad, neutral och baskatalyserad hydrolys kan hastighetskonstanter av pseudo-första ordningen och därmed halveringstider beräknas för andra temperaturer för vilka en direkt experimentell bestämning av hastighetskonstanten inte är praktiskt genomförbar (10).

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

I de flesta hydrolysreaktioner är reaktionshastigheterna uppenbart av första ordningen och halveringstiderna är därför oberoende av koncentrationen (se ekvation 4 i bilaga 2). Detta innebär att laboratorieresultat som bestämts vid 10^{-2} till 10^{-3} M i allmänhet kan tillämpas på de förhållanden som råder i miljön ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey och Mill (11) har rapporterat flera exempel på god överensstämmelse mellan hydrolyshastigheter uppmätta i både rena och naturliga vatten för ett stort antal kemikalier, förutsatt att både pH och temperatur hade mätts.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

Testsubstans:

— Trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse av märkningsposition om radioaktivt märkt material används) och relevanta fysikaliskkemiska egenskaper (se avsnitt 1.5).

— Testsubstansens renhet och eventuella föroreningar.

— Renhet och aktivitet per mol hos den isotop som används för märkning (i tillämpliga fall).

▼B

— Buffertlösningar.

— Beredningsdag och andra uppgifter om beredningen.

— Typ av buffertar och vatten.

— Buffertlösningarnas molaritet och pH.

Testförhållanden:

— Försöksdag.

— Mängd tillförd testsubstans.

— Metod och lösningsmedel (typ och mängd) för tillförsel av testsubstansen.

— Inkuberad volym av buffertlösning med testsubstans.

— Beskrivning av inkubationssystemet.

— pH och temperatur under försöket.

— Provtagningstidpunkter.

— Extraktionsmetod(er).

— Metoder för kvantifiering och identifiering av testsubstansen och hydrolysprodukter i buffertlösningarna.

— Antal replikat.

Resultat:

— Analysmetodernas repeterbarhet och känslighet.

— Utbyten (procentvärden för en godtagbar undersökning anges i avsnitt 1.7.1).

— Tabeller över data och medelvärden för replikat.

— Massbalans under och i slutet av försöken (om märkta testsubstanser används).

— Resultat av inledande test.

— Diskussion och tolkning av resultaten.

— Alla originaldata och siffror.

Följande uppgifter krävs endast om hydrolyshastigheten har bestämts:

— Diagram över koncentration som funktion av tiden för testsubstanserna och i tillämpliga fall för hydrolysprodukterna vid varje pH-värde och temperatur.

— Tabeller över resultaten av Arrhenius ekvation för temperaturen 20 ºC/25 ºC, med pH, hastighetskonstant [h^{-1} eller dag^{-1}], halveringstid eller DT_{50}, temperaturer (ºC) inklusive konfidensintervall samt korrelationskoefficienter (r^2) eller motsvarande information.

— Föreslagna reaktionsvägar för hydrolysen.

▼B

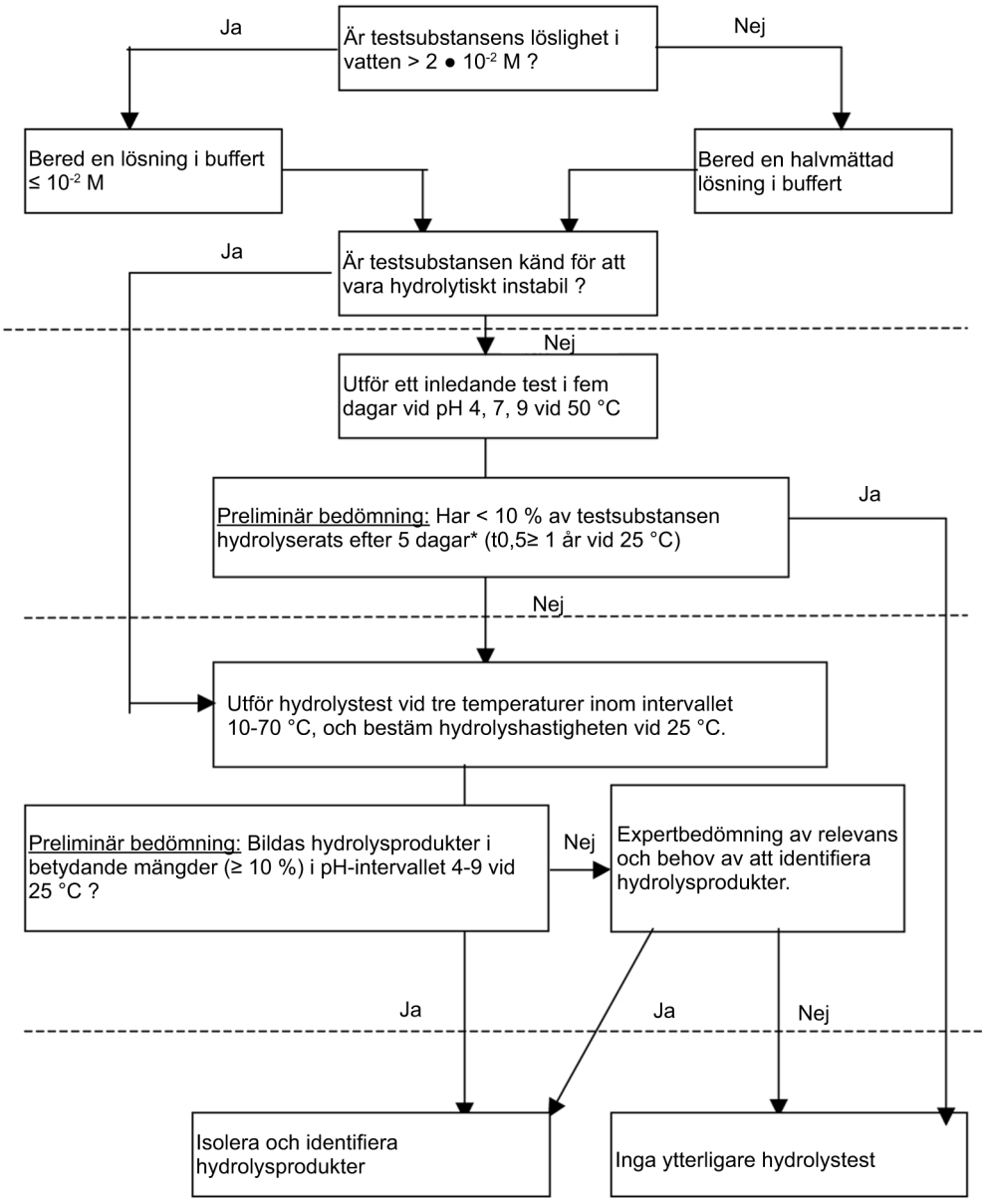
4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (1981), Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals no 111, adopted 12 May 1981.
2. US-Environmental Protection Agency (1982), 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
3. Agriculture Canada (1987), Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
4. Europeiska unionen (EU) (1995), kommissionens direktiv 95/36/EG om ändring av rådets direktiv 91/414/EEG om utsläppande av växtskyddsmedel på marknaden. Bilaga V: Omvandling, spridning och fördelning i miljön.
5. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991), Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
6. BBA (1980), Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (oktober 1980).
7. SETAC (1995), Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides, Mark R. Lynch, Ed.
8. OECD (2000), Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment no 23.
9. OECD (1993), Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
10. Nelson, H, Laskowski D, Thermes S., and Hendley P. (1997), Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, november 1993).
11. Mabey, W. and Mill, T. (1978), Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼B

Bilaga 1

Översikt över hydrolystestets olika steg



* 10 % hydrolys av en testsubstans vid 50 ºC motsvarar en halveringstid på ungefär 30 dagar, vilket motsvarar ungefär ett år vid 25 ºC.

▼B

Bilaga 2

Definitioner och enheter

SI-enheter ska alltid användas.

testsubstans: alla ämnen, oavsett om det gäller den ursprungliga föreningen eller relevanta omvandlingsprodukter.

omvandlingsprodukter: omvandlingsprodukter: alla ämnen som uppstår till följd av biotiska eller abiotiska omvandlingsreaktioner av testsubstansen.

hydrolysprodukter: alla ämnen som uppstår till följd av hydrolytiska omvandlingsreaktioner av testsubstansen.

hydrolys: en testsubstans RX reagerar med vatten varvid slutresultatet blir att gruppen X byts ut mot OH.

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

I denna förenklade process minskar koncentrationen av RX med en hastighet enligt formeln

hastighet = $k\ [H_2O]\ [RX]$ reaktion av andra ordningen

eller

hastighet = $k\ [RX]$ reaktion av första ordningen

beroende på det hastighetsbestämmande steget. Eftersom vatten finns i stort överskott jämfört med testsubstansen brukar denna typ av reaktion beskrivas som en reaktion av första ordningen där den observerade hastighetskonstanten erhålls genom förhållandet

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

och kan bestämmas med hjälp av uttrycket (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

där

t = tiden

och C_0, C_t = koncentrationerna av RX vid tiderna 0 och t.

Enheten för denna konstant har dimensionen $(tid)^{-1}$ och reaktionens halveringstid (den tid det tar för 50 % av RX att reagera) erhålls genom

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

halveringstid: betecknas med ($t_{0,5}$) – den tid det tar för en testsubstans att hydrolyseras till 50 % när reaktionen kan beskrivas med kinetik av första ordningen; halveringstiden är oberoende av koncentrationen.

(*) Om diagrammet över logaritmerade data som funktion av tiden inte visar att funktionen är linjär (ekvivalent med en reaktionshastighet av första ordningen) så är ekvation 3 olämplig för att bestämma hastighetskonstanten för hydrolys av testsubstansen.

▼B

DT_{50} (Disappearance Time 50): Den tid inom vilken testsubstansens koncentration minskar med 50 %; den skiljer sig från halveringstiden $t_{0,5}$ om reaktionen inte följer en kinetik av första ordningen.

Uppskattning av k vid olika temperaturer

Om hastighetskonstanterna är kända för två temperaturer så kan hastighetskonstanterna vid andra temperaturer beräknas med hjälp av Arrhenius ekvation:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ eller } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Ett diagram över ln k som funktion av 1/T ger en rät linje med lutningen -E/R

där

k = hastighetskonstanten mätt vid olika temperaturer

E = aktiveringsenergin [kJ/mol]

T = absolut temperatur [K]

R = gaskonstanten [8,314 J/mol· K]

Aktiveringsenergin beräknas genom regressionsanalys eller följande ekvation:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

där $T_2 > T_1$.

▼B

Bilaga 3

Buffertsystem

A. **CLARK OCH LUBS:**

Buffertblandningar enligt CLARK och LUBS (*)

Sammansättning	pH
0,2 N HCl OCH 0,2 N KCl VID 20 ºC	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	2,2
0,1 M kaliumbiftalat +0,1 N HCl vid 20 ºC	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,8
0,1 M kaliumbiftalat +0,1 N NaOH vid 20 ºC	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,8

(*) De pH-värden som anges i dessa tabeller har beräknats från de potentiella mätningarna med hjälp av Sörensens standardekvationer (1909). Motsvarande pH-värden är 0,04 enheter högre än tabellvärdena.

▼B

Sammansättning	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	6,0

Buffertblandningar enligt CLARK och LUBS (fortsättning)

0,1 M monokaliumfosfat +0,1 N NaOH vid 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 i 0,1 M KCl +0,1 N NaOH vid 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF OCH VLEESCHHOUWER:**

Citratbuffertar enligt KOLTHOFF och VLEESCHHOUWER

Sammansättning	pH
0,1 M monokaliumfosfat och 0,1 N HCl vid 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,6
0,1 M monokaliumfostat och 0,1 N NaOH vid 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	6,0

(*) Tillsätt en liten kristall tymol eller liknande ämne för att förhindra svampangrepp.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Boratblandningar enligt SÖRENSEN

Sammansättning		Sörensen 18 °C	Walbum, pH vid		
ml borax	ml HCl/NaO H		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax +0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax +0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Fosfatblandningar enligt SÖRENSEN

Sammansättning	pH
0,0667 M monokaliumfosfat + 0,0667 M dinatriumfosfat vid 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8 TOXICITET HOS DAGGMASKAR

TEST I SYNTETISK JORD

1. METOD

1.1 INLEDNING

Vid detta laboratorietest tillsätts testämnet till syntetisk jord i vilken daggmaskar placeras i 14 dagar. Efter denna period (alternativt efter sju dagar) undersöks ämnetd dödliga verkan på daggmaskarna. Detta test är en metod för att under en relativt kort tid undersöka kemikaliers verkan på daggmaskar vid upptagning genom huden eller via fodret.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

LC_{50}: Koncentrationen av ett ämne som kan förväntas orsaka att 50 % av försöksdjuren dör under testperioden.

1.3 REFERENSÄMNE

En referensämne används regelbundet för att visa att testsystemets känslighet inte har ändrats signifikant.

Som referensämne rekommenderas analytiskt rent kloracetamid.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Eftersom jord är ett variabelt medium används en noggrant definierad syntetisk lerjord för detta test. Vuxna daggmaskar av arten *Eisenia foetida* (se anmärkningen i tillägget) hålls i en definierad syntetisk jord som behandlats med olika koncentrationer av testämnet. Behållarnas innehåll sprids ut på en bricka 14 dagar (alternativt sju dagar) efter inledningen av testet och det antal daggmaskar som överlever vid varje koncentration räknas.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Testet är beräknat att vara så reproducerbart som möjligt med hänsyn till testsubstrat och organism. Om dödligheten hos kontrolldjuren överstiger 10 % vid testets avslutning är testet ogiltigt.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 *Material*

1.6.1.1 Testsubstrat

Väldefinierad syntetisk jord används som bassubstrat.

a) Bassubstrat (viktprocent torrämne)

— 10 % sphagnum (så nära pH-värde 5,5–6 som möjligt utan synliga plantrester och finfördelat).

▼B

— 20 % kaolinhaltig lera, helst med över 50 % kaolinit.

— Cirka 69 % industriell kvartssand (övervägande finsand med över 50 % med en partikel storlek av 0,05–0,2 mm). Om testämnet inte är tillräckligt lätt uppslammad i vatten sätts 10 g per testbehållare åt sidan för senare blandning med testämnet.

— Cirka 1 % kalciumkarbonat ($CaCO_3$), pulvriserat, kemiskt rent, tillsatt för att få ett pH-värde av 6,0± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består av bassubstrat, testämne och avjoniserat vatten.

Vatteninnehållet motsvarar ca 25–42 viktprocent av bassubstratets torrvikt. Substratets vatteninnehåll bestäms genom torkning av ett prov till konstant vikt vid 105 °C. Ett viktigt kriterium är att den syntetiska jorden har fuktats så mycket det går, men det får inte finnas något stående vatten. Blandningen sker omedelbart så att det blir en jämn fördelning av testämnet och substratet. Den metod som används för att tillsätta testämnet till substratet ska rapporteras.

c) Kontrollsubstrat

Kontrollsubstratet består av bassubstrat, testämne och avjoniserat vatten. Om en tillsättningsämne används ska ett extra kontrollsubstrat innehålla samma mängd tillsättningsämne.

1.6.1.2 Testbehållare

Glasbehållare med ett omfång av ca 1 liter (korrekt täckta med plastlock, plattor eller plastfolie med ventilationshål) fyllda med en mängd våt test- eller kontrollsubstrat motsvarande 500 g av substratets torrvikt.

1.6.2 *Testbetingelser*

Behållarna förvaras i klimatkammare vid en temperatur av 20 °C med en tolerans av ± 2 °C och i konstant ljus. Ljusintensiteten bör vara 400–800 lux.

Testperioden varar i 14 dagar, men dödligheten kan eventuellt bedömas sju dagar efter testets inledning.

1.6.3 *Förfarande*

Testkoncentrationer

Testämnets koncentrationer uttrycks som ämnets vikt i förhållande till grundsubstratets torrsvikt (mg/kg).

Förtest

Det koncentrationsområde som orsakar 0–100 % dödlighet kan bestämmas genom ett förtest för att få information om vidden av koncentrationer som ska användas vid det definitiva testet.

▼B

Ämnet bör testas i följande koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 och 0,1 mg/ämne/kg testsubstrat (torrvikt).

Om en fullständig definitiv test ska göras räcker det att för förtestet använda en uppsättning per koncentration och en för den obehandlade kontrollen med vardera tio daggmaskar.

Definitivt test

Resultaten av förtestet används för att välja minst fem koncentrationer i en geometrisk serie som täcker 0–100 % dödlighet och där den konstanta faktorn inte får överstiga 1,8.

Vid test med dessa koncentrationer bör det vara möjligt att med största möjhga exakthet bedöma LC_{50}-värdet och dess konfidensgränser.

Vid det definitiva testet används minst fyra testgrupper per koncentration och fyra obehandlade kontrollgrupper med vardera tio daggmaskar. Resultaten av dessa parallellgrupper anges som ett medelvärde och en standardavvikelse.

Om två på varandra följande koncentrationer, med ett förhållande av 1,8, endast ger 0 och 100 % dödlighet är dessa två värden tillräckliga för att ange LC_{50}-interval! et.

Blandning av bassubstratet och testämnet

Testämnet bereds, när så är möjligt, utan tillsättning av annat än vatten. Omdelbart före inledningen av testet blandas en emulsion eller dispersion av tesämnet i avjoniserat vatten eller annat lösningsmedel med bassubstratet eller sprayas ut jämnt över detta med en fin kromatografispruta eller liknande.

Om testämnet inte går att lösa i vatten kan det lösas i minsta möjliga mängd av ett passande organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform).

Endast medel som inte går att lösa i vatten för användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testämnet. Testsubstratet luftas innan användning. Den förångade vattenmängden ersätts. Kontrollsubstratet får innehålla eventuella tillsättningsämnen i samma mängd.

Om det inte går att lösa, dispergera eller emulgera testämnet i organiska lösningsmedel blandas en blandning av finsand av malen kvarts och den kvantitet av testämnet som är nödvändig för att behandla 500 g torrvikt av syntetisk jord med 490 g torrvikt av testämnet.

För varje testgrupp placeras en mängd våt testsubstrat motsvarande 500 g torrvikt i varje glasbehållare och tio daggmaskar, som under 24 timmar har invänjts i ett liknande vått bassubstrat och därefter snabbt sköljts av och avdroppats på filterpapper innan användning, placeras på testsubstratets yta.

▼B

Behållarna täcks med perforerade plastlock, plattor eller plastfolie för att förhindra att substratet torkar, och de förvaras under testbetingelse i 14 dagar.

Utvärderingen sker 14 dagar (alternativt sju dagar) efter testets inledning. Substratet sprids ut på en platta av glas eller rostfritt stål. Daggmaskarna undersöks och antalet överlevande daggmaskar fastställs. Daggmaskar anses vara döda om de inte reagerar på en lätt mekanisk påverkan av framänden.

När undersökningen sker efter sju dagar hälls substratet tillbaka i behållaren och överlevande daggmaskar läggs tillbaka pä testsubstratets yta.

1.6.4 *Testorganismer*

Testorganismerna bör vara daggmaskar av arten *Eisenia foetida* (se anmärkningen i tillägget) (minst två månader gamla med clitellum) och väga (vått tillstånd) 300–600 mg. (För uppfödning se tillägget).

2. DATA

2.1 BEHANDLING OCH UTVÄRDERING AV DATA

De använda koncentrationerna av testämnet rapporteras med angivelse av den procentuella dödligheten för varje koncentration.

När erhållna data inte är tillräckliga kan LC_{50} och dess konfidensgränser (p = 0,05) bestämmas genom användning av standardmetoder (Lichtfield and Wilcoxon, 1949, eller motsvarande metod). LC_{50} anges som mg testämne per kg testsubstrat (torrvikt)

Om koncentrationskurvans böjning vid ett förhållande av 1,8 endast ger 0 och 100 % dödlighet är dessa två värden tillräckliga för att ange LC_{50}-intervallet.

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla:

— Angivelse av att testet utförts i överensstämmelse med ovanstående kvalitetskriterier.

— Angivelse av det genomförda testet (förtest och/eller definitivt test).

— Noggrann beskrivning av testbetingelserna eller angivelse av att testet utförts i överensstämmelse med metoden. Eventuella avvikelser ska rapporteras.

— Noggrann beskrivning av hur testämnet blandats i bassubstratet.

— Uppgifter om testorganismer (art, ålder, medelvikt samt lägsta och högsta vikt, betingelserna för uppfödning och hållning samt leverantör).

▼B

— Använd metod för bestämning av LC_{50}.

— Testresultaten, inbegripet alla använda data.

— Beskrivning av observerade symptom eller beteendeförändringar hos testorganismerna.

— Dödlighet i kontrollgrupperna.

— LC_{50} eller högsta testkoncentration utan dödlighet och lägsta testkoncentration med en dödlig het av 100 % 14 dagar (alternativt sju dagar) efter testets inledning.

— Ritning av koncentrations/reaktionskurvan.

— Resultat som erhållits med referensämnet antingen i samband med det ifrågavarande testet eller vid tidigare kvalitetskontrollundersökningar.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (1981), *Test Guideline 207,* rådets beslut K(81) 30 slutlig.

2. Edwards, C. A. och Lofty, (1977), *Biology of Earthworms.* London: Chapman and Hall, s. 331.

3. Bouche, M. B. (1972), *Lombriciens de France, Écologie et Systématique.* Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, s. 671.

4. Litchfield, J. T. och Wilcoxon J.(1949), A simplified method of evaluating dose-effect experi ments, J. *Pharm. Esp. Therap.,* vol. 96, s. 99–113.

5. Europeiska gemenskapernas kommission, *Development of a standard laboratory method for assaying the toxicity of chemical substances to earthworms,* Rapport EUR 8714 EN.

6. Umweltsbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin (1984), Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden, i: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Tillägg

Uppfödning och hållning av daggmaskar före test

Vid uppfödning av djuren placeras 30–50 vuxna daggmaskar i en avelsbur med färsk substrat och avlägsnas efter 14 dagar. Dessa djur kan användas för uppfödning av senare grupper. De daggmaskar som kläcks ur kokongerna används för test när de är könsmogna (under föreskrivna villkor efter 2–3 månader).

Förhållanden för hållning och uppfödning

Klimatkammare:	Temperatur 20 °C med en tolerans av ± 2 °C, helst med konstant belysning (ljusintensitet 400–800 lux).
Avelsburar:	Lämpliga låga burar med en volym av 10–20 1.
Substrat:	*Eisennia foetida* kan födas upp i olika djurexkrement. Som uppfödningsmedium rekommenderas en blandning av lika delar av torv och ko- eller hästgödsel. Substratet bör ha ett pH-värde av 6–7 (reglerat med kalciumkarbonat) och låg jonledningsförmåga (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration).
	Substratet bör vara fuktigt men inte för vått.
	Andra lämpliga metoder utöver ovan nämnda kan användas.

Anmärkning: Det finns två raser av *Eisenia foetida* som vissa systematiker har klassificerat som arter (Bouche, 1972). De är morfologiskt liknande men den ena, *Eisenia foetida foetida* har typiskt tvärgående ränder på segmenten medan den andra, *Eisenia foetida andrei,* saknar dessa, och har en rödbrokig färg. Så långt det går bör *Eisenia foetida andrei* användas. Andra arter kan användas om den nödvändiga metodiken finns tillgänglig.

▼B

C.9 **BIOLOGISK NEDBRYTBARHET**

ZAHN-WELLENS TEST

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos vattenlösliga, icke flyktiga organiska föreningar när de utsätts relativt höga koncentrationer av mikroorganismer under ett statiskt test.

Fysikaliska-kemiska reaktioner kan förekomma på de uppslammade artiklarna vilket man måste ta hänsyn till vid tolkning av resultaten (se 3.2).

De ämnen som ska undersökas används i koncentrationer motsvarande DOC-värden av 50–400 mg/l (DOC = dissolved organic carbon, dvs. upplöst organiskt kol), eller COD-värden motsvarande 100–1 000 mg/l (COD = chemical oxygen demand, dvs. kemiskt syrebehov). Fördelen med dessa relativt höga koncentrationer är att de är pålitliga ur analyshänseende.

Vid denna metod mäts koncentrationer av upplöst organiskt kol eller det kemiska syrebehovet i syfte att bedöma testämnets fullständiga bionedbrytbarhet.

Samtidig användning av en specifik analysmetod kan möjliggöra värdering av ämnets primära bionedbrytbarhet (dvs. försvinnandet av den ursprungliga kemiska förbindelsen).

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den använda testkoncentrationen

— är vattenlösliga inom ramen för testbetingelserna,

— har försumbart ångtryck inom ramen för testbetingelserna,

— inte hämmar bakterier,

— endast absorberas i testsystemet i begränsad omfattning,

— inte försvinner från testlösningen till följd av skumning.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

▼B

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Nedbrytningen vid testets avslutning definieras som ”bionedbrytbarhet i Zahn-Wellens test”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

där:

D_T = Bionedbrytning i procent DOC som avgått vid tid T.

C_A = DOC (eller COD)-värdena i försöksblandningen, mätt tre timmar efter inledning av testet (mg/l) (DOC = dissolved organic carbon/upplöst organiskt kol, COD = chemical oxygen demand/kemiskt syrebehov).

C_T = DOC- eller COD-värdena i försöksblandningen vid tidpunkten för provtagningen (mg/l).

C_B = DOC- eller COD-värdena i blindprovet vid tidpunkten för provtagningen (mg/l).

C_{BA} = DOC- eller COD-värdena i blindprovet, mätt tre timmar efter inledning av testet (mg/l).

Nedbrytningsgraden avrundas till närmaste hela procenttal.

Den procentuella nedbrytningen anges som den procent DOC (eller COD) som försvunnit från testämnet.

Skillnaden mellan det värde som mätts efter tre timmmar och det beräknade, helst uppmätta, initiala värdet kan ge nyttiga information om ämnets eliminiering (se 3.2 ”Tolkning av resultat”).

1.3 REFERENSÄMNEN

När ett nytt ämne ska undersökas kan referensämnen i vissa fall vara användbara. Det går dock ännu inte att rekommendera bestämda referensämnen.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Aktiverat slam, oorganiska näringsämnen och testämnet, som är den enda kolämnekällan i vattenlösning, placeras i en glasbehållare med en volym av 1–4 liter, som är försedd med omrörning och luftning. Blandningen rörs och luftas vid 20–25 ºC i indirekt ljus eller i mörker i upp till 28 dagar. Nedbrytningen följs genom mätning av DOC-(eller COD-)värden i den filtrerade lösningen en gång om dagen eller regelbundet med en annan lämplig tidsintervall. Förhållandet mellan eliminerat DOC (eller COD) efter varje tidsintervall och värden tre timmar efter testets inledning uttrycks som procentuell bionedbrytning och är ett värde för nedbrytningsgraden vid denna tidpunkt.

Om en specifik analysmetod används kan ändringar av det ursprungliga ämnets koncentration till följd av bionedbrytning mätas (primär bionedbrytning).

▼B

1.5 KVALITETSKRITERIER

Metodens reproducerbarhet har fastställts genom ett ringtest.

Metodens känslighet beror till största delen på variationer i blindprovet och till mindre del på noggrannheten vid bestämning av upplöst organiskt kol och testämnekoncentration i vätskan.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 *Förberedelser*

1.6.1.1 Reagenser

Testvatten: Dricksvatten innehållande mindre än 5 mg organiskt kol per liter. Koncentrationen av kalcium- och magnesiumjoner får tillsammans inte överstiga 2,7 mmol per liter. I motsatt fall måste den förtunnas på passande sätt med avjoniserat eller destillerat vatten.

Svavelsyra, analytisk reagens (AR.):	50 g/l.
Natriumhydroxidlösning, AR.:	40 g/l.
Lösning av oorganiska näringsämnen: i 1 liter avjoniserat vatten löses	
ammoniumklorid, NH_4C1, AR:	38,5 g.
natriumdihydrogenfosfat, NaH_2PO_4. $2H_2O$, AR:	33,4 g.
kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4, AR:	8,5 g.
dikaliumhydrogenfosfat, K_2HPO_4, AR:	21,75 g.

1.6.1.2 Apparatur

Glasbehållare med en volym av 1–4 liter (t.ex. cylindrisk behållare).

Omrörare med rörhuvud av glas eller metall på en passande axel (omröraren bör rotera 5–10 cm över behållarens botten). Som ett alternativ kan en magnetomrörare med en 7–10 cm lång mangnetstav användas.

Glasrör med en invändig diameter av 2–4 mm för luftning. Rörets öppning bör ligga ca 1 cm ovanför behållarens botten.

Centrifug (ca 3 550 g).

pH-mätare.

Apparat för mätning av upplöst syre.

Pappersfilter.

▼B

Membranfiltreringsapparat.

Membranfilter med en porstorlek av 0,45 μm. Membranfilter är endast lämpligt om det har säkerställts att de varken avger kolämne eller absorberar ämnet under filtreringen.

Analysapparatur för bestämning av innehållet av organiskt kol och den kemiska syrebehovet.

1.6.1.3 Förberedelse a v inokulat

Aktiverat slam från ett biologiskt reningsverk tvättas (flera gånger) med testvatten (se ovan) genom centrifugering eller dekantering.

Det aktiverade slammet ska vara i ett lämpligt tillstånd. Sådant slam kan fås från ett väl fungerande reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten. För att få så många olika bakteriestammar som möjligt kan det vara bättre att blanda inokulat från olika källor (t.ex. från olika reningsverk, från jord, från flodvatten, etc.).

De aktiverade slammets livskraft kontrolleras, se. ”lämplighetskontroll”.

1.6.1.4 Framställning a v testlösningarna

1 testbehållarna placeras 500 ml vatten, 2,5 ml lösning av oorganiska näringsämnen per liter samt en mängd aktiverat slam som motsvarar 0,2–1,0 g torrämne per liter färdig blandning. Tillsätt tillräckligt med stamlösning av testämnet så att den färdiga blandningen får en DOC-koncentration av 50–400 mg/l. Motsvarande COD-intervall är 100–1 000 mg/l. Fyll upp med testvatten till en total volym av 1–4 liter. Den totala volym som väljs beror på det antal prover som ska tas för DOC-eller COD-bestämning, och den nödvändiga analysvolymen.

Normalt kan en volym av 2 l anses tillräcklig. Minst en kontrollbehållare (blindprov) ska göras i ordning samtidigt med varje testsene. Den innehåller endast aktiverat slam och lösning av oorganiska näringsämnen utspätt med vatten till samma totalvolym som i testbehållarna.

1.6.2 *Testförfarande*

Testbehållarna omrörs med magnetomrörare eller propelleromrörare i indirekt belysning eller i mörker vid 20–25 °C. Luftning sker med komprimerad luft som om nödvändigt rensas med ett vadd-filter och en tvättflaska. Man måste se till att slammet inte sätter sig och att syrekoncentrationen inte sjunker under 2 mg/l.

pH-värdet måste kontrolleras regelbundet (t.ex. dagligen) och vid behov justeras till pH 7–8.

▼B

Strax före provtagning kompenseras vattenförlust på grund av förångning genom tillsättning av avjoniserat eller destillerat vatten. Man kan t.ex. märka vätskehöjden i behållaren innan testet inleds. Nya markeringar ritas dit efter varje provtagning (utan luftning och omrörning). De första proverna tas alltid tre timmar efter testets inledning så att man kan konstatera om testmaterialet absorberas på det aktiverade slammet.

Elimineringen av testämnet följs genom DOC- eller COD-bestämningar antingen dagligen eller regelbundet med andra intervaller. Proverna från testbehållaren och blindprovet filtreras genom ett noggrant tvättat pappersfilter. De första 5 ml av filtratet kasseras. Slam som är svårt att filtrera kan avlägsnas först genom centrifugering i tio minuter. Minst dubbla bestämningar av DOC och COD ska göras. Testet varar i upp till 28 dagar.

Obs! Prover som stadigt är grumliga filtreras genom ett membranfilter. Membranfiltren får varken frigöra eller absorbera organiska material.

Funktionskontroll a v aktiverat slam

I varje testserie bör det ingå en behållare som innehåller ett känt ämne så att man kan kontrollera funktionen av det aktiverade slammet. 1 detta syfte är dietynglykol lämpligt.

Adaption

Om analyser utförs med relativt korta mellanrum (t.ex. dagligen) kommer adaption att framgå tydligt av nedbrytningskurvan (se figur 2). Testet bör därför inte inledas omedelbart före helgen.

Om adaption förekommer i slutet av testet kan testet förlängas tills nedbrytningen är avslutad.

Obs! Om det finns behov av att veta mer om det adapterade slammets beteende utsätts samma aktiverade slam ytterligare en gång för samma testmaterial enligt följande förfarande:

Stäng av omröraren och luftaren och låt det aktiverade slammet sätta sig. Avlägsna överstående vätska, fyll på upp till 2 liter med testvatten och rör om i 15 minuter och låt sedan blandningen sätta sig igen. Sedan överstående vätska avlägsnats används det överblivande slammet för att upprepa testet i enlighet med 1.6.1.4 och 1.6.2 ovan. Det aktiverade slammet kan även isoleras genom centrifugering istället för utfällning.

Det adapterade slammet kan blandas med färskt slam till en koncentration av 0,2–1,0 g torrvikt/l.

▼B

Analys

Normalt filtreras prover genom ett noggrant tvättat pappersfilter (för tvättning används avjoniserat vatten).

Prover som stadigt är oklara filtreras genom ett membranfilter (0,45 μm).

En dubbelbestämning av DOC-koncentrationen i provfiltraten görs (de första 5 ml kasseras) med TOC-instrument. Om filtratet inte kan analyseras samma dag ska det förvaras i kylskåp till nästa dag. Längre tids förvaring rekommenderas inte.

COD-koncentrationen bestäms i provfiltraten med COD-koncentrationsutrustning i enlighet med det förfarande som beskrivs i hänvisning 2 nedan.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Minst dubbelbestämning av DOC- och COD-koncentrationerna i proverna görs i enlighet med 1.6.2. Nedbrytbarheten vid tidpunkten T beräknas med hjälp av den formel (med definitioner) som anges i 1.2.

Nedbrytningsgraden beräknas till närmaste hela procenttal. De nedbrytning som erhålls vid slutet av testet anges som ”bionedbrytbarheten vid Zahn-Wellens test”.

Obs! Om fullständig nedbrytning inte uppnås innan testperioden är slut och detta resultat bekräftas genom en ytterligare analys följande dag kan testet avslutas.

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande:

— Testämnets initiala koncentration.

— Alla andra upplysningar och försöksresultat i fråga om testämnet, en eventuell referensämne och blindförsöket.

— Koncentrationen efter tre timmar.

— Kurva över bionedbrytningen med förklaring.

— När och var provorganismerna är tagna, adaptionsgrad, använd koncentration, etc.

— Vetenskapliga motiveringar för eventuella ändringar av testförfarandet.

3.2 TOLKNING AV RESULTAT

Den förlust av DOC (COD) som sker gradvis över dagar eller veckor är ett tecken på bionedbrytbarhet hos testämnet.

▼B

Fysikalisk-kemisk absorption kan dock i vissa fall spela en viss roll och ett tecken på detta är att före de första tre timmarna sker fullständig eller delvis förlust och att skillnaden mellan överstående vätska från kontroll- och testproverna förblir på en oväntat läg nivå.

Det är nödvändigt att göra ytterligare tester om man ska kunna skilja på bionedbrytning (eller delvis bionedbrytning) och absorption.

Detta kan göras på flera olika sätt, men det mest övertygande är att använda överstående vätska som inokulum i en bassettest (helst ett respirometriskt test).

Testämnen som visar en hög förlust av DOC (COD), som inte beror på absorption, vid denna test bör betraktas som potentiellt bionedbrytbara. Delvis förlust som inte beror på absorption, betyder att kemikalien i varje fall i en viss omfattning bryts ned biologiskt.

Låg eller ingen förlust av DOC (COD) kan bero på att testämnet hämmar mikroorganismerna. Detta kan med tiden också visa sig genom att slammet upplöses och försvinner, varvid överstående vätska blir grumlig. Testet bör upprepas med en lägre koncentration testämne. Användning av ett ämnesspecifik analysmetod eller ^{14}C-markerat testämne kan ge större känslighet. Om ^{14}C-markerat testämne används kommer återhämtning av $^{14}CO_2$ bekräfta att det ror sig om bionedbrytbarhet.

Om resultaten anges som primär bionedbrytbarhet bör det om möjligt anges en förklaring på den kemiska strukturförändringen som leder till avsaknaden av analysresultat för det ursprungliga testämnet.

Valet av analysmetoder ska motiveras och analysresultaten för blindproven ska anges.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD, Paris (1981), *Test Guideline* 302 B, rådets beslut K(81) 30 slutlig.

2. Bilaga V C.9 Nedbrytning – kemiskt syrebehov, kommissionens direktiv 84/449/EEG, *Europeiska gemenskapernas officiella tidning* L 251, 19.9.1984.

▼B

Tillägg

EXEMPEL PÅ UTVÄRDERING

Organisk förbindelse:	4-etoxybenzoesyra
Teoretis testkoncentration:	600 mg/l
Teoretisk DOC:	390 mg/l
Inoculat:	Reningsverk
Koncentration:	1 g torrämne per liter
Enventuell adaption:	inte adapterat
Analys:	DOC-bestämning
Testmängd:	3 ml
Kontrollämne:	Dietylenglykol
Ämnets toxicitet:	Ingen toxicitet under 1 000 Använt test: fermenteringsglastestmg/l

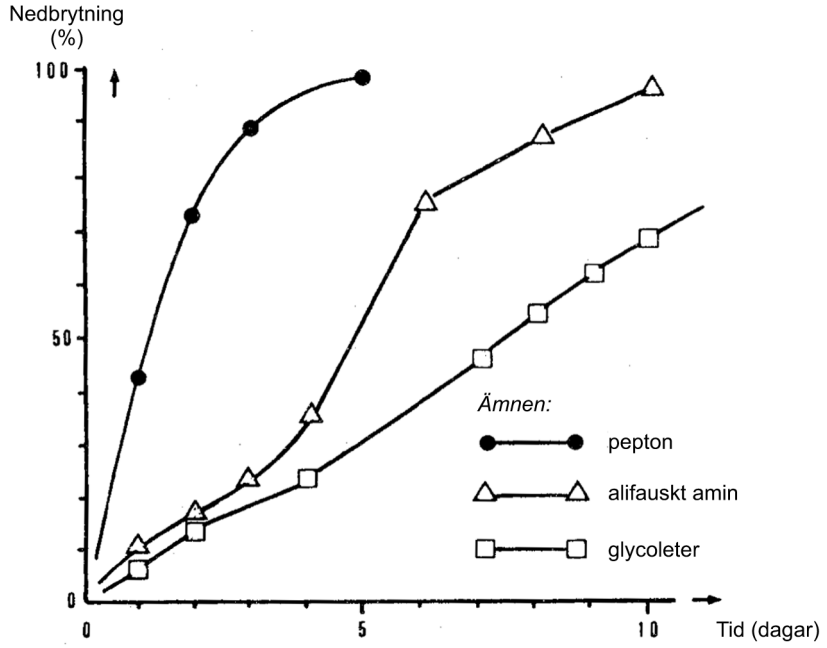
Tidpunkt	Kontrollämne				Testämne		
	Blindprov DOC (1) (mg/l)	DOC (1) (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Nedbrytning (%)	DOC (1) (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Nedbrytning (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 timmar	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dagar	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dagar	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dagar	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dagar	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dagar	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dagar	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dagar	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Medelvärde av tre bestämningar.

▼B

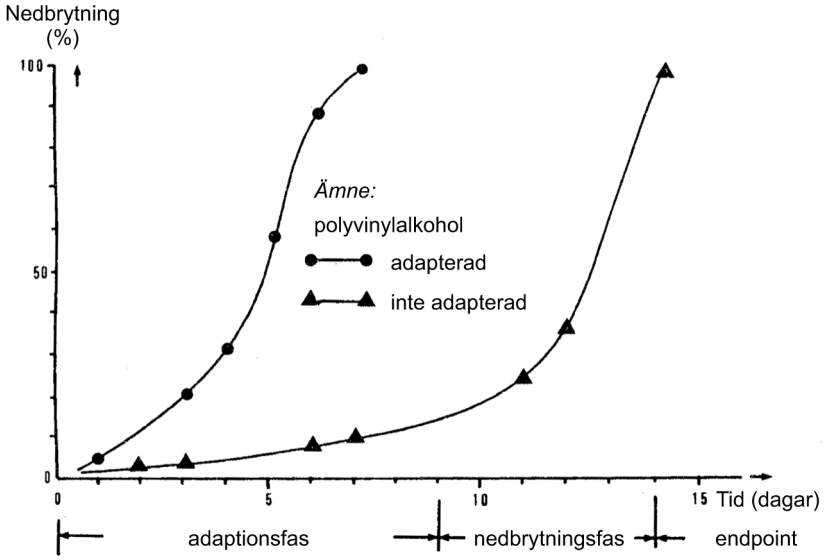
Figur 1

Exempel på kurvor över bionedbrytning



Figur 2

Exempel på slamadaption



▼M4

C.10 **SIMULATIONSTEST AEROB AVLOPPSVATTENBEHANDLING C.10-A: ENHETERNA FÖR AKTIVERAT SLAM – C.10-B BIOFILMER**

C.10-A: **Enheterna för aktiverat slam**

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 303 (2001). På 1950-talet insåg man att de ytaktiva ämnen som nyligen tagits i bruk orsakade kraftig skumbildning i avloppsreningsverk och i vattendrag. De avlägsnades inte helt under den aeroba behandlingen och i vissa fall kunde annat organiskt material inte avlägsnas. Detta föranledde många undersökningar om hur ytaktiva ämnen kunde avlägsnas från avloppsvatten och huruvida nya kemikalier producerade av industrin svarade på avloppsvattenrening. För detta användes modeller som representerar de två huvudtyperna av aerob biologisk avloppsvattenrening (aktiverat slam och perkolations- eller bakteriefilter). Det hade varit mycket opraktiskt och dyrt att distribuera varje ny kemikalie och övervaka storskaliga reningsverk, även på lokal basis.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Enheterna för aktiverat slam

2. I beskrivningarna har modellerna för enheterna för aktiverat slam varierat i storlek mellan 300 ml och cirka 2 000 ml. Vissa av modellerna hade stora likheter med storskaliga anläggningar, med slamsedimenteringstankar där det sedimenterade slammet pumpas tillbaka till luftningstanken, medan andra inte hade sedimenteringsutrustning, t.ex. Swisher (1). Apparaturens storlek är en kompromiss – å ena sidan måste den vara tillräckligt stor för att de mekaniska operationerna ska fungera väl och för att tillåta tillräcklig provtagningsvolym utan att påverka själva operationen och å andra sidan får den inte vara så stor att utrymmes- och materialbehoven blir för stora.

3. Två typer av utrustning som har använts i omfattande utsträckning och med tillfredsställande resultat är Husmann-enheter (2) och Porous Pot-enheter (3) (4), som först användes för studier av ytaktiva ämnen; dessa beskrivs i denna testmetod. Även andra enheter har använts med framgång, t.ex. Eckenfelder (5). Detta simuleringstest är relativt dyrt och resurskrävande, och därför gjordes en parallell undersökning av enklare och förmånligare screeningtest (se kapitel C.4 A–F i denna bilaga) (6). Erfarenheterna med olika ytaktiva ämnen och andra kemikalier har visat att de som klarade screeningtest (lätt nedbrytbara) också bröts ned vid simuleringstestningen. Vissa av dem som inte klarade screeningtest klarade test för lättnedbrytbarhet (kapitlen C.12.7 och C.19.8 i denna bilaga), men endast en del i denna senare grupp bröts ned vid simuleringstest, medan de kemikalier som inte klarade test för lättnedbrytbarhet inte bröts ned i simuleringstest (9) (10) 11).

4. För vissa ändamål kan simuleringstest som gjorts vid en enda uppsättning betingelser vara tillräckliga, och då uttrycks resultaten som en procentandel avlägsnad kemikalie eller upplöst organiskt kol (DOC). En beskrivning av ett sådant test ges i denna testmetod. Till skillnad från den tidigare versionen av detta kapitel, där endast en enda typ av apparatur för behandling av

▼M4

syntetiskt avloppsvatten i kopplad utformning med användning av en relativt primitiv metod för kassering av slam beskrevs, erbjuder denna beskrivning ett antal variationer. Den innehåller beskrivningar av alternativa typer av apparatur, arbetssätt, avloppsvatten och avlägsnande av kasserat slam. Denna text följer nära texten till ISO 11733 (12), som granskades i detalj vid utarbetningen, även om metoden inte har varit föremål för ringtest.

5. För andra ändamål krävs en mer exakt kännedom om testkemikaliens koncentration i utflödet, vilket i sin tur kräver en mer omfattande metod. Som exempel kan nämnas att kasseringen av slam måste kontrolleras exaktare under varje dag och under hela testperioden, och enheterna måste köras med ett antal olika andelar kasserat slam. För en heltäckande metod bör tester även köras vid två eller tre olika temperaturer; en sådan metod beskrivs av Birch (13) (14) och sammanfattas i tillägg 6. De nuvarande kunskaperna är dock inte tillräckliga för att slå fast vilken av de kinetiska modellerna som kan tillämpas på biologisk nedbrytbarhet för kemikalier vid avloppsrening och allmänt taget i vattenmiljö. Tillämpningen av Monod-kinetik (exempel ges i tillägg 6) begränsas till kemikaliehalter på minst 1 mg/l, men det finns de som anser att även detta återstår att bevisa. I tillägg 7 anges tester vid koncentrationer som mer sanningsenligt återspeglar koncentrationerna i avloppsvatten, men sådana tester och tester enligt tillägg 6 finns angivna i tilläggen, och inte som separata testmetoder.

Filter

6. Modelleringen av perkolationsfilter har ägnats mycket mindre uppmärksamhet, kanske för att de är besvärliga och mindre kompakta än modellerna för aktivslamanläggningar. Gerike m.fl. utvecklade enheter med bakteriefilter (trickling filter) och använde enheterna i kopplat utförande (15). Dessa filter var relativt stora (höjd 2 m, volym 60 l) och varje filter krävde så mycket som 2 liter avloppsvatten i timmen. Baumann m.fl. (16) simulerade bakteriefilter genom att fylla 1 m långa rör (14 mm innerdiameter) med remsor av polyesterfleece som först hade hållits i koncentrerat aktiverat slam i 30 minuter. Testkemikalien i form av ensam kolkälla i en mineralsaltlösning matades ned i det vertikala röret och den biologiska nedbrytbarheten bedömdes enligt mätningar av DOC i utflödet och CO_2 i utkommande gas.

7. Biofilter har även simulerats på annat sätt (15) – innerytorna i roterande rör som har en lätt horisontell lutning matas med avloppsvatten (cirka 250 ml/timme) med och utan testkemikalie, och de uppsamlade utflödena analyseras för DOC och/eller den berörda testkemikalien.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

8. Denna metod är avsedd för att bestämma eliminering samt primär och/eller slutlig biologisk nedbrytning av vattenlösliga organiska kemikalier som görs av aeroba mikroorganismer i ett kontinuerligt fungerande testsystem som simulerar aktivslamprocessen. Ett lättnedbrytbart organiskt medium och den organiska testkemikalien fungerar som kolkälla och energikälla för mikroorganismerna.

9. Två kontinuerligt arbetande testenheter (aktivslamanläggningar eller Porous Pot-enheter körs parallellt under identiska betingelser som väljs enligt teständamålet. Normalt är den hydrauliska medelretentionstiden 6 timmar och slammets medelålder (slamretentionstid) 6–10 dagar. Slam kasseras genom en av två metoder, testkemikalien tillsätts i regel i en koncentration mellan 10 mg/l upplöst organiskt kol (DOC) och 20 mg/l DOC till inflödet (organiskt medium) endast till en av enheterna. Den andra enheten används som kontrollenhet för att bestämma den biologiska nedbrytbarheten för det organiska mediet.

▼M4

10. Frekvent tagna prover av utflödet analyseras för DOC (helst) eller kemisk syreförbrukning (COD), samt koncentrationen av testkemikalie (om så krävs genom specifik analys) i utflödet från enheten som matas med testkemikalie. Skillnaden mellan utflödeskoncentrationerna DOC eller COD i test- och kontrollenheterna antas bero på testkemikalien eller dess organiska metaboliter. Denna skillnad jämförs med inflödets koncentration DOC eller COD på grund av testkemikalien, för att bestämma elimineringen av testkemikalien.

11. Den biologiska nedbrytbarheten kan i regel särskiljas från biologisk adsorption genom detaljerad analys av eliminering/tid-kurvan och kan ofta bekräftas genom test för biologisk lättnedbrytbarhet med användning av acklimatiserat inokulat från enheten som matas med testkemikalie.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

12. Testkemikaliens renhet, vattenlöslighet, flyktighet och adsorptionsegenskaper bör vara kända, för att resultaten ska kunna tolkas korrekt. I regel kan flyktiga och olösliga kemikalier inte testas, om inte särskilda åtgärder vidtas (se tillägg 5). Likaså bör den kemiska strukturen eller minst den empiriska formeln vara känd, med tanke på kalkylering av teoretiska värden och/eller kontroll av uppmätta parametervärden, t.ex. teoretisk syreförbrukning (ThOD), upplöst organiskt kol (DOC) och kemisk syreförbrukning (COD).

13. Information om testkemikaliens toxicitet för mikroorganismer (se tillägg 4) kan vara till nytta vid val av lämpliga testkoncentrationer och kan vara väsentlig för en korrekt tolkning av låga värden för biologisk nedbrytbarhet.

GODKÄNNANDENIVÅER

14. Enligt den ursprungliga tillämpningen av detta simuleringstest (bekräftande test) på primär biologisk nedbrytning av ytaktiva ämnen krävs mer än 80 % eliminering av den berörda kemikalien för att det ytaktiva ämnet ska få släppas ut på marknaden. Om 80 % eliminering inte uppnås, kan detta simuleringstest (bekräftande test) tillämpas, och det ytaktiva ämnet får endast släppas ut på marknaden förutsatt att mer än 90 % av kemikalien elimineras. Generellt gäller för kemikalier inte frågan om godkänt/ej godkänt, och värdet på den procentuella eliminering som erhållits kan användas i uppskattningsberäkningar av den sannolika miljökoncentration som kan användas vid farobedömning för kemikalier. Resultaten tenderar att följa ett ”allt eller inget”-mönster. I ett antal studier av rena kemikalier konstaterades att elimineringsprocenten för DOC var > 90 % i mer än tre fjärdedelar av fallen och > 80 % i över 90 % av fallen för kemikalier som över huvud taget visade betydande grad av biologisk nedbrytbarhet.

15. Relativt få kemikalier (t.ex. ytaktiva ämnen) förekommer i avloppsvatten i de koncentrationer (cirka 10 mg C/l) som används i detta test. Vissa kemikalier kan vara hämmande vid dessa koncentrationer, medan elimineringskinetiken för andra kemikalier kan vara annorlunda vid låga koncentrationer. En exaktare bedömning av nedbrytningen kan göras med användning av modifierade metoder med realistiskt låga koncentrationer av testkemikalien, och erhållna data kan användas för att beräkna kinetiska konstanter. De nödvändiga försöksteknikerna har dock ännu inte utvärderats till fullo och de kinetiska modeller som beskriver reaktionerna vid biologisk nedbrytning har inte heller fastställts (se tillägg 7).

▼M4

REFERENSKEMIKALIER

16. För att säkerställa att försöksförfarandet genomförs korrekt är det lämpligt att med vissa mellanrum testa kemikalier med känt beteende samtidigt som testkemikalier undersöks. Sådana kemikalier är adipinsyra, 2-fenylfenol, 1-naftol, 2,2'-bifenyldikarboxylsyra, 1-naftoesyra osv. (9) (10) (11).

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

17. Det finns betydligt färre rapporter från studier rörande simuleringstest än från test rörande lätt bionedbrytbarhet. Reproducerbarheten mellan (simultana) replikat är god (inom 10–15 %) för testkemikalier som bryts ner till minst 80 %, men för kemikalier som är mindre nedbrytbara är variationen större. Mycket varierande resultat (t.ex. 10 %, 90 %) har även noterats för vissa gränskemikalier vid olika tillfällen inom de nio veckor som gäller för testningen.

18. Endast små skillnader har konstaterats i resultat som erhållits med de två typerna av apparatur, men vissa kemikalier har brutits ned i större omfattning och mer genomgående vid användning av avloppsvatten från hushåll än vid användning av syntetiskt avloppsvatten enligt OECD.

METODBESKRIVNING

Apparatur

Testsystem

19. Testsystemet för en testkemikalie består av en testenhet och en kontrollenhet, men när endast specifika analyser görs (primär biologisk nedbrytbarhet) behövs endast en testenhet. En och samma kontrollenhet kan användas för flera testenheter som matas med samma eller olika testkemikalier. Om koppling används (tillägg 3) måste varje testenhet ha en separat kontrollenhet. Testsystemet kan vara en modell av aktivslamanläggning, Husmann-enhet (tillägg 1, figur 1) eller Porous Pot (tillägg 1, figur 2). I båda fallen behövs tillräckligt stora förvaringskärl för inflöde och utflöde, såväl som pumpar för att dosera inflödet, antingen blandat med testkemikalie eller separat.

20. Varje aktivslamanläggning består av ett luftningskärl med en känd kapacitet på cirka 3 liter aktiverat slam och en separator (sekundärsedimentering) som rymmer cirka 1,5 liter. Volymerna kan i viss utsträckning få variera om separatorns höjd justeras. Kärl av olika storlek tillåts om de används med jämförbara hydrauliska belastningar. Om det inte är möjligt att hålla temperaturen i testningsrummet inom rätt intervall rekommenderas användning av mantlade kärl med temperaturkontrollerat vatten. En mammutpump (airlift pump) eller doseringspump används för att återföra aktivslammet från separatorn till luftningskärlet, antingen kontinuerligt eller intermittent.

21. Porous Pot-systemet består av en inre porös cylinder med konisk botten innanför ett lite större kärl med samma form men gjort av ett ogenomträngligt plastmaterial. Lämpligt material för innerkärlet är poröst polyetylen med maximal porstorlek på 90 μm och 2 mm tjocklek. Slammet separeras från det behandlade organiska mediet genom differentierad passage genom den porösa väggen. Utflödet går till det omgivande utrymmet från vilket det flödar över till uppsamlingskärlet. Ingen sedimentering sker och därför ingen

▼M4

återföring av slam. Hela systemet kan monteras in i ett termostatkontrollerat vattenbad. Porous Pots kan till en början blockeras och flöda över. Ersätt då den porösa fodringen med en ren fodring genom att först sifonera slammet från innerkärlet till ett rent kärl och ta ut den blockerade fodringen. När den ogenomträngliga yttre cylindern har rengjorts kan ett rent innerkärl sättas in och slammet tillsättas på nytt. Det slam som finns längs den blockerade fodringens väggar ska också skrapas loss omsorgsfullt och överföras. Rengör blockerade innerkärl genom att först avlägsna slamrester med en fin vattenstråle och därefter blötlägga i utspädd lösning av natriumhypoklorit, sedan i vatten, och därefter omsorgsfullt skölja med vatten.

22. För luftning av slammet i luftningskärlen i båda systemen krävs lämpliga system, t.ex. sintrade kuber (diffusorstenar) och tryckluft. Vid behov ska luften rengöras genom passage genom lämpligt filter och tvätt. Systemet måste ha genomflöde av tillräckligt med luft för att aeroba betingelser ska bibehållas och slamflockarna hållas suspenderade under hela testningen.

Filtreringsapparatur eller centrifug

23. Utrustning för filtrering av prover med membranfilter av lämplig porstorlek (nominell öppningsdiameter 0,45 μm) som adsorberar lösliga organiska kemikalier och har minimalt utsläpp av organiskt kol. Om de filter som används avger organiskt kol ska de tvättas försiktigt med hett vatten för att avlägsna detta kol. Alternativt kan man använda en centrifug som når upp till 40 000 m/s^2.

Analysutrustning

24. Apparatur som krävs för att bestämma

— DOC (upplöst organiskt kol) eller COD (kemisk syreförbrukning),

— specifik kemikalie, om så krävs,

— suspenderade fasta ämnen, pH, syrehalten i vatten,

— temperatur, surhet och alkalinitet,

— ammonium, nitrit och nitrat, om testet genomförs under nitrifikationsförhållanden.

Vatten

25. Kranvatten med mindre än 3 mg/l DOC. Bestäm alkaliniteten, om den inte redan är känd.

26. Avjoniserat vatten med mindre än 2 mg/l DOC.

Organiskt medium

27. Syntetiskt avloppsvatten, avloppsvatten från hushåll eller en blandning av båda kan användas som organiskt medium. Det har visat sig (11) (14) att användning av enbart avloppsvatten från hushåll ofta ger ökad procentandel DOC-eliminering och t.o.m. möjliggör eliminering och biologisk nedbrytning av vissa kemikalier som inte bryts ned när syntetiskt avloppsvatten enligt OECD används. Det betyder att kontinuerlig eller intermittent tillsättning av avloppsvatten från hushåll ofta stabiliserar det aktiva slammet och även förbättrar sedimenteringsegenskaperna, som är en central faktor. Därför rekommenderas användning av avloppsvatten från hushåll. Mät DOC- eller COD-koncentrationen i varje ny sats av organiskt medium. Det organiska mediets surhet eller alkalinitet ska vara känd. Om det organiska mediet har låg surhet eller alkalinitet kan det krävas tillsats av lämplig buffert (natriumvätekarbonat eller kaliumdivätefosfat) för att pH i luftningskärlet ska hållas kring 7,5 ± 0,5 under testet. Mängden buffert och tillsättningstidpunkten måste fastställas separat i varje enskilt fall. Om blandningar används antingen kontinuerligt eller intermittent, måste blandningens DOC (eller COD) hållas på ungefär konstant nivå t.ex. genom utspädning med vatten.

▼M4

Syntetiskt slam

28. Per liter kranvatten upplöses följande: 160 mg pepton, 110 mg köttextrakt, 30 mg urea, 28 mg vattenfritt dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4), 7 mg natriumklorid (NaCl), 4 mg kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) och 2 mg magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). Detta syntetiska avloppsvatten enligt OECD är ett exempel, och ger en medelkoncentration på cirka 100 mg/l DOC i inflödet. Alternativt kan man använda andra sammansättningar med ungefär samma DOC-koncentration, som ligger närmare verkligt avloppsvatten. Om ett mindre koncentrerat inflöde krävs kan det syntetiska avloppsvattnet spädas ut med kranvatten (t.ex. 1:1) för att få en koncentration på cirka 50 mg/l. En sådan lägre koncentration i inflödet ger bättre tillväxt av nitrifierande organismer, och denna modifiering bör användas om undersökningen gäller simulering av nitrifierande reningsverk. Detta syntetiska avloppsvatten kan göras i destillerat vatten i en koncentrerad form och förvaras i 1 °C upp till en vecka. Späd vid behov ut med kranvatten. (Detta medium är dock inte tillfredsställande, kvävekoncentrationen är t.ex. mycket hög och kolhalten relativt låg, men det finns inga bättre förslag utom tillsättning av mera fosfat som buffert samt extra pepton).

Avloppsvatten från hushåll

29. Använd färsk bottensats av avloppsvatten som samlas upp dagligen från reningsanläggningar som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Avloppsvattnet ska samlas upp före primär sedimentering, från primärsedimenteringstankens överflödeskanal eller från matningen till aktivslamanläggningen, och det ska till övervägande del vara fritt från grova partiklar. Avloppsvattnet kan lagras några dagar före användningen (i regel dock inte längre än sju dagar) vid cirka 4 °C, om det går att påvisa att DOC (eller COD) inte har sjunkit betydligt (mindre än 20 %) under lagringen. För att undvika systemstörningar ska DOC (eller COD) i varje ny sats justeras före användningen till ett lämpligt konstant värde, t.ex. genom utspädning med kranvatten.

Aktiverat slam

30. Samla in aktiverat slam för inokulering från luftningstanken vid ett välskött reningsverk eller från en aktivslamenhet i laboratorieskala som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll.

Stamlösningar av testkemikalien

31. För kemikalier med rimlig löslighet bereds stamlösningar vid lämpliga koncentrationer (t.ex. 1–5 g/l) i avjoniserat vatten eller i mineraldelen av syntetiskt avloppsvatten (för olösliga och flyktiga kemikalier, se tillägg 5). Bestäm DOC och totalt organiskt kol (TOC) för stamlösningen och upprepa mätningarna för varje ny sats. Om skillnaden mellan DOC och TOC är större än 20 % bör testkemikaliens vattenlöslighet kontrolleras. Jämför testkemikaliens DOC eller koncentration uppmätt genom specifik analys av stamlösningen med det nominella värdet, för att kunna bedöma om utbytet är tillräckligt bra (i regel kan > 90 % förväntas). Särskilt för dispersioner bör man försäkra sig om att DOC kan användas som analytisk parameter; annars måste en analysteknik som är specifik för testkemikalien användas. För dispersioner krävs centrifugering av proverna. För varje ny sats bör mätning göras av DOC, COD eller testkemikalien med specifik analys.

▼M4

32. Bestäm stamlösningens pH. Extremvärden tyder på att tillsats av kemikalien kan påverka pH-värdet för det aktiverade slammet i testsystemet. I så fall bör stamlösningen neutraliseras till pH 7 ± 0,5 med små mängder oorganisk syra eller bas, men utfällning av testkemikalien bör undvikas.

FÖRFARANDE

33. Beskrivningen av förfarandet gäller för aktivslamenheter, och förfarandet måste i viss mån anpassas för Porous Pot-system.

Förberedning av inokulat

34. Inokulera testsystemet i början av testet med aktiverat slam eller ett inokulat med låg koncentration av mikroorganismer. Håll inokulatet luftat vid rumstemperatur fram tills det används (inom 24 timmar). Ta i det första fallet ett prov av aktiverat slam från luftningstanken vid ett välskött biologiskt reningsverk eller en laboratorieanläggning som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Om nitrifikationsförhållanden ska simuleras, ta slam från ett reningsverk med nitrifikation. Bestäm halten suspenderade fasta ämnen och koncentrera vid behov slammet genom sedimentering så att den volym som tillsätts testsystemet är minimal. Se till att startkoncentrationen torrsubstans är kring 2,5 g/l.

35. Ta i det andra fallet 2–10 ml/l av utflödet från ett biologiskt reningsverk för avloppsvatten från hushåll som inokulat. För att få så många olika slags bakterier som möjligt kan inokulat tillsättas från flera olika källor, t.ex. ytvatten. I detta fall utvecklas och växer det aktiverade slammet i testsystemet.

Dosering av organiskt medium

36. Se till att inflödes- och utflödesbehållarna och rören från inflödeskärl och till utflödeskärl rengörs omsorgsfullt för att eliminera mikrobtillväxt initialt och under hela testet. Montera testsystemet i ett temperaturkontrollerat rum (i regel 20–25 °C) eller använd testenheter med mantel. Förbered en tillräcklig volym av det organiska medium som ska användas (punkterna 27–29). Fyll först luftningskärlet och separatorn med det organiska mediet och tillsätt sedan inokulat (punkterna 34, 35). Starta luftningen för att hålla slammet suspenderat och i aerob status och börja dosera inflöde och återföra sedimenterat slam. Dosera organiskt medium ur lagringskärlen till test- och kontrollenheternas luftningskärl (punkterna 20, 21) och samla in utflödena i liknande lagringskärl. För att få den normala hydrauliska retentionstiden på 6 timmar ska det organiska mediet pumpas med 0,5 l/tim. För att kontrollera detta mäts den dagliga mängden organiskt medium som doseras, genom att notera minskningen av volymen medium i lagringskärlen. För att bestämma effekterna av intermittent utsläpp och chockbelastning av kemikalier behövs andra doseringssätt.

37. Om det organiska mediet förbereds för användning för en period längre än 1 dag behövs kylning vid cirka 4 °C eller andra lämpliga konserveringsmetoder för att förebygga mikrobtillväxt och biologisk nedbrytning utanför testenheterna (punkt 29). Om syntetiskt avloppsvatten används kan detta förberedas och förvaras vid cirka 4 °C som koncentrerad stamlösning (t.ex. 10-faldig koncentration jämfört med den normala, se punkt 28). Denna stamlösning kan sedan blandas omsorgsfullt med lämplig volym kranvatten före användning eller alternativt pumpas direkt medan lämplig mängd kranvatten pumpas separat.

▼M4

Dosering av testkemikalie

38. Tillsätt en lämplig volym stamlösning av testkemikalien (punkt 31) till lagringskärlet för inflöde eller dosera direkt med en separat pump till luftningskärlet. Den normala medelkoncentrationen av testkemikalie i inflödet ska vara mellan 10 och 20 mg/l DOC, och den högsta koncentrationen får inte överskrida 50 mg/l. Om testkemikalien har dålig vattenlöslighet eller om det sannolikt uppstår toxiska effekter, ska koncentrationen sänkas till 5 mg/l DOC eller lägre, men detta förutsätter att det finns en lämplig specifik analysmetod som kan användas (dispergerade testkemikalier som är dåligt vattenlösliga kan tillsättas med användning av speciella doseringstekniker, se tillägg 5).

39. Tillsättning av testkemikalie inleds efter en period under vilken systemet stabiliseras och det organiska mediets DOC avlägsnas effektivt (cirka 80 %). Det är viktigt att före tillsättningen av testkemikalie kontrollera att alla enheter arbetar lika effektivt, och om de inte gör det kan detta i regel avhjälpas genom att blanda de enskilda slammen och återfördela lika stora volymer till enheterna. När inokulat med cirka 2,5 g/l (torrvikt) aktiverat slam används, kan testkemikalien tillsättas från testets början, eftersom direkt tillsats av ökande mängder från början ger den fördelen att det aktiverade slammet bättre kan anpassa sig till testkemikalien. Oberoende av hur testkemikalien tillsätts, rekommenderas att relevant flödeshastighet och/eller volymerna i lagringskärl mäts regelbundet.

Hantering av aktiverat slam

40. Koncentrationen av fasta ämnen i aktiverat slam stabiliseras i regel under testets gång oberoende av vilket inokulat som används, inom gränserna 1–3 g/l (torrvikt), beroende på det organiska mediets kvalitet och koncentration, driftsbetingelserna, karaktären hos närvarande mikroorganismer och testkemikaliens påverkan.

41. Bestäm koncentrationen suspenderade fasta ämnen i luftningskärlen minst varje vecka och kassera överskottsslam för att bibehålla en koncentration på 1–3 g/l (torrvikt); alternativt se till att slammets medelålder hålls konstant, i regel 6–10 dagar. Om slamretentionstiden är t.ex. 8 dagar, bör varje dag 1/8 av volymen aktiverat slam i luftningskärlet avlägsnas och kasseras. Detta bör göras dagligen eller helst med användning av en automatisk intermittent arbetande pump. Att hålla koncentrationen suspenderade fasta ämnen konstant eller inom snäva gränser upprätthåller inte en konstant slamretentionstid, som är den variabel som avgör koncentrationen av testkemikalie i utflödet.

42. Avlägsna minst dagligen under testets gång allt slam som fastnat på luftningskärlets och separatorns väggar för att återföra slammet till suspensionen. Kontrollera och rengör regelbundet alla rör för att förebygga tillväxt av biofilm. Återför sedimenterat slam från separatorn till luftningskärlet, helst genom intermittent pumpning. I ett Porous Pot-system sker ingen återföring, men se till att rena innerkärl sätts in innan volymen i kärlen stiger betydligt (punkt 21).

43. I Husmann-enheter kan det förekomma dålig sedimentering och förlust av slam. Detta kan rättas till genom en eller flera av nedan förtecknade åtgärder, parallellt i test- och kontrollenheterna:

— Färskt slam eller flockningsmedel (t.ex. 2 ml/kärl med 50 g/l $FeCl_3$) kan tillsättas regelbundet, t.ex. varje vecka, men se till att $FeCl_3$ inte reagerar med eller leder till utfällning av testkemikalien.

▼M4

— Mammutpumpen kan ersättas med en peristaltisk pump som ger ett slamåterföringsflöde som ungefär motsvarar det inflöde som ska användas och ger utveckling av en anaerob zon i det sedimenterade slammet (mammutpumpens geometri begränsar minimiflödet återfört slam till cirka 12-faldigt jämfört med inflödet).

— Slammet kan pumpas intermittent från separatorn till luftningskärlet (t.ex. 5 minuter per 2,5 timmar för att återföra 1–1,5 l/tim.

— Ett giftfritt skumhämmande medel (t.ex. silikonolja) i minimikoncentration kan användas för att förhindra förlust genom skumbildning.

— Luft kan ledas genom slammet i separatorn i korta kraftiga strålar (t.ex. 10 sekunder per timme).

— Det organiska mediet kan doseras intermittent till luftningskärlet (t.ex. 3–10 minuter per timme).

Provtagning och analys

44. Mät regelbundet koncentrationen upplöst syre, temperatur och pH i det aktiverade slammet i luftningskärlen. Se till att det alltid finns tillräckligt med syre (> 2 mg/l) och att temperaturen hålls inom det rekommenderade intervallet (i regel 20–25 °C). Håll pH vid 7,5 ± 0,5 genom att dosera små mängder oorganisk bas eller syra till luftningskärlet eller till inflödet, eller genom att öka det organiska mediets buffertkapacitet (se punkt 27). Om nitrifikation inträffar produceras syra, och oxidationen av 1 mg N producerar cirka 7 mg CO_3^-. Mätningsfrekvensen beror på vilka parametrar som mäts och på systemets stabilitet, och kan variera mellan dagliga och veckovisa mätningar.

45. Mät DOC eller COD i inflödena till kontroll- och testkärlen. Mät testkemikaliens koncentration i testinflödet genom specifik analys eller uppskatta koncentrationen utifrån koncentrationen i stamlösningen (punkt 31), den använda volymen och mängden avloppsvatten som doseras in i testenheten. För att minska variationen hos koncentrationsdata rekommenderas att testkemikaliens koncentration beräknas.

46. Ta lämpliga prover från uppsamlat utflöde (t.ex. 24 timmars sammansatt prov) och filtrera genom ett membran med porstorlek 0,45 µm eller centrifugera vid cirka 40 000 m^2 i cirka 15 minuter. Centrifugering bör användas om filtreringen är svår att utföra. Bestäm DOC eller COD minst i duplikat för att mäta slutlig biologisk nedbrytning och vid behov primär biologisk nedbrytning genom en specifik analys av testkemikalien.

47. Bestämning av COD kan ge upphov till analysproblem vid låga koncentrationer och rekommenderas därför endast om den använda testkoncentrationen är tillräckligt hög (cirka 30 mg/l). För starkt adsorberande kemikalier rekommenderas också att mängden adsorberad kemikalie i slammet mäts med en analysteknik som är specifik för testkemikalien.

48. Provtagningsfrekvensen beror på testets förväntade tidslängd. Rekommenderad frekvens är tre gånger per vecka. När enheterna har börjat fungera effektivt, vänta minst 1 vecka och högst 6 veckor efter tillförsel av testkemikalien för att anpassningen ska nå stabila förhållanden (steady state). Försök få minst 15 giltiga värden från platåfasen (punkt 59), som normalt varar i 3 veckor, för utvärdering av testresultaten. Testet kan avslutas när tillräcklig elimineringsgrad nås (t.ex. > 90 %) och de 15 värden som representerar analyser som genomförts varje veckodag under 3 veckor finns att tillgå. Normalt ska testet inte pågå längre än 12 veckor från tillsättning av testkemikalien.

▼M4

49. Om slammet nitrifieras och testkemikaliens effekter på nitrifikationen ska undersökas, bör prover från utflödet från test- och kontrollenheterna analyseras minst en gång per vecka

50. Alla analyser bör utföras så snart som möjligt, särskilt kvävebestämningarna. Om analyser måste senareläggas bör proverna förvaras i mörker vid cirka 4 °C i helt fyllda och tätt förslutna flaskor. Om proverna måste förvaras längre än 48 timmar bör de konserveras genom djupfrysning, syrabehandling (t.ex. 10 ml/l av en 400 g/l-svavelsyralösning) eller genom tillsats av lämpligt gift (t.ex. 20 ml/l av en 10 g/l-lösning av kvicksilver(II) klorid). Se till att konserveringstekniken inte påverkar analysresultaten.

Koppling av testenheter

51. Om koppling används (tillägg 3) bör samma mängd aktiverat slam (150–1 500 ml för luftningstankar som innehåller 3 liter vätska) dagligen bytas mellan testenhetens luftningskärl och kontrollenheten. Om testkemikalien adsorberas starkt på slammet, bör endast separatorernas supernatant bytas. I båda fallen bör en korrektionsfaktor användas för beräkning av testresultaten (punkt 55).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

52. Beräkna procentandelen DOC- eller COD-eliminering av testkemikalien för varje tidpunktsrelaterad bedömning, genom följande ekvation:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

där

D_t = % eliminering av DOC eller COD vid tidpunkten t,

C_s = DOC eller COD på grund av testkemikalien, helst uppskattat utifrån stamlösningen (mg/l),

E = uppmätt DOC- eller COD-värde i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l),

E_o = uppmätt DOC- eller COD-värde i kontrollutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

53. Graden av DOC- eller COD-eliminering i det organiska mediet i kontrollenheten bidrar till bedömningen av den biologiska nedbrytningsaktiviteten i det aktiverade slammet under testet. Den procentuella elimineringen kan beräknas genom följande ekvation:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

där

D_B = % eliminering av DOC eller COD i det organiska mediet i kontrollenheten vid tidpunkten t,

C_M = DOC eller COD i det organiska mediet i kontrollenhetens inflöde (mg/l).

▼M4

Alternativt kan man beräkna procentuell eliminering av DOC eller COD som kan tillskrivas det organiska mediet plus testkemikalie i testenheten med följande ekvation:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

där

D_T = % eliminering av DOC eller COD i totalt testinflöde,

C_T = DOC eller COD i totalt testinflöde eller beräknat utifrån stamlösningar (mg/l).

54. Beräkna elimineringen av testkemikalie som uppmätts med en specifik analysmetod vid varje bedömningstidpunkt, genom följande ekvation:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

där

D_{ST} = % primär eliminering av testkemikalien vid tidpunkten t,

S_i = uppmätt eller uppskattad koncentration av testkemikalien i testinflödet (mg/l),

S_e = uppmätt koncentration av testkemikalien i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

55. Om kopplingsmodellen har använts, kompensera utspädningen av testkemikalien i luftningskärlet genom slamutbytet med användning av en korrigeringsfaktor (se tillägg 3). Om genomsnittlig retentionstid på 6 timmar och utbyte av halva volymen aktiverat slam i luftningskärlet har använts, måste de fastställda dagliga eliminationsvärdena (D_t, punkt 52) korrigeras för att få den faktiska elimineringsgraden D_{tc} för testkemikalien genom följande ekvation:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Presentation av testresultat

56. Plotta en kurva med procentuell eliminering D_t (eller D_{tc}) och D_{st} (om tillgänglig) mot tiden (se tillägg 2). Kurvan för eliminering av testkemikalien (i sig eller som DOC) kan ge underlag för vissa slutsatser om elimineringsprocessen.

Adsorption

57. Om kraftig DOC-eliminering observeras från början av testet, är det sannolikt att testkemikalien elimineras genom adsorption på det aktiva slammets fasta beståndsdelar. Detta kan påvisas genom att bestämma adsorberad testkemikalie genom specifik analys. Det är inte vanligt att elimineringen av DOC för adsorberbara kemikalier förblir kraftig genom hela testet; elimineringen är i regel kraftig i början för att sedan minska gradvis till ett jämviktsvärde. Om däremot den adsorberbara testkemikalien på ett eller annat sätt kan orsaka acklimatisering av den mikrobiella populationen, stiger testkemikaliens DOC-eliminering därefter och når ett högt platåvärde.

▼M4

Lagfas

58. På samma sätt som vid statiska screeningtest, kräver många testkemikalier en lagfas innan full biologisk nedbrytning inträffar. Under lagfasen sker acklimatisering eller anpassning av de nedbrytande bakterierna praktiskt taget utan eliminering av testkemikalien vid bakterietillväxtens inledande skede. Denna fas upphör och nedbrytningsfasen anses börja när cirka 10 % av den inledande mängden testkemikalie har eliminerats (efter att adsorption fått ske, i förekommande fall). Lagfasen är ofta mycket varierande och svår att reproducera.

Platåfas

59. Platåfasen i en elimineringskurva för ett kontinuerligt test definieras som den fas då maximal nedbrytning sker. Platåfasen bör pågå minst 3 veckor och ska ge cirka 15 uppmätta valida värden.

Genomsnittlig elimineringsgrad för testkemikalien

60. Beräkna medelvärdet utifrån testkemikaliens elimineringsvärden (D_t) under platåfasen. Avrundat till närmaste heltal (i %) är detta testkemikaliens elimineringsgrad. Likaså rekommenderas beräkning av medelvärdets 95 % konfidensintervall.

Eliminering av organiskt medium

61. Plotta det organiska mediets procentuella eliminering av DOC eller COD i kontrollenheten (D_B) mot tid. Ange genomsnittlig elimineringsgrad på samma sätt som för testkemikalien (punkt 60).

Indikation på biologisk nedbrytning

62. Om testkemikalien inte adsorberas i betydlig grad på det aktiverade slammet och elimineringskurvan har den typiska formen för en biologisk nedbrytningskurva med lagfas, kan nedbrytnings- och platåfaserna (punkterna 58, 59) med säkerhet tillskrivas biologisk nedbrytning. Om det har förekommit stark inledande eliminering kan simulationstestet inte användas för att skilja mellan biologiska och abiotiska elimineringsprocesser. I sådana fall, och i andra fall med tvivel rörande biologisk nedbrytning (t.ex. vid strippning), bör en analys göras rörande adsorberade testkemikalier eller ytterligare test med statisk biologisk nedbrytning genomföras baserade på parametrar som klart indikerar biologiska processer. Sådana test är syreupptagningsmetoder (kapitel C.4 D, E och F i denna bilaga (6)) eller test med mätning av koldioxidproduktion (kapitel C.4 C i denna bilaga (6)) eller ISO Headspace-metoden (18), med användning av förexponerat inokulat från simulationstestet. Om både DOC-eliminering och eliminering av specifik kemikalie har uppmätts och det finns betydande skillnader mellan elimineringsgraderna (DOC-elimineringen är lägre), tyder detta på att utflödena innehåller intermediära organiska produkter som kan vara svårare att bryta ned än den ursprungliga kemikalien.

Testresultatens giltighet

63. Information om inokulatets normala bionedbrytningsmönster fås genom en bestämning av det organiska mediets elimineringsgrad (punkt 53) i kontrollenheten. Testet kan anses vara giltigt om graden av DOC- eller COD-eliminering i kontrollenheten (-enheterna) är > 80 % efter två veckor och inget ovanligt har observerats.

▼M4

64. Om en lätt biologiskt nedbrytbar (referens)kemikalie har använts, bör graden av biologisk nedbrytning (D_t, punkt 52) vara > 90 %.

65. Om testet genomförs under nitrifierande förhållanden bör medelkoncentrationen i utflödena vara < 1 mg/l ammoniumkväve och < 2 mg/l nitritkväve.

66. Om dessa kriterier (punkterna 63–65) inte uppfylls, upprepa testet med inokulat från en annan källa, testa en referenskemikalie och se över alla försöksförfaranden.

Testrapport

67. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Identifieringsdata.

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalkemiska egenskaper.

Testbetingelser:

— Typ av testsystem och eventuella modifikationer för testning av olösliga och flyktiga kemikalier.

— Typ av organiskt medium.

— Andel av och egenskaper hos industriellt avloppsvatten som ingår, om kända.

— Inokulat, egenskaper och provtagningsplats(er), koncentration och eventuell förbehandling.

— Stamlösning av testkemikalien: DOC- och TOC-innehåll, i förekommande fall beredningssätt för suspension, använd testkoncentration, motivering om denna ligger utanför området 10–20 mg/l DOC, tillsättningsmetod, datum för första tillsättning, eventuella ändringar.

— Slammets medelålder och medelvärde för hydraulisk retentionstid, metod för kassering av slam, metoder för att undvika klumpbildning, förlust av slam osv.

— Analystekniker som använts.

— Testtemperatur.

— Slammets klumpbildningsegenskaper, slammets volymindex (SVI), suspenderad halt (MLSS).

— Avvikelser från standardförfaranden och alla omständigheter som kan ha påverkat resultaten.

Testresultat:

— Alla uppmätta data (DOC, COD), specifika analyser, pH, temperatur, syrehalt, suspenderade fasta ämnen, kvävekemikalier om relevant.

— Alla beräknade värden för D_t (eller D_{tc}), D_B och D_{St} i tabellform samt elimineringskurvor.

— Information om lag- och platåfaserna, testets tidslängd, elimineringsgrad för testkemikalien och för det organiska mediet i kontrollenheten, tillsammans med statistiska data och utlåtanden om biologisk nedbrytbarhet och testets giltighet.

— Diskussion om resultaten.

▼**M4**

LITTERATUR

(1) Swisher R. D. (1987), ”Surfactant Biodegradation”, andra utgåvan, Marcel Dekker Inc. New York, s. 1085.

(2) Tyska regeringen (1962). ”Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents”, *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 nr 49, s. 698–706.

(3) Painter H. A. och King E. F. (1978a), ”WRc porous-pot method for assessing biodegradability”, *Technical Report No.70*, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter H. A. och King E. F. (1978b), ”The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants”, *Wat. Res.* 12, s. 909–915.

(5) Eckenfelder, W. W, (19), US EPA.

(6) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(7) Kapitel C.12 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Modifierat SCAS-test.

(8) Kapitel C.19 i denna bilaga, Uppskattning av adsorptionskoefficienten (K_{oc}) i jord och avloppsslam med användning av högtrycksvätskekromatografi (HPLC).

(9) Gerike P. och Fischer W. K. (1979), ”A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests”, *Ecotox. Env. Saf.*, 3, s. 157–173.

(10) Gerike P. och Fischer W. K. (1981), som (9), ”II Additional results and conclusions”, *Ecotox. Env. Saf.*, 5, s. 45–55.

(11) Painter H. A. och Bealing D. (1989), ”Experience and data from the OECD activated sludge simulation test”, s. 113–138, ”Laboratory tests for simulation of water treatment processes”, *CEC Water Pollution Report 18*, Red. Jacobsen B. N., Muntau H., Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; reviderad 2004), ”Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium – activated sludge simulation test”.

(13) Birch R. R. (1982), ”The biodegradability of alcohol ethoxylates”, XIII Jornado Com. Espanol. Deterg., s. 33–48.

(14) Birch R. R. (1984), ”Biodegradation of noniomic surfactants”, *J.A.O.C.S.* 61 (2), s. 340–343.

(15) Gerike P., Fischer W. K. och Holtmann W. (1980), ”Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test”, *Wat.Res.* 14, s. 753–758.

(16) Baumann U., Kuhn G. och Benz M. (1998), ”Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z”, *Umweltchem. Ökotox*, 10, s. 214–220.

(17) Her Majesty’s Stationery Office (1982), ”Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials”, s. 91–98, ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998), ”Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels”.

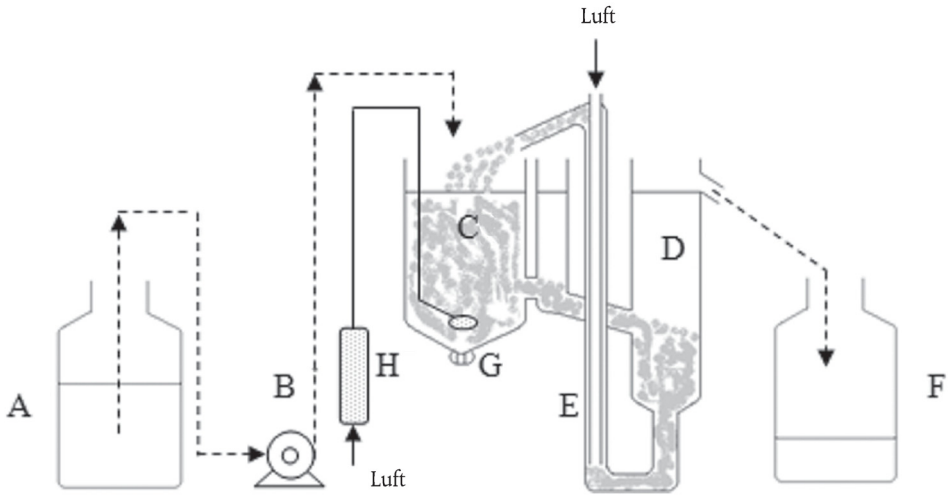
▼**M4**

Tillägg 1

Figur 1

Utrustning för undersökning av biologisk nedbrytning

Husmann-enhet



A. Förvaringskärl

B. Doseringspump

C. Luftningskammare (kapacitet 3 l)

D. Sedimenteringskärl

E. Mammutpump

F. Uppsamlingskärl

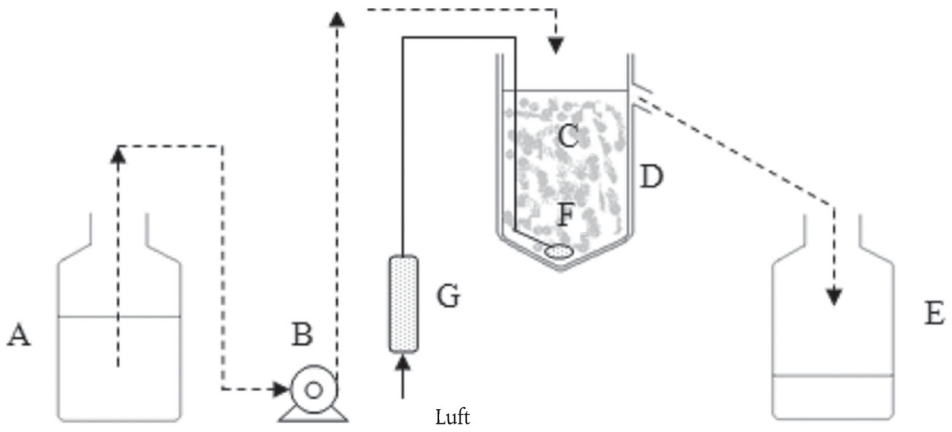
G. Luftningssystem

H. Luftflödesmätare

Figur 2

Utrustning för undersökning av biologisk nedbrytning

Porous Pot-enhet



A. Förvaringskärl

B. Doseringspump

C. Poröst luftningskärl

D. Yttre ogenomträngligt kärl

E. Uppsamlingskärl

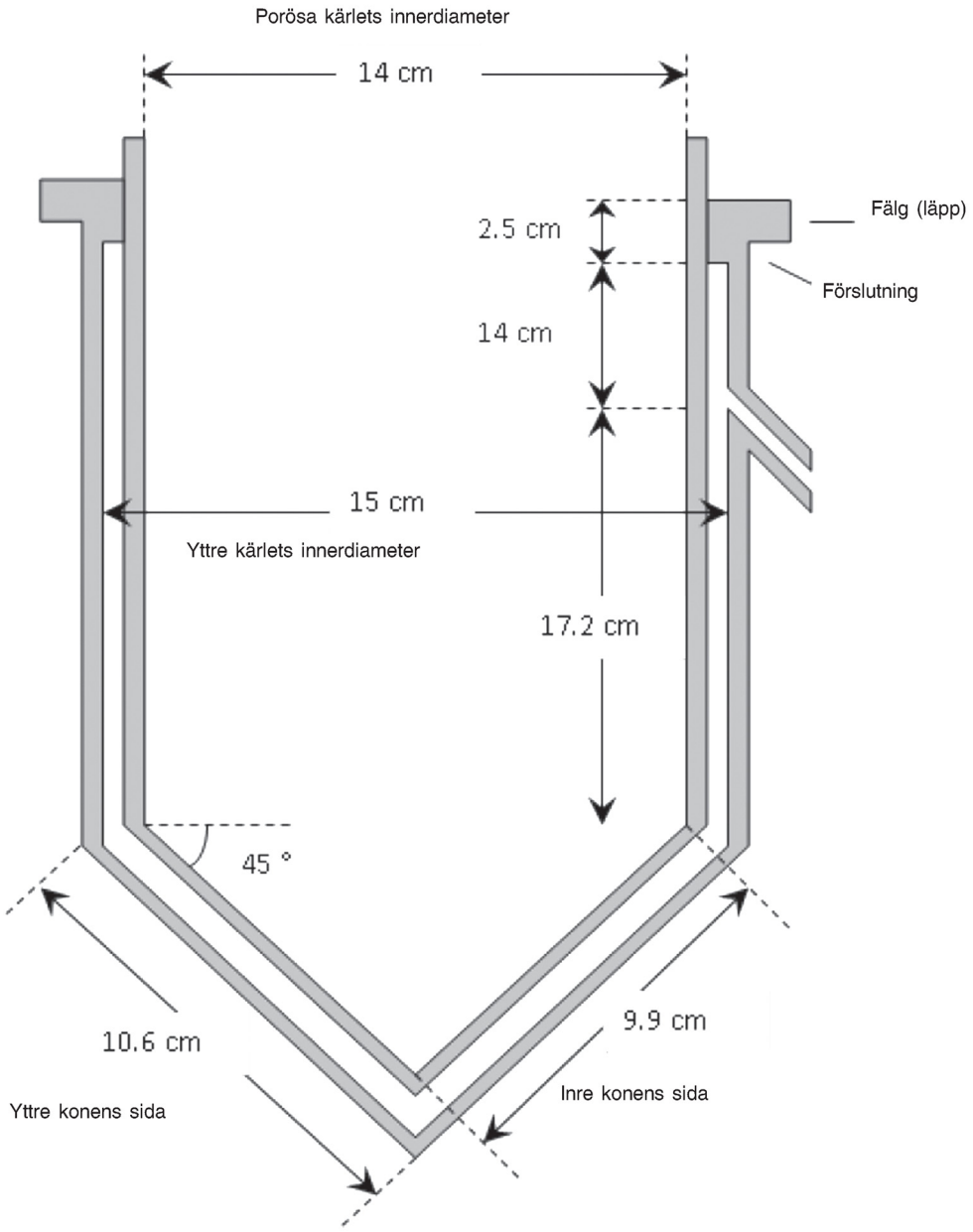
F. Diffusör

G. Luftflödesmätare

▼M4

Figur 3

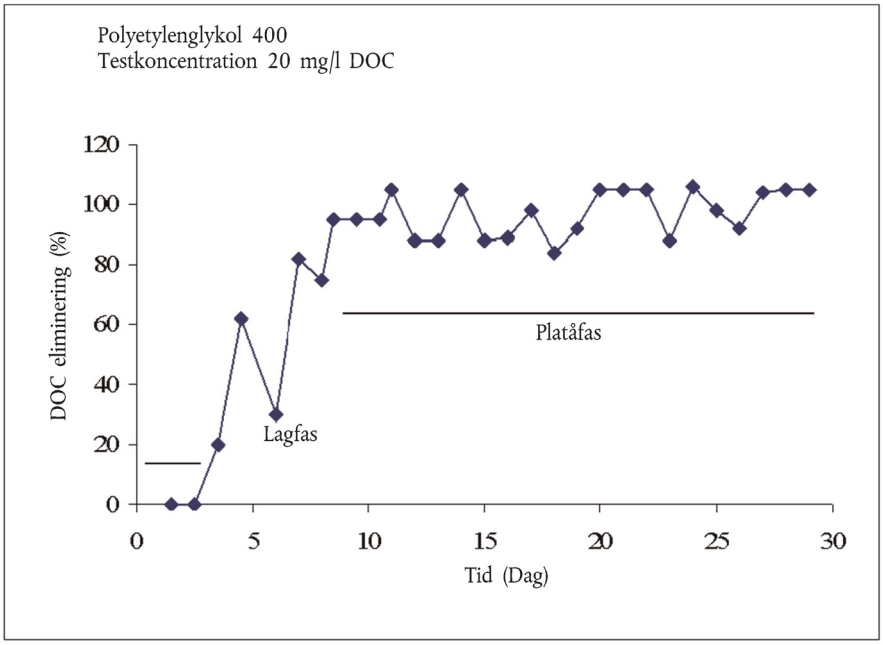
Detaljbeskrivning av Porous Pot-enhetens luftningskärl (3 l)



▼**M4**

Tillägg 2

Exempel på en elimineringskurva



▼M4

Tillägg 3

[SOM INFORMATION]

KOPPLING AV TESTENHETER

För att försöka likställa de mikrobiella populationerna i testenheten som matas med avloppsvatten plus testkemikalie och kontrollenheten som endast matas med avloppsvatten, har man infört dagligt utbyte av slam (1). Förfarandet kallas koppling och metoden kallas kopplade enheter. Koppling gjordes till en början med Husmann-enheter för aktiverat slam men har också gjorts med Porous Pot-enheter (2) (3). Inga betydande skillnader i resultat erhölls mellan icke-kopplade och kopplade enheter (Husmann eller Porous Pots) och det är därför onödigt att använda tid och resurser på koppling av enheter.

Utbyte av slam kan ge bilden av rätt betydande eliminering, eftersom en del av testkemikalien överförs och koncentrationen av testkemikalie i test- och kontrollutflödena blir nästan densamma. Därför måste korrigeringsfaktorer användas, vilka är beroende av den fraktion som utbyts och den genomsnittliga hydrauliska retentionstiden. Närmare detaljer om beräkningen har publicerats (1).

Beräkna den korrigerade DOC- eller COD-elimineringsgrader med användning av följande allmänna formel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

där

D_{tc} = korrigerad procentuell DOC- eller COD-eliminering,

D_t = fastställd procentuell DOC- eller COD-eliminering,

a = utbytesfraktion av volymen i enheterna för aktiverat slam,

r = genomsnittlig hydraulisk retentionstid (tim).

Om t.ex. hälften av volymen i luftningskärlet byts ut (a = 0,5) och den genomsnittliga hydrauliska retentionstiden är 6 timmar, är den korrekta formeln följande:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITTERATUR

(1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W (1975), ”Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test”, *Wat. Res.* 9, s. 1131–1135.

(2) Painter H. A. och Bealing D. J. (1989), ”Experience and data from the OECD Activated Sludge Simulation Test”, s. 113–138, ingår i Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18, Red. Jacobsen B. N., Muntau H., Angeletti G.

(3) Painter H. A., King E. F. (1978), ”Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability”, Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Tillägg 4

UTVÄRDERING AV INHIBERING AV AKTIVERAT SLAM

Förfarande med testkemikalier

1. En kemikalie (eller ett avloppsvatten) bryts eventuellt inte ned eller elimineras i simuleringstest och kan t.o.m. ha en inhiberande effekt på slammets mikroorganismer. Övriga kemikalier är biologisk nedbrytbara i låga koncentrationer men har inhiberande verkan i högre koncentrationer (hormesis). Inhiberande effekter har kanske framkommit på ett tidigare skede eller kan bestämmas med hjälp av toxicitetstest, med användning av liknande eller identiskt inokulat som används vid simuleringstest (1). Sådana metoder är inhibering av syreupptagning (kapitel C.11 i denna bilaga (2) och ISO 8192 (3)) eller inhibering av tillväxt av mikroorganismer i aktiverat slam (ISO 15522 (4)).

2. Vid simuleringstest framgår inhibering genom att skillnaden mellan upplöst organiskt kol (DOC) eller kemisk syreförbrukning (COD) mellan utflödet från testkärlet och utflödet från kontrollkärlet är större än det DOC som tillsatts i form av testkemikalie. Detta kan även uttryckas som att den procentuella elimineringen av DOC (och biokemisk syreförbrukning BOD, kemisk syreförbrukning COD och/eller NH^{+}_{4}) i det organiska mediet minskar när testkemikalie har tillsatts. Om detta inträffar bör testet upprepas med lägre koncentration av testkemikalien tills man når en nivå där ingen inhibering inträffar och därefter eventuellt ytterligare sänka koncentrationen tills testkemikalien har brutits ned biologiskt. Om däremot testkemikalien (eller avloppsvattnet) påverkar processen negativt vid alla testade koncentrationer, tyder detta på att kemikalien är svår eller omöjlig att behandla biologiskt, även om det kan vara värt att upprepa testet med aktiverat slam från en annan källa och/eller låta slammet acklimatisera sig mer gradvis.

3. Omvänt gäller att om testkemikalien bryts ned biologiskt vid första försöket i ett simuleringstest bör koncentrationen ökas, om det är nödvändigt att få information om huruvida kemikalien fungerar inhiberande.

4. Vid bestämning av inhiberingsgraden bör man komma ihåg att populationen i det aktiverade slammet kan ändras så att mikroorganismerna med tiden utvecklar tolerans mot en inhiberande kemikalie.

5. Beräkning av inhiberingsgraden:

   Den totala procentuella elimineringen R_o, av BOD, DOC, COD osv. för test- och kontrollenheterna kan beräknas genom följande:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   där:

   I = inflödeskoncentrationen för BOD, DOC, COD osv. för test- eller kontrollkärl (mg/l),

   E = respektive utflödeskoncentrationer (mg/l).

   I och E måste korrigeras för DOC på grund av testkemikalien i testenheterna, annars får man inte rätt resultat från beräkningen av procentuell inhibering.

▼**M4**

Graden av inhibering orsakad av testkemikalien kan beräknas genom följande:

$$\% \text{ inhibering} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

där:

R_c = procentuell eliminering i kontrollkärlen,

R_t = procentuell eliminering i testkärlen.

LITTERATUR

(1) Reynolds L. m.fl. 1987), ”Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability”, *Chemosphere* 16: 2259.

(2) Kapitel C.11 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – respirationshämningstest.

(3) ISO 8192 (2007), Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999), Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Tillägg 5

Dåligt vattenlösliga kemikalier, flyktiga kemikalier

Dåligt vattenlösliga kemikalier

Det verkar finnas få publicerade rapporter rörande test som simulerar vattenrening och omfattar kemikalier med dålig eller ingen löslighet i vatten (1) (2) (3).

Det finns ingen enskild metod för dispergering av testkemikalie som kan tillämpas på alla olösliga kemikalier. Två av de fyra typer av metoder som beskrivs i ISO 10634 (4) verkar vara lämpliga för att dispergera testkemikalier för simuleringstest – användning av emulgeringsmedel och/eller ultraljud. Den resulterande dispersionens stabilitet bör fastställas under minst 24 timmar. Lämpligt stabiliserade dispersioner i en behållare med kontinuerlig omrörning (punkt 38) kan därefter doseras till luftningskärlet separat från avloppsvatten från hushåll (eller syntetiskt avloppsvatten).

Om en dispersion är stabil bör man undersöka hur testkemikalien kan bestämmas i den dispergerade formen. Det är sannolikt inte lämpligt med DOC, vilket betyder att en specifik analysmetod för testkemikalien bör etableras som kan användas på utflöde, utflödets fasta ämnen och aktiverat slam. Därefter fastställs vad som händer med testkemikalien vid simulering av aktivslamprocessen, i vätskeform och fast form. Då kan en ”massbalans” etableras för att fastställa huruvida det har skett biologisk nedbrytning av testkemikalien. Detta ger dock endast indikation på primär biologisk nedbrytning. Man bör försöka demonstrera slutlig biologisk nedbrytning genom att tillämpa respirometritest för lätt bionedbrytbarhet (kapitel C.4 i denna bilaga (5) C, F eller D) med inokulat i form av slam som exponerats för testkemikalien i simuleringstestet.

Flyktiga kemikalier

Simulering av avloppsvattenrening på flyktiga kemikalier är både diskutabelt och problematiskt. På samma sätt som för dåligt vattenlösliga testkemikalier tycks det även för flyktiga kemikalier ha publicerats mycket få rapporter som beskriver simuleringstest. En konventionell typ av apparatur för fullständig blandning kan anpassas genom att försegla luftnings- och sedimenteringskärlen, och därefter mäta och kontrollera luftflödet med flödesmätare och låta utloppsgasen passera genom fällor för uppsamling av flyktigt organiskt material. I vissa fall används vakuumpump för att dra utloppsgasen genom en ”kall” fälla eller purge-trap som innehåller Tenax och silikagel för gaskromatografianalyser. Testkemikalien i fällan kan bestämmas analytiskt.

Testet genomförs i två delar. Först körs enheterna utan slam men med syntetiskt avloppsvatten plus testkemikalie som pumpas in i luftningskärlet. Prover tas av inflöde, utflöde och utloppsgas och analyseras för testkemikalien under några dagar. Utifrån insamlade data kan procentandelen testkemikalie (R_{vs}) som strippats ur systemet beräknas.

Därefter genomförs normalt biologiskt test (med slam) under liknande förhållanden som använts vid strippningen. Likaså mäts DOC eller COD för att kontrollera att enheterna fungerar effektivt. Mängden testkemikalie i inflöde, utflöde och utloppsgas bestäms då och då under testets första fas, och efter acklimatiseringen mer frekvent. Utifrån de data som fås under steady state kan procentandelen eliminerad testkemikalie från vätskefasen i alla processer (R_T) (fysisk och biologisk eliminering) beräknas, såväl som andelen (R_V) som strippats från systemet.

▼M4

Beräkning:

a) Vid icke-biologiskt test kan procentandelen (R_{VP}) testmaterial som strippats från systemet beräknas genom följande:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

där

R_{VP} = eliminering av testkemikalie genom avdunstning (%),

S_{VP} = testkemikalie som uppsamlats i en fälla, uttryckt som ekvivalent koncentration i vätskefasen (mg/l),

S_{IP} = testkemikaliens koncentration i inflödet (mg/l).

b) Vid biologiskt test kan procentandelen (R_V) testmaterial som strippats från systemet beräknas genom följande:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

där

R_V = eliminering av testkemikalie genom avdunstning i biologiskt test (%),

S_V = testkemikalie som uppsamlats i en fälla i biologiskt test, uttryckt som ekvivalent koncentration i vätskeformigt inflöde (mg/l),

S_I = testkemikaliens koncentration i inflödet (mg/l).

c) Vid biologiskt test beräknas procentandelen testkemikalie (R_T) som eliminerats genom alla processer genom följande:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

där

S_E = koncentrationen testkemikalie i (vätskeformigt) utflöde (mg/l).

d) Då kan procentandelen (R_{BA}) som eliminerats genom bionedbrytning plus adsorption beräknas genom följande:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Separata test bör göras för att fastställa om testkemikalien har adsorberats och i så fall kan ytterligare korrigering göras.

e) En jämförelse mellan andelen testkemikalie som strippats från systemen för biologiskt test (R_v) och icke-biologiskt test (R_{vp}) indikerar den totala effekt som den biologiska behandlingen har haft på utsläpp av testkemikalien i atmosfären.

Exempel: Bensen

Slamretentionstid = 4 dagar

Syntetiskt slam, retentionstid 8 timmar

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Således,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % och R_{BA} = 85 %.

Det antas att bensen inte adsorberas på slammet.

LITTERATUR

(1) Horn J. A., Moyer J. E., Hale J.H. (1970), ”Biological degradation of tertiary butyl alcohol”, Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ., s. 939–854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990), ”Biodegradability of organic substances in the aquatic environment”, CRC Press, Boston, Förenta staterna.

(3) Stover E. L., Kincannon D. F. (1983), ”Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters”, *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 55, 97,

(4) ISO 10634 (1995), *Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.*

(5) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

▼M4

Tillägg 6

Slamretentionstidens (SRT) inverkan på reningsmöjligheterna för en kemikalie

INLEDNING

1. Den metod som beskrivs i huvudtexten syftar till att fastställa om de kemikalier som testas (i regel kemikalier som veterligen är inherent, men inte lätt, bionedbrytbara) kan brytas ned biologiskt inom de gränser som gäller i avloppsreningsverk. Resultaten uttrycks som procentandel eliminering och procentandel biologisk nedbrytning. Driftsbetingelserna i aktivslamenheterna och valet av inflöde kan ge rätt stora variationer vad gäller koncentrationen av testkemikalie i utflödet. Testerna genomförs vanligen med endast en nominell koncentration av fasta ämnen i slammet eller en nominell slamretentionstid (SRT) och de beskrivna systemen för slamkassering kan leda till att SRT-värdet varierar betydligt under testet, både från dag till dag och under en dag.

2. I denna variant (1) (2) kontrolleras SRT med mycket snävare gränser under varje 24-timmarsperiod (på samma sätt som i full skala), vilket ger en mer konstant koncentration i utflödena. Avloppsvatten från hushåll rekommenderas eftersom det ger enhetligare och högre procentandel eliminering. Dessutom undersöks verkningarna av ett antal SRT-värden och i en mer detaljerad studie kan verkningarna av ett urval temperaturer på utflödeskoncentrationen fastställas.

3. Det finns fortfarande inget allmänt samförstånd om vilken kinetisk modell som gäller när kemikalier bryts ned biologiskt under de förhållanden som råder vid avloppsvattenrening. Monod-modellen för bakteriell tillväxt och substratanvändning valdes (1) (2) för behandling av insamlade data, eftersom metoden endast var avsedd att tillämpas på kemikalier tillverkade i stora volymer som leder till en koncentration över 1 mg/l i avloppsvattnet. Den förenklade modellens giltighet och de antaganden som gjordes fastställdes genom användning en serie alkoholetoxylat med varierande grader av primär bionedbrytbarhet (2) (3).

Anmärkning: Denna metodvariant påminner mycket om testmetod C.10-A och nedan anges endast de detaljer som avviker.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

4. Porous Pot-enheter för aktiverat slam utformade för att ge (nästan) kontinuerlig kassering av blandad vätska, vilket möjliggör en mycket exakt kontroll av slamretentionstiden (SRT eller θ_s), körs i icke-kopplat läge med ett urval olika slamretentionstider och, alternativt, med ett urval olika temperaturer. Retentionstiden är i regel 2–10 dagar och temperaturen mellan 5 och 20 °C. Avloppsvattnet, helst från hushåll, och en lösning av testkemikalien doseras separat till enheterna med ett flöde som ger den önskade retentionstiden (3–6 timmar) och önskad koncentration av testkemikalien i inflödet. Kontrollenheter som inte matas med testkemikalie körs parallellt för jämförande ändamål.

5. Olika typer av apparatur kan användas, men stor vikt bör fästas vid att säkerställa god kontroll av slamretentionstiden. Om den utrustning som används t.ex. innehåller ett sedimenteringskärl, kan det vara nödvändigt att räkna med förlust av fasta ämnen via utflödet. Dessutom bör speciella försiktighetsmått vidtas för att undvika fel på grund av variationer av mängden slam i sedimenteringskärlet.

▼M4

6. Enheterna körs vid var och en av de olika betingelser som har valts, och efter att jämvikt har nåtts fås genomsnittliga steady state-koncentrationer av testkemikalie i utflödena, och alternativt DOC, under en period som omfattar cirka tre veckor. Utöver bedömning av procentandelen eliminering för testkemikalie, och alternativt DOC, fås förhållandet mellan driftsbetingelserna och koncentrationen i utflödet uttryckt i grafisk form. Utifrån detta kan preliminära kinetiska konstanter beräknas och prognoser för de betingelser under vilka testkemikalien kan behandlas.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

7. Se kapitel C.10 A, punkterna 12 och 13.

GODKÄNNANDENIVÅER

8. Se kapitel C.10 A, punkterna 14 och 15.

REFERENSKEMIKALIE

9. Se kapitel C.10 A, punkt 16.

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

10. Se kapitel C.10 A, punkterna 17 och 18.

METODBESKRIVNING

Apparatur

11. Lämplig enhet är ett modifierat Porous Pot-system (tillägg 6.1). Det består av ett inre kärl konstruerat av poröst polypropen med tjocklek på 3,2 mm och porstorlek på cirka 90 μm, med stumsvetsad söm (detta ger en robustare enhet än den som beskrivs i punkt 21 i detta kapitel C.10 A). Innerkärlet omsluts av ett ogenomträngligt ytterkärl av polyetylen som består av två delar: en rund bas med hål för två luftkanaler och en slamkasseringskanal, och en övre cylinder som är skruvad på basen och vars utlopp är placerat så att Porous Pot-kärlet får en känd volym på 3 liter. En av luftkanalerna har en diffusör och den andra är öppen och placerad i rät vinkel till diffusörens utlopp. Detta system ger den turbulens som krävs för att säkerställa att innehållet blandas fullständigt och att koncentrationerna av löst syre hålls över 2 mg/l.

12. Lämpligt antal enheter hålls vid kontrollerad temperatur mellan 5 och 20 °C (± 1 °C), antingen i vattenbad eller i utrymmen med konstant temperatur. Pumpar krävs för att dosera lösning av testkemikalie och sedimenterat avloppsvatten med önskat flöde (0–1,0 ml/min och 0–25 ml/min) och en tredje pump för att avlägsna överloppsslam från luftningskärlen. Den mycket låga flödeshastighet som krävs för överskottsslam nås genom att använda en pump ställd på högre flödeshastighet som körs intermittent med hjälp av en timer, t.ex. 10 sekunder per minut, så att en pumpinställning på 3 ml/min ger ett flöde på 0,5 ml/min.

Filtreringsapparatur eller centrifug

13. Se kapitel C.10 A, punkt 23.

Analysutrustning

14. Se kapitel C.10 A, punkt 24.

Vatten

▼M4

15. Se kapitel C.10 A, punkterna 25 och 26.

Organiskt medium

16. Se kapitel C.10 A, punkt 27.

Syntetiskt slam

17. Se kapitel C.10 A, punkt 28.

Avloppsvatten från hushåll

18. Se kapitel C.10 A, punkt 29.

Aktiverat slam

19. Se kapitel C.10 A, punkt 30.

Stamlösningar av testkemikalien

20. Se kapitel C.10 A, punkterna 31 och 32.

FÖRFARANDE

Förberedning av inokulat

21. Se kapitel C.10 A, punkt 34 (endast denna gäller) – använd aktiverat slam (cirka 2,5 g/l).

Antal testenheter

22. För ett enkelt test, dvs. för att mäta procentandelen eliminering, behövs bara en slamretentionstid (SRT). För att få de data som behövs för beräkning av preliminära kinetiska konstanter behövs däremot 4 eller 5 SRT-värden. Vanligen används retentionstider mellan 2 och 10 dagar. Det är i regel praktiskt att göra ett test med 4 eller 5 SRT-värden samtidigt vid en och samma temperatur. I mer omfattande studier kan samma SRT-värden, eller eventuellt ett annat urval värden, användas vid andra temperaturer inom området 5–20 °C. För primär bionedbrytning (huvudändamål) behövs i regel bara en enhet per uppsättning testbetingelser. Vid test av slutlig bionedbrytbarhet behövs dock en kontrollenhet för varje uppsättning testbetingelser; denna matas med enbart slam, inte testkemikalie. Om man tror att det finns testkemikalie i det slam som används, är det nödvändigt att använda kontrollenheter vid bedömning av primär biologisk nedbrytning och därefter göra nödvändiga korrigeringar i beräkningarna.

Dosering av organiskt medium och testkemikalie

23. Se kapitel C.10 A, punkterna 36–39, men notera att testkemikalielösningen doseras separat och att flera olika slamkasseringsgrader används. Det behövs också regelbunden övervakning (t.ex. två gånger om dagen) och vid behov justering, inom ±10 %, av flödeshastigheterna för inflöden, utflöden och slamkassering. Om det uppstår svårigheter med analysmetoden när avloppsvatten från hushåll används, kan testet genomföras med syntetiskt avloppsvatten, men då måste man se till att olika media ger jämförbara kinetiska data.

Hantering av enheterna för aktiverat slam

24. Se kapitel C.10 A, punkterna 40–43, men SRT ska endast kontrolleras genom ”konstant” kassering av slam.

Provtagning och analys

25. Se kapitel C.10 A, punkterna 44–50, med undantag för att testkemikaliens koncentration måste bestämmas och bestämning av DOC är frivillig. COD ska inte användas.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

26. Se kapitel C.10 A, punkterna 52–54.

Presentation av testresultat

27. Se kapitel C.10 A, punkterna 56–62.

Beräkning av kinetiska konstanter

28. Det är mera realistiskt att ange genomsnittlig steady state-koncentration av testkemikalien i utflödet och beskriva hur denna varierar enligt driftsbetingelserna än att ange procentuell primär bionedbrytning. Detta kan göras genom att beakta ekvation 6 i tillägg 6.2 som kan ge värden för K_S, μ_m och θ_{SC}, den kritiska slamretentionstiden.

(Alternativt kan ungefärliga värden för K_S och μm fås med hjälp av ett enkelt datorprogram för att anpassa den teoretiska kurvan som beräknats med ekvation 2 (tillägg 6.2) till de experimentella värdena. Även om ingen given lösning är unik, går det att få en rimlig approximering av K_S och μm.)

Resultatvariation

29. Den vanliga erfarenheten är att man får varierande värden för de kinetiska parametrarna för individuella kemikalier. Man tror att slammets odlingsbetingelser och de betingelser som gäller i det test som används (som i punkt 5 och i andra test) har en stor effekt på de värden som erhålls. En aspekt av denna variation har diskuterats av Grady m.fl. (4) som har föreslagit att termerna ”extant” and ”intrinsic” ska användas för de två extrema betingelser som representerar gränserna för den fysiologiska status som en odling kan ha under ett kinetiskt experiment. Om odlingens status inte tillåts variera under testet, återspeglar de kinetiska parametervärdena betingelserna i den miljö från vilken mikroorganismerna har tagits – för dessa värden används benämningen ”extant”, dvs. något som fortsatt existerar. Vid den andra yttersta gränsen är testbetingelserna sådana att de medger full utveckling av proteinsyntessystemet och därmed möjlighet till största möjliga tillväxt, och då används benämningen ”intrinsic” för de kinetiska parametrar som erhålls, dvs. de är endast beroende av substratets karaktär och typen av bakterier i odlingen. Som riktlinje kan sägas att ”extant”-värden fås när förhållandet mellan substratets koncentration och kompetenta mikroorganismer (S_o/X_o) hålls lågt, t.ex. 0,025, och ”intrinsic”-värden fås när förhållandet är högt, t.ex. minst 20. I båda fallen gör S_o bör vara samma eller högre än det relevanta värdet för Ks, halvmättnadskonstanten.

30. Variationen och andra aspekter rörande bionedbrytningens kinetik diskuterades nyligen vid en SETAC-workshop (5). Dessa studier, rapporterade och projekterade, bör ge en klarare uppfattning om den kinetik som fungerar i vattenreningsverk, och därmed en bättre tolkning av befintliga data och förslag till mer relevanta utformningar av nya testmetoder.

LITTERATUR:

(1) Birch R. R. (1982), ”The biodegradability of alcohol ethoxylates”, XIII Jornado Com. Espanol Deterg., s. 33–48.

(2) Birch R. R. (1984), ”Biodegradation of noniomic surfactants”, *J.A.O.C.S.*, 61(2), s. 340–343.

(3) Birch R. R. (1991), ”Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment”, *J. Chem. Tech. Biotechnol*., 50, s. 411–422.

▼**M4**

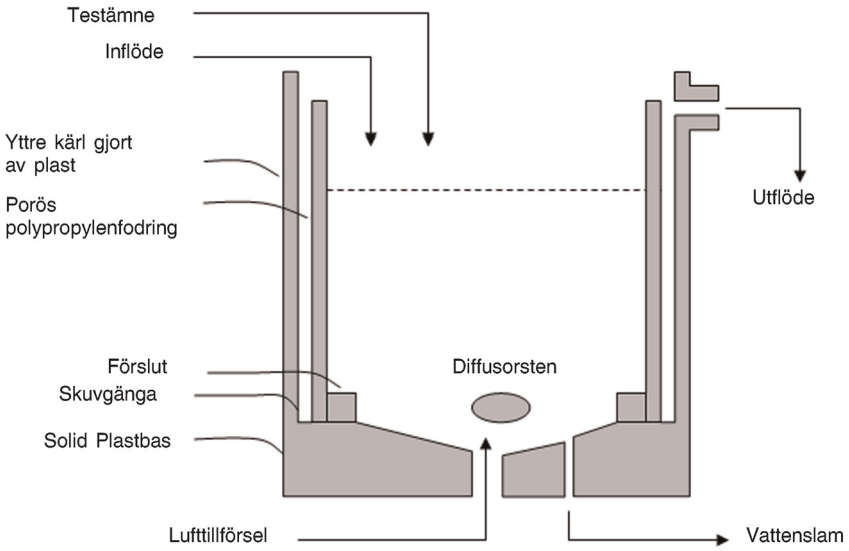
(4) Grady C. P. L., Smets B. F. och Barbeau D. S. (1996), ”Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology”, *Wat. Res*., 30 (3), s. 742–748.

(5) ”Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997)”, Workshop at Port Sunlight, UK, red. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W., 4–6 september 1996. SETAC Europe, Bryssel.

▼**M4**

Tillägg 6.1

Porous Pot med SRT-kontroll



▼M4

Tillägg 6.2

Beräkning av kinetiska konstanter

1. Utifrån antagandet att Monod-kinetik kan tillämpas och med beaktande av en massbalans av aktiva fasta ämnen och substrat över systemet med aktiverat slam (1), kan man få steady state-uttryck enligt följande:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad (1)$$

eller

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad (2)$$

där

S_1 = koncentrationen substrat i utflödet (mg/l)

K_S = halvmättnadskonstant, den koncentration vid vilken $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifik tillväxthastighet (d^{-1})

μ_m = maximivärde för μ_m (d^{-1})

K_d = specifik sönderfallshastighet för aktiva fasta ämnen (d^{-1})

θ_S = slammets medelretentionstid, SRT (d)

Undersökning av denna ekvation leder till följande slutsatser:

i) Koncentrationen i utflödet är oberoende av koncentrationen i inflödet (S_0); således varierar den procentuella bionedbrytningen enligt koncentrationen i inflödet S_0.

ii) Den enda anläggningskontrollparameter som påverkar S_1 är slamretentionstiden θ_S.

iii) För en given koncentration i inflödet, S_0, finns det en kritisk slamretentionstid, dvs.

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad (3)$$

där

θ_{SC} = kritisk slamretentionstid, under vilken de kompetenta mikroorganismerna sköljs ut ur anläggningen.

Eftersom de övriga parametrarna i ekvation (2) är associerade med tillväxtkinetik, är det sannolikt att temperaturen påverkar utflödets substratnivå och den kritiska slamåldern, dvs. den slamretentionstid som behövs för att få en viss grad av rening ökar med sjunkande temperatur.

2. Utifrån en massbalans för fasta ämnen i Porous Pot-systemet och utifrån antagandet att koncentrationen fasta ämnen i anläggningens utflöde X_2 är lågt i jämförelse med luftningskärlets utflöde X_1, är slamretentionstiden

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad (4)$$

▼**M4**

och

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

där

V = luftningskärlets volym (l)

X_1 = koncentrationen fasta ämnen i luftningskärlet (mg/l)

X_2 = koncentrationen fasta ämnen i utflödet (mg/l)

Q_0 = inflödets flödeshastighet (l/d)

Q_1 = avloppsslammets flödeshastighet (l/d)

Det är således möjligt att hålla slamretentionstiden på ett förhandsvalt värde genom att kontrollera avloppsslammets flödeshastighet Q_1.

Slutsatser:

3. Huvudsyftet med detta test är alltså att kunna förutse testkemikaliens koncentration i utflödet, och därmed testkemikaliens nivåer i vattenrecipienten.

4. Genom att plotta S_1 mot θ_S kan den kritiska slamretentionstiden θ_{SC} i vissa fall uppskattas på enkelt sätt, se t.ex. kurva 3 i figur 1. Om detta inte är möjligt kan θ_{SC} beräknas med ungefärliga värden på μ_m och K_S genom att plotta S_1 mot $S_1 \bullet \theta_S$.

Omordning av ekvation 1 ger följande:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad (5)$$

Om K_d är lågt blir $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ och ekvation 5 blir enligt följande:

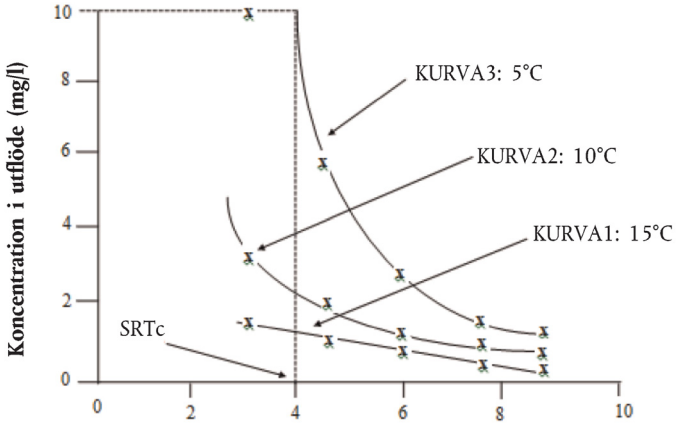
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad (6)$$

Då bör kurvan bli en rak linje (se figur 2) som har lutningen $1/\mu_m$ och skärningspunkt med K_S/μ_m; likaså är $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

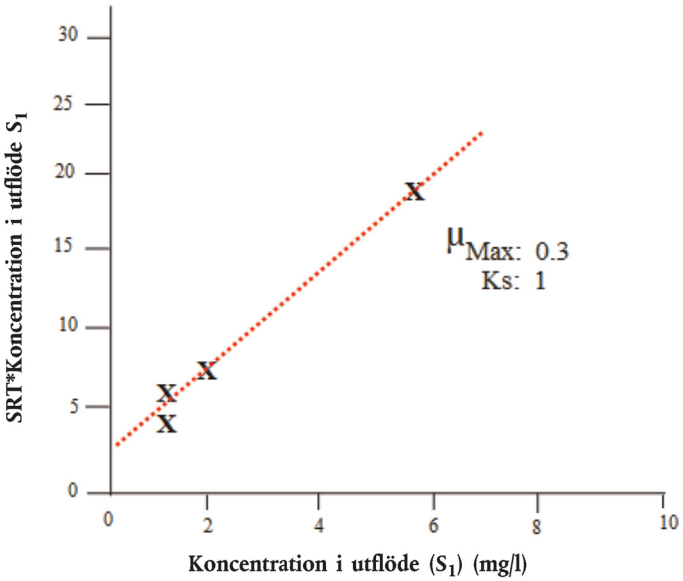
Figur 1

Tre temperaturer, fem SRT-värden



Figur 2

Regressionslinje SRT · S_1 mot S_1 vid T = 5 °C



Ordlista:

Koncentration i utflöde

Kurva

▼M4

Tillägg 7

TEST VID LÅGA (µg/l) KONCENTRATIONER

1. Kemikalierna i vattenmiljön förekommer ofta i mycket låga koncentrationer (µg/l), även i avloppsvatten. Vid sådana koncentrationer fungerar de sannolikt inte som primära substrat som resulterar i tillväxt, utan sönderfaller mer sannolikt som icke-växande sekundära substrat, parallellt med förekomsten av flera olika naturligt förekommande kolföreningar. Av det följer att sönderfallet av sådana kemikalier inte följer modellen som beskrivs i tillägg 6. Det finns flera modeller som kan tillämpas och under de betingelser som råder i system för rening av avloppsvatten kan flera modeller vara samtidigt aktiva. Det kommer att behövas en hel del mera forskning för att få klarhet i detta problem.

2. Fram till dess kan förfarandet som beskrivs i huvudtexten (kapitel C.10 A) följas, men endast för primär bionedbrytbarhet, med användning av lämpligt låga koncentrationer (< 100 µg/l) och ett validerat analysförfarande. Den procentuella bionedbrytningen kan beräknas (se punkt 54 i testmetoden) förutsatt att de abiotiska processerna (adsorption, flyktighet osv.) beaktas. Som exempel kan nämnas en studie gjord av Nyholm m.fl. (1) (2) med användning av en 4-timmarscykel i ett fill and draw-system. De rapporterade pseudo-första ordningens konstanter för 5 kemikalier som tillsatts till syntetiskt avloppsvatten i koncentrationer på 5–100 µg/l. För slutlig bionedbrytbarhet kan ^{14}C-märkta kemikalier användas. Beskrivning av detta går utöver räckvidden för denna testmetod eftersom det än så länge inte finns överenskomna förfaranden, om än en föreslagen metod för ISO 14592 (3) innehåller vägledning om användningen av ^{14}C-märkta kemikalier.

SCAS-test

3. Senare föreslogs ett enklare tvåstegstest (4) (5) (6) där SCAS-metoden (Semi Continous Activated Sludge) följs av ett kortvarigt kinetiskt test på prover tagna från SCAS-enheterna. SCAS-systemet körs med kända slamkasseringsgrader (till åtskillnad från den ursprungliga C.12-testmetoden) och matas med modifierat syntetiskt avloppsvatten eller avloppsvatten från hushåll. Det syntetiska avloppsvattnet modifierades (på grund av föränderligt pH-värde och slammets dåliga sedimentering) genom tillsats av fosfat som buffert, jästextrakt, järn(III)klorid och spårelementsalter, och COD höjdes till cirka 750 mg/l genom ökad koncentration av pepton och köttextrakt. Enheterna kördes med en 24-timmarscykel: luftning under 23 timmar, kassering av slam, sedimentering, borttagning av supernatant (utflöde) och därefter tillsats av syntetiskt avloppsvatten plus testkemikalie, upp till µg/l (dvs. ungefär samma koncentration som användes i korttidstestet). En gång i veckan ersattes 10 % av totalslammet med färskt slam för att upprätthålla balans i den mikrobiella populationen.

4. Koncentrationen av testkemikalie i början och i slutet av luftningen uppmäts och testet fortsätts tills en konstant eliminering av testkemikalie erhålls, vilket tar från en vecka till flera månader.

Korttidstest

5. Ett korttidstest (t.ex. 8 timmar) används för att bestämma (pseudo) första ordningens kinetiska konstant för sönderfall av testkemikalien i aktiverat slam med kända men olika ursprung och olika historia. Slamprover tas särskilt från SCAS-reaktorer – i slutet av luftningsperioden när koncentrationen organiskt substrat är låg – medan acklimatiseringsexperiment pågår (punkterna 3, 4). För jämförelse kan slam också tas från en parallell SCAS-enhet som inte exponeras för testkemikalie. Blandningar av slam och testkemikalie

▼M4

tillsatta i två eller flera koncentrationen i området 1–50μg/l luftas, utan tillsats av syntetiskt avloppsvatten eller annat organiskt substrat. Kvarvarande testkemikalie i lösningen bestäms med regelbundna mellanrum, t.ex. varje timme, beroende på kemikaliens sönderfallsegenskaper, under högst 24 timmar. Proverna centrifugeras före själva analysen.

Beräkningar

6. Data från SCAS-enheterna används för att beräkna procentandelen eliminerad testkemikalie (punkt 54). Likaså kan en konstant för genomsnittlig elimination K_1 (normaliserad för koncentrationen suspenderade fasta ämnen) kalkyleras genom följande:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

där

t = luftningstiden (23 timmar)

C_e = koncentrationen vid luftningsperiodens slut (μg/l)

C_i = koncentrationen vid luftningsperiodens början (μg/l)

SS = koncentrationen av fasta ämnen i aktiverat slam (g/l)

7. För korttidstestet plottas logaritmen av procentuell återstående koncentration mot tiden och lutningen på den första delen (10–50 % sönderfall) av grafen motsvarar K_1, (pseudo)första ordningens konstant. Konstanten normaliseras med hänsyn till koncentrationen fasta ämnen i slammet genom att dividera lutningen med koncentrationen fasta ämnen i slammet. De rapporterade resultaten måste också innehålla uppgifter om initialkoncentrationen för testkemikalie och suspenderade fasta ämnen, slamretentionstiden, slammatning och slamkälla samt uppgifter om eventuell förhandsexponering för testkemikalien.

Resultatvariation

8. Variationen och andra aspekter rörande bionedbrytningens kinetik diskuterades nyligen vid en SETAC-workshop (7). Dessa studier bör, rapporterade och projekterade, ge en klarare uppfattning om den kinetik som fungerar i vattenreningsverk, och därmed en bättre tolkning av befintliga data och förslag till mer relevanta utformningar av nya testmetoder.

LITTERATUR

(1) Nyholm N., Jacobsen B. N., Pedersen B. M., Poulsen O, Dambourg A. och Schultz B. (1992), ”Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability”, *Wat. Res.* 26, s. 339–353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O. och Ostfeldt P. (1993), ”Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption”, *Wat. Res.* 27, s. 1505–1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998), *Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water*.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U. T., Pedersen J. P. och Frimer-Larsen H. (1996), ”Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations”, *Chemosphere* 33 (5), s. 851–864.

(5) Berg U. T. och Nyholm N. (1996), ”Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations”, *Chemosphere* 33 (4), s. 711–735.

(6) Danish Environmental Protection Agency 1996), ”Activated sludge biodegradability simulation test”, Environmental Project, No. 337, Nyholm, N. Berg, UT, Ingerslev, F. Miljö- och energiministeriet, Köpenhamn.

(7) ”Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997)”, Workshop at Port Sunlight, UK, Red. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K. och Verstraete W., 4–6 september 1996, SETAC Europe, Bryssel.

▼M4

C.10-B: Biofilmer

INLEDNING

1. Simuleringstest används i regel på kemikalier som inte har klarat screeningtest för lätt bionedbrytbarhet (kapitel C.4 A till F i denna bilaga (9)) men som har klarat test för lätt bionedbrytbarhet. Undantagsvis används simuleringstest också för kemikalier där det krävs mer information, särskilt storvolymskemikalier, och i regel används test med aktiverat slam (C.10 A). Under vissa omständigheter krävs det dock specifik information om hur en kemikalie agerar när reningsmetoderna inbegriper biofilm (biologiska filter eller bakteriefilter, roterande biologiska kontaktorer, fluidbädd). För att möta dessa behov har olika slags utrustning tagits fram.

2. Gerike m.fl. (1) använde stora bakteriefilter i pilotskala enligt kopplad modell. Filtren var mycket utrymmeskrävande och krävde relativt stora mängder avloppsvatten eller syntetiskt avloppsvatten. Truesdale m.fl. (2) beskrev små filter (6 fot × 6 tum i diameter) som matades med naturligt avloppsvatten fritt från ytaktiva ämnen men som fortfarande krävde rätt stora volymer. Det krävs upp till 14 veckor för utveckling av en ”mogen” biofilm och ytterligare 4–8 veckor efter första tillförseln av det ytaktiva testämnet innan acklimatisering sker.

3. Baumann m.fl. (3) utvecklade ett betydligt mindre filter med polyesterfleece som först hade blötlagts i aktiverat slam såsom inert medium som underlag för biofilmen. Enda kolkälla var testkemikalien och bionedbrytbarheten bedömdes utifrån mätningar av upplöst organiskt kol (DOC) i inflöde och utflöde och utifrån mängden CO_2 i utloppsgasen.

4. Ett nytt sätt att närma sig frågan hade Gloyna m.fl. (4) som uppfann den roterande rörformiga reaktorn. På den inre ytan av ett roterande rör odlades en biofilm på känd ytareal genom passage av ett flöde som tillsattes i övre ändan av det svagt horisontellt lutande röret. Reaktorn har använts för att studera ytaktiva ämnens bionedbrytbarhet (5) samt för att undersöka biofilmens optimala tjocklek och diffusionen genom filmen (6). Gloyna m.fl. utvecklade reaktorn ytterligare, bl.a. genom att göra en modifikation som ger möjlighet att bestämma CO_2 i utloppsgasen.

5. Den roterande rörformiga reaktorn har antagits av Standing Committee of Analysts (UK) som en standardmetod för bedömning av både kemikaliers bionedbrytbarhet (7) och avloppsvattens behandlingsmöjlighet och toxicitet (8). Fördelarna med den metod som beskrivs här är att den är enkel, kompakt, reproducerbar och att det krävs relativt små volymer organiskt medium.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Syntetiskt avloppsvatten eller avloppsvatten från hushåll, testkemikalien, i blandning eller för sig, appliceras på inre ytan av ett långsamt roterande lutande rör. Ett lager mikroorganismer, liknande dem som finns på biofiltermedia, byggs upp på den inre ytan. Reaktorns driftsbetingelser väljs så att man får adekvat eliminering av organiskt material och, om så krävs, oxidation av ammonium.

▼M4

7. Utflödet från röret samlas upp och får antingen sedimentera och/eller filtreras före analys av upplöst organiskt kol (DOC) och/eller testkemikalien med en specifik metod. Som jämförelse körs kontrollenheter som inte matas med testkemikalie parallellt under samma betingelser. Skillnaden mellan koncentrationerna DOC i utflödet från test- och kontrollenheterna antas bero på testkemikalien och dess organiska metaboliter. Skillnaden jämförs med koncentrationen tillsatt testkemikalie (som DOC) i syfte att kunna beräkna elimineringen av testkemikalien.

8. I regel kan bionedbrytning åtskiljas från bioadsorption genom detaljerad granskning av kurvan för eliminering mot tid. Bekräftelse fås vanligen genom ett test för lätt bionedbrytbarhet (syreupptagning eller koldioxidproduktion) där man använder ett acklimatiserat inokulat som tas i slutet av testet från de reaktorer som matas med testkemikalien.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

9. Testkemikaliens renhet, vattenlöslighet, flyktighet och adsorptionsegenskaper bör vara kända för att resultaten ska kunna tolkas korrekt.

10. I regel kan flyktiga och dåligt lösliga kemikalier inte testas om inte särskilda åtgärder vidtas (se tillägg 5 till kapitel C.10 A). Dessutom bör den kemiska strukturen eller minst den empiriska formeln vara känd för att kunna kalkylera teoretiska värden och/eller kontrollera uppmätta parametervärden, t.ex. teoretisk syreförbrukning (ThOD) och DOC.

11. Information om testkemikaliens toxicitet för mikroorganismer (se tillägg 4 till kapitel C.10 A) kan vara till hjälp för valet av lämpliga testkoncentrationer och kan även vara väsentlig för korrekt tolkning av låga värden för biologisk nedbrytbarhet.

GODKÄNNANDENIVÅER

12. Ursprungligen krävdes att den primära biologiska nedbrytningen av ytaktiva ämnen måste nå upp till minst 80 % för att kemikalien i fråga skulle få släppas ut på marknaden. Om 80 % eliminering inte uppnås, kan detta simuleringstest (bekräftande test) tillämpas, och det ytaktiva ämnet får endast släppas ut på marknaden förutsatt att mer än 90 % av kemikalien elimineras. Generellt gäller för kemikalier inte frågan om godkänt/ej godkänt, och värdet på den procentuella eliminering som erhållits kan användas i uppskattningsberäkningar av den sannolika miljökoncentration som kan användas vid farobedömning för kemikalier. I ett antal studier av rena kemikalier konstaterades att elimineringsprocenten för DOC var > 90 % i tre fjärdedelar av fallen och > 80 % i över 90 % av fallen för kemikalier som visade betydande grad av biologisk nedbrytbarhet.

REFERENSKEMIKALIER

13. För att säkerställa att försöksförfarandet genomförs korrekt är det lämpligt att med vissa mellanrum testa referenskemikalier med känt beteende. Sådana kemikalier är adipinsyra, 2-fenylfenol, 1-naftol, 2,2'-bifenyldikarboxylsyra och 1-naftoesyra.

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

14. Den relativa standardavvikelsen inom tester konstaterades i ett laboratorium i Storbritannien vara 3,5 % medan avvikelsen mellan test var 5 % (7).

▼M4

METODBESKRIVNING

Apparatur

Roterande rörformiga reaktorer

15. Apparaturen (se figur 1 och 2 i tillägg 8) består av en grupp akrylrör med en längd på 30,5 cm och innerdiameter på 5 cm per rör, stödda på hjul med hjulring av gummi inom en stödram av metall. Varje rör har på utsidan en läpp med ett djup på cirka 0,5 cm för att hålla röret på hjulen, innerytan är uppruggad med grov stålull och det finns en inre läpp med 0,5 cm djup vid övre ändan (inmatningsändan) för att hålla kvar vätskan. Rören har en horisontell lutning på cirka en grad för att få önskad kontakttid när testmediet appliceras i ett rent rör. De gummiklädda hjulens rotation drivs med en långsam motor med variabel hastighet. Rörets temperatur kontrolleras genom att det hålls i ett utrymme med konstant temperatur.

16. Genom att innesluta varje rörreaktor i ett aningen större rör med lock och säkerställa att anslutningarna är gastäta, kan utgående CO_2-gas samlas upp i en alkalisk lösning för efterföljande mätning (6).

17. För 24-timmarsmatning till varje teströr av organiskt medium med tillsatt testkemikalie, om tillämpligt, hålls mediet i ett 20-literskärl (A) (se figur 2). Om så krävs kan testkemikalielösningen doseras separat. Nära botten av varje lagringskärl finns ett utlopp som är kopplat med lämpliga rör, t.ex. av silikongummi, via en peristaltisk pump (B) till ett glas- eller akrylmatningsrör som går 2–4 cm in i den högre (inmatnings)ändan av det lutade röret (C). Utflödet får droppa ut från det lutade rörets lägre ända för uppsamling i ett annat lagringskärl (D). Utflödet sedimenteras eller filtreras före analys.

Filtreringsapparatur, centrifug

18. Utrustning för filtrering av prover med membranfilter av lämplig porstorlek (nominell öppningsdiameter 0,45 μm) som adsorberar organiska kemikalier eller har minimalt utsläpp av organiskt kol. Om filter som släpper ut organiskt kol används, tvätta filtren försiktigt med hett vatten för att avlägsna detta kol. Alternativt kan man använda en centrifug som når upp till 40 000 m/s^2.

19. Analytisk utrustning för bestämning av

— DOC/totalt organiskt kol (TOC) eller kemisk syreförbrukning (COD),

— specifik kemikalie (HPLC, GC osv.), om så krävs,

— pH, temperatur, surhet, alkalinitet,

— ammonium, nitrit och nitrat, om testerna genomförs under nitrifikationsförhållanden.

Vatten

20. Kranvatten med mindre än 3 mg/l DOC.

21. Destillerat eller avjoniserat vatten med mindre än 2 mg/l DOC.

▼M4

Organiskt medium

22. Syntetiskt avloppsvatten, avloppsvatten från hushåll eller en blandning av båda kan användas som organiskt medium. Det har visat sig att användning av enbart avloppsvatten från hushåll ofta ger ökad procentandel DOC-eliminering (i enheter för aktiverat slam) och t.o.m. möjliggör biologisk nedbrytning av vissa kemikalier som inte bryts ned när syntetiskt avloppsvatten enligt OECD används. Därför rekommenderas användning av avloppsvatten från hushåll. Mät DOC- eller COD-koncentrationen i varje ny sats av organiskt medium. Det organiska mediets surhet eller alkalinitet ska vara känd. Om mediet har låg surhet eller alkalinitet kan det krävas tillsats av lämplig buffert (natriumvätekarbonat eller kaliumvätefosfat) för att pH i reaktorn ska hållas kring 7,5 ± 0,5 under testet. Mängden buffert och tillsättningstidpunkten måste fastställas separat i varje enskilt fall.

Syntetiskt slam

23. Per liter kranvatten upplöses följande: 160 mg pepton, 110 mg köttextrakt, 30 mg urea, 28 mg vattenfritt dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4), 7 mg natriumklorid (NaCl), 4 mg kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$), och 2 mg magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_4SO_2{\cdot}7H_2O$). Detta syntetiska avloppsvatten enligt OECD är ett exempel, och ger en medelkoncentration på cirka 100 mg/l DOC i inflödet. Alternativt kan man använda andra sammansättningar med ungefär samma DOC-koncentration, som ligger närmare verkligt avloppsvatten. Detta syntetiska avloppsvatten kan göras i destillerat vatten i en koncentrerad form och förvaras i cirka 1 C upp till en vecka. Späd vid behov ut med kranvatten (detta medium är inte tillfredsställande, kvävekoncentrationen är t.ex. mycket hög och kolhalten relativt låg, men det finns inga bättre förslag utom att tillsätta mera fosfat som buffert samt extra pepton).

Avloppsvatten från hushåll

24. Använd färsk bottensats av avloppsvatten som samlas upp dagligen från reningsanläggningar som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Avloppsvattnet ska samlas upp från primärsedimenteringstankens överflödeskanal eller från matningen till aktivslamanläggningen, och det ska till övervägande del vara fritt från grova partiklar. Avloppsvattnet kan användas efter ett antal dagars lagring vid cirka 4 °C, om det går att påvisa att DOC (eller COD) inte har sjunkit betydligt (mindre än 20 %) under lagringen. För att undvika systemstörningar ska DOC (eller COD) i varje ny sats justeras före användningen till ett lämpligt konstant värde, t.ex. genom utspädning med kranvatten.

Smörjmedel

25. Glycerol eller olivolja kan användas för smörjning av den peristaltiska pumpens rullar; båda är lämpliga för användning på silikongummirör.

Stamlösningar av testkemikalien

26. För kemikalier med rimlig löslighet bereds stamlösningar med lämpliga koncentrationer (t.ex. 1–5 g/l) i avjoniserat vatten eller i mineraldelen av syntetiskt avloppsvatten. För olösliga kemikalier, se tillägg 5 till kapitel C.10 A. Denna metod är inte lämplig för flyktiga kemikalier utan modifiering av de rörformade reaktorerna (punkt 16). Bestäm DOC och TOC för stamlösningen och upprepa mätningarna för varje ny sats. Om skillnaden mellan DOC och TOC är större än 20 % bör testkemikaliens vattenlöslighet kontrolleras. Jämför testkemikaliens DOC eller koncentration uppmätt

▼M4

genom specifik analys av stamlösningen med det nominella värdet, för att kunna bedöma om utbytet är tillräckligt bra (i regel kan > 90 % förväntas). Särskilt för dispersioner bör man försäkra sig om att DOC kan användas som analytisk parameter; annars måste en analysteknik som är specifik för testkemikalien användas. För dispersioner krävs centrifugering av proverna. För varje ny sats bör mätning göras av DOC, COD eller testkemikalien med specifik analys.

27. Bestäm stamlösningens pH. Extremvärden tyder på att tillsats av kemikalien kan påverka pH-värdet för det aktiverade slammet i testsystemet. I så fall bör stamlösningen neutraliseras till pH 7 ± 0,5 med små mängder oorganisk syra eller bas, men utfällning av testkemikalien bör undvikas.

FÖRFARANDE

Förberedning av organiskt medium för dosering

28. Se till att alla inflödes- och utflödesbehållare samt rören från inflödeskärl och till utflödeskärl rengörs omsorgsfullt för att eliminera mikrobtillväxt initialt och under hela testet.

29. Förbered färskt syntetiskt avloppsvatten (punkt 23) varje dag, antingen från fasta ämnen eller från koncentrerad stamlösning genom lämplig utspädning med kranvatten. Mät upp den mängd som krävs i en cylinder och fyll på i ett rent inflödeskärl. Tillför vid behov också nödvändig mängd stamlösning av testkemikalie eller referenskemikalie till det syntetiska avloppsvattnet före utspädning. Om det är mera praktiskt eller nödvändigt för att undvika förlust av testkemikalien, förbered en separat utspädd lösning av testkemikalien i ett separat kärl och mata lösningen till de lutade rören via en skild doseringspump.

30. Alternativt (och helst) bör sedimenterat avloppsvatten från hushåll användas (punkt 24) som uppsamlats färskt varje dag, om möjligt.

Användning av de roterande rörformade reaktorerna

31. Två identiska rörformade reaktorer behövs för bedömning av en testkemikalie, och de monteras i ett utrymme med konstant temperatur, i regel 22 ± 2 °C.

32. Justera de peristaltiska pumparna på 250 ± 25 ml/tim organiskt medium (utan testkemikalie) till de lutade rören, som ska ha en rotation på 18 ± 2 rpm. Tillsätt smörjmedel (punkt 25) på pumpens rör (till en början och därefter regelbundet under testets gång) för att säkerställa korrekt funktion och förlänga rörens livslängd.

33. Justera rörens horisontella lutningsvinkel så att en uppehållstid på 125 ± 12,5 sekunder fås vid matning in i ett rent rör. Uppskatta retentionstiden genom att tillsätta en icke-biologisk markör (t.ex. NaCl, inert färgmedel) till matningen – den tid som krävs för att nå toppkoncentration i utflödet anses utgöra den genomsnittliga retentionstiden (när filmen är maximal kan retentionstiden öka till cirka 30 minuter).

34. Dessa parametrar har konstaterats ge adekvat eliminering (> 80 %) av DOC (eller COD) och producera nitrifierade utflöden. Flödeshastigheten bör ändras om elimineringen är otillräcklig eller om simuleringen gäller ett specifikt reningsverk. I det senare fallet bör doseringen av det organiska mediet justeras tills reaktorns prestanda är samma som för reningsverket.

▼M4

Inokulering

35. Luftburen inokulering kan räcka för att starta tillväxt av mikroorganismer när syntetiskt avloppsvatten används; om så inte sker, tillsätt 1 ml/l sedimenterat avloppsvatten till matningen under 3 dagar.

Mätningar

36. Kontrollera regelbundet att doseringen och roteringshastigheterna ligger inom satta gränser. Mät också utflödets pH, särskilt om nitrifikation förväntas.

Provtagning och analys

37. Metod, mönster och frekvens väljs enligt testets ändamål. Ta t.ex. stickprov av inflöde och utflöde eller ta prover över en längre period, t.ex. 3–6 veckor. Under den första perioden, utan testkemikalie, tas prover två gånger i veckan. Filtrera proverna genom membraner eller centrifugera dem vid cirka 40 000 m/s^2 i cirka 15 minuter (punkt 18). Det kan vara nödvändigt att sedimentera och/eller grovfiltrera proverna före membranfiltrering. Bestäm DOC (eller COD) minst i duplikat och om så krävs BOD, ammonium och nitrit/nitrat.

38. Alla analyser bör göras så snart som möjligt efter provtagning och beredning av proverna. Om analyser måste senareläggas bör proverna förvaras vid cirka 4 C i mörker i helt fyllda och tätt förslutna flaskor. Om proverna måste förvaras längre än 48 timmar bör de konserveras genom djupfrysning, syrabehandling eller genom tillsats av lämpligt gift (t.ex. 20 ml/l av en 10 g/l-lösning av kvicksilver(II) klorid). Se till att konserveringstekniken inte påverkar analysresultaten.

Inkörningsperiod

39. Under inkörningsperioden växer ytans biofilm till optimal tjocklek, vilket i regel tar cirka 2 veckor men inte får överskrida 6 veckor. Elimineringen (punkt 44) av DOC (eller COD) ökar och når platåvärde. När platåvärdet har nått samma nivå i båda rören, väljs ena röret till kontrollrör för återstoden av testet, under vilken rören bör fungera på ett enhetligt sätt.

Tillsättning av testkemikalie

40. I detta skede tillsätts testkemikalie till den andra reaktorn i lämplig koncentration, i regel 10–20 mg C/l. Kontrollreaktorn matas fortsättningsvis endast med organiskt medium.

Acklimatiseringsperiod

41. Fortsätt med analyserna av DOC (eller COD) två gånger i veckan och om även primär bionedbrytbarhet ska bedömas, ska även en mätning av testkemikaliens koncentration göras genom specifik analys. Låt acklimatiseringen pågå i 1–6 veckor (eller under speciella omständigheter längre) efter att testkemikalien tillsatts för första gången. När den procentuella elimineringen (punkterna 43–45) når ett maximivärde bestäms 12–15 giltiga värden från platåfasen över cirka 3 veckor för utvärdering av genomsnittlig procentuell eliminering. Testet anses vara slutfört när en tillräckligt hög grad av eliminering nås. Normalt ska testet inte pågå längre än 12 veckor från första tillsättning av testkemikalien.

▼M4

Ömsning av film

42. Plötsligt avlägsnande av stora mängder överskottsfilm från rören (”ömsning”), sker med relativt regelbundna intervall. För att säkerställa att resultatens jämförbarhet inte påverkas bör testet täcka minst två fulla cykler av tillväxt och ömsning.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

43. Beräkna procentandelen DOC- eller COD-eliminering av testkemikalie för varje bedömningstidpunkt genom följande ekvation:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

där

D_t = procentuell eliminering av DOC (eller COD) vid tidpunkten t,

C_s = koncentrationen DOC (eller COD) som kan tillskrivas testkemikalien, helst uppskattad utifrån stamlösningens koncentration och tillsatt volym (mg/l),

E = uppmätt DOC (eller COD) i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l),

E_o = uppmätt DOC (eller COD) i kontrollutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

Upprepa beräkningen för referenskemikalien, om sådan testas.

Kontrollreaktorns funktion

44. Graden av DOC- eller COD-eliminering (D_B) i det organiska mediet i kontrollenheten bidrar till bedömningen av den biologiska nedbrytningsaktiviteten i biofilmen under testet. Den procentuella elimineringen kan beräknas genom följande ekvation:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

där

C_m = DOC (eller COD) i det organiska mediet i kontrollenhetens inflöde (mg/l).

45. Elimineringen av testkemikalie (D_{ST}) kan beräknas om den har uppmätts med en specifik analysmetod vid varje bedömningstidpunkt, genom följande ekvation:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

där

S_i = uppmätt eller helst uppskattad koncentration av testkemikalien i testinflödet (mg/l),

S_e = uppmätt koncentration av testkemikalien i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

▼M4

Om den analytiska metoden ger ett positivt värde i oförändrat avloppsvatten ekvivalent med S_c mg/l, kan den procentuella elimineringen (D_{SC}) beräknas genom följande:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\ \%$$

Presentation av testresultat

46. Plotta den procentuella elimineringen D_t och D_{ST} (eller D_{SC}), om tillgänglig, mot tiden (se tillägg 2 till kapitel C.10 A). Beräkna medelvärdet (uttryckt i nästa heltal) och standardavvikelsen för de 12–15 värden för D_T (och D_{ST} om tillgängligt) som erhållits för platåfasen, som procentandelen eliminering av testkemikalien. Elimineringskurvans form kan ge underlag för vissa slutsatser om elimineringsprocessen.

Adsorption

47. Om kraftig DOC-eliminering observeras från början av testet, är det sannolikt att testkemikalien elimineras genom adsorption på biofilmen. Detta kan eventuellt påvisas genom att bestämma mängden testkemikalie som adsorberas på fasta ämnen som lossnat från filmen. Det är inte vanligt att elimineringen av DOC för adsorberbara kemikalier förblir kraftig genom hela testet; eliminering är i regel kraftig i början för att sedan gradvis minska till ett jämviktsvärde. Om däremot den adsorberade testkemikalien på ett eller annat sätt kan orsaka acklimatisering av den mikrobiella populationen, stiger testkemikaliens DOC-eliminering därefter och når ett högt platåvärde.

Lagfas

48. På samma sätt som vid statiska screeningtest, kräver många testkemikalier en lagfas innan full biologisk nedbrytning inträffar. Under lagfasen sker acklimatisering eller anpassning av de kompetenta bakterierna praktiskt taget utan eliminering av testkemikalien vid bakterietillväxtens inledande skede. Denna fas upphör och nedbrytningsfasen anses börja när cirka 10 % av den inledande mängden testkemikalie har eliminerats (efter att adsorption har fått ske, i förekommande fall). Lagfasen är ofta mycket varierande och svår att reproducera.

Platåfas

49. Platåfasen i en elimineringskurva för ett kontinuerligt test definieras som den fas då maximal nedbrytning sker. Platåfasen bör pågå minst 3 veckor och ska ge cirka 12–15 uppmätta giltiga värden.

Genomsnittlig elimineringsgrad för testkemikalien

50. Beräkna medelvärdet utifrån testkemikaliens elimineringsvärden D_t (och D_{st}) under platåfasen. Avrundat till närmaste heltal (i %) är detta testkemikaliens elimineringsgrad. Dessutom rekommenderas en beräkning av medelvärdets 95 % konfidensintervall. Beräkna på samma sätt genomsnittlig eliminering (D_B) av det organiska mediet i kontrollkärlet.

▼M4

Indikation på biologisk nedbrytning

51. Om testkemikalien inte adsorberas i betydlig grad på biofilmen och elimineringskurvan har den typiska formen för en biologisk nedbrytningskurva med lagfas, kan nedbrytnings- och platåfaserna (punkterna 48, 49) med säkerhet tillskrivas biologisk nedbrytning. Om det har förekommit stark inledande eliminering kan simulationstestet inte användas för att skilja mellan biologiska och abiotiska elimineringsprocesser. I sådana fall, och i andra fall där det kan finnas tvivel om biologisk nedbrytning (t.ex. vid strippning), bör en analys göras rörande adsorberad testkemikalie eller ytterligare (screening)test för biologisk nedbrytning genomföras på grundval av parametrar som klart indikerar biologiska processer. Sådana test är syreupptagningsmetoder (kapitel C.4 i denna bilaga D, E och F (9)) eller test med mätning av koldioxidproduktion (kapitel C.4 C i denna bilaga) eller Headspace-metoden (10); som inokulat används förhandsexponerad biofilm från lämplig reaktor.

52. Om både DOC-eliminering och eliminering av specifik kemikalie har uppmätts och det finns betydande skillnader mellan elimineringsgraderna (DOC-elimineringen är lägre), tyder detta på att utflödena innehåller intermediära organiska produkter som kan vara svårare att bryta ned och som måste undersökas.

Testresultatens giltighet

53. Testet kan anses vara giltigt om graden av DOC- eller COD-eliminering (D_B) i kontrollenheten är > 80 % efter 2 veckor och inget ovanligt har observerats.

54. Om en lätt biologiskt nedbrytbar (referens)kemikalie har testats, bör graden av biologisk nedbrytbarhet vara > 90 % och skillnaden mellan duplikatvärden får inte vara större än 5 %. Om dessa två kriterier inte uppfylls bör försöksförfarandena ses över och/eller avloppsvatten från hushåll tas från en annan källa.

55. Likaså gäller att skillnader mellan bionedbrytningsvärden från duplikatenheter (om sådana används) för behandling av testkemikalie inte får avvika med mer än 5 %. Om detta kriterium inte uppfylls men elimineringen är stark, bör analysen fortsätta i ytterligare tre veckor. Om elimineringen är svag bör testkemikaliens inhiberande effekter undersökas, om de inte är kända, och testet upprepas med en lägre koncentration testkemikalie, om detta är genomförbart.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Identifieringsdata.

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalkemiska egenskaper.

Testbetingelser:

— Eventuella modifieringar av testsystemet, särskilt vid testning av olösliga eller flyktiga kemikalier.

— Typ av organiskt medium.

— Andel och egenskaper hos industriellt avfall i avloppsvattnet, om sådant ingår, och om kända.

— Inokuleringsmetod.

▼M4

— Stamlösningens DOC (upplöst organiskt kol) och TOC (totalt organiskt kol), i förekommande fall beredningssätt för suspension, använda testkoncentrationer, motivering för koncentrationer utanför intervallet 10–20 mg/l DOC, tillsättningsmetod, datum för första tillsättning, eventuella koncentrationsändringar.

— Genomsnittlig hydraulisk retentionstid (utan tillväxt), rörets rotationshastighet, ungefärlig lutningsvinkel, om möjligt.

— Uppgifter om lossning (ömsning), tid och intensitet.

— Testtemperatur och temperaturområde.

— Analystekniker som använts.

Testresultat:

— Alla uppmätta data (DOC, COD), specifika analyser, pH, temperatur, kvävekemikalier, om relevant.

— Alla beräknade värden för D_t (eller D_{tc}), D_B och D_{St} i tabellform samt elimineringskurvor.

— Information om lag- och platåfaserna, testets tidslängd, elimineringsgrad för testkemikalien och referenskemikalien (om testad) och för det organiska mediet (i kontrollenheten), tillsammans med statistiska data och utlåtanden om biologisk nedbrytbarhet och testets giltighet.

— Diskussion om resultaten.

LITTERATUR

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980), ”Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test”, *Wat. Res.* 14, s. 753–758.

(2) Truesdale G. A., Jones K., Vandyke K. G. (1959), ”Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material”, *Wat. Waste Tr. J.* 7, s. 441–444.

(3) Baumann U., Kuhn G. och Benz M. (1998), ”Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten”, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox*, 10, s. 214–220.

(4) Gloyna E. F., Comstock R. F., Renn C. E. (1952), ”Rotary tubes as experimental trickling filters”, *Sewage ind. Waste* 24, s. 1355–1357.

(5) Kumke G. W., Renn C.E. (1966), ”LAS removal across an institutional trickling filter”, *JAOCS* 43, s. 92–94.

(6) Tomlinson T. G., Snaddon D. H. M., (1966), ”Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms”, *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10, s. 865–881.

(7) Her Majesty’s Stationery Office (1982), ”Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability”, 1981, London.

(8) Her Majesty’s Stationery Office (1984), ”Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes”, 1982, London.

(9) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet A–F.

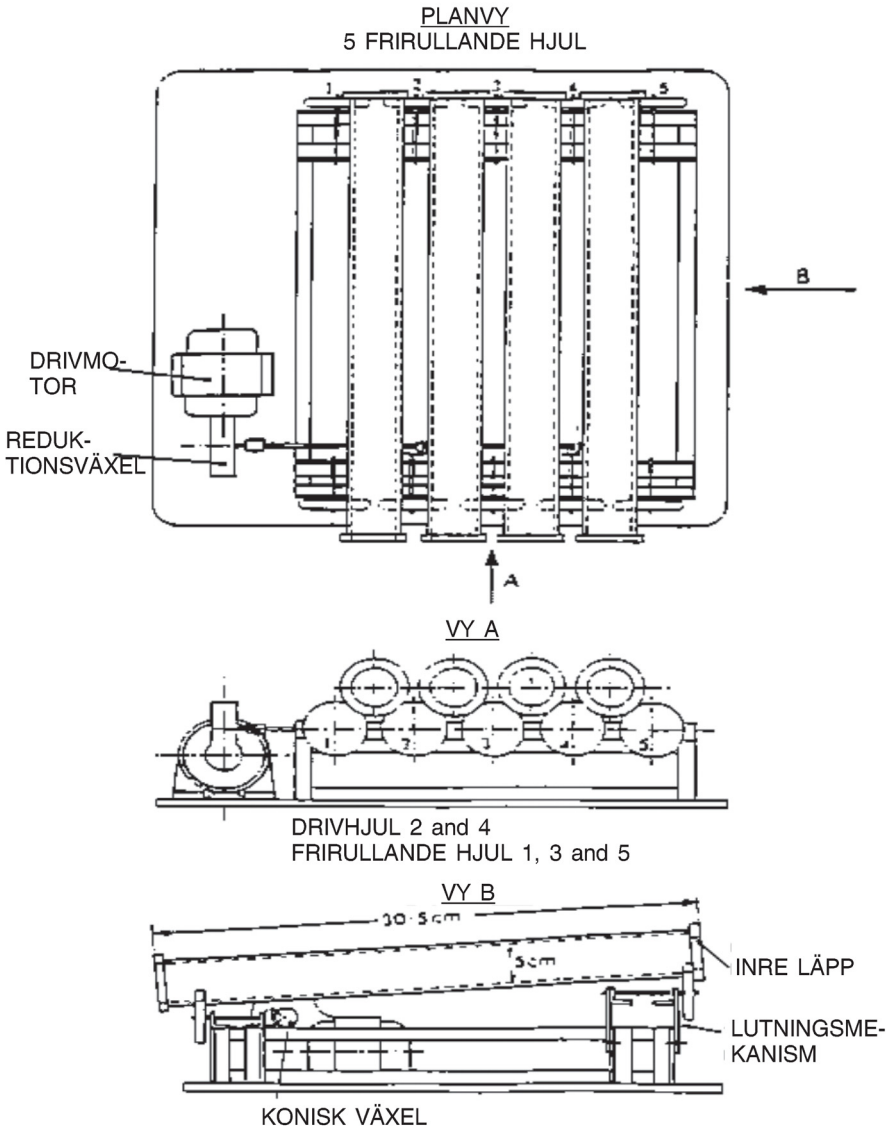
(10) ISO 14593 (1998), *Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels*.

▼**M4**

Tillägg 8

Figur 1

Roterande rör



Ordlista:

Planvy

Vy A/B

Drivhjul

Frirullande hjul

Drivmotor

Reduktionsväxel

Inre läpp

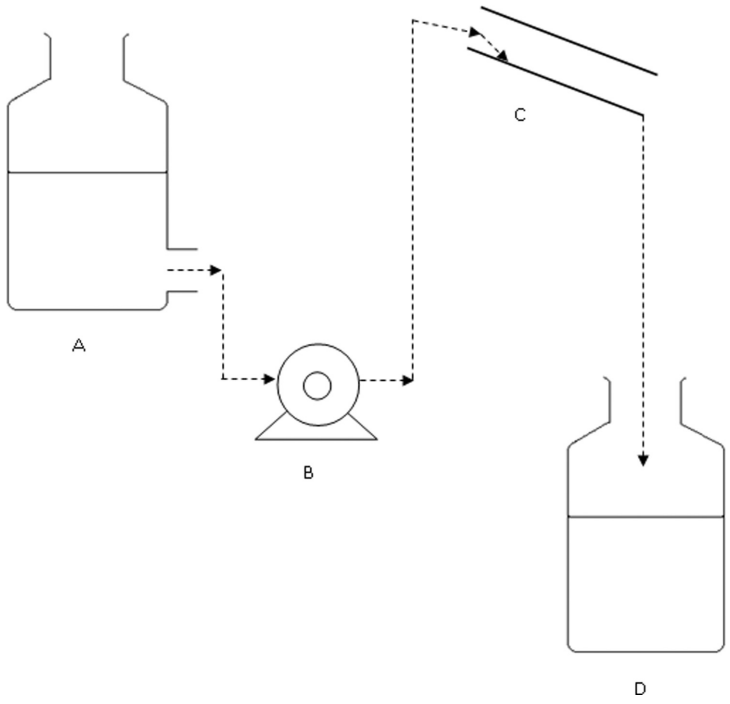
Lutningsmekanism

Konisk växel

▼**M4**

Figur 2

Flödesschema



A: Matningskärl

B: Peristaltisk pump

C: Roterande rör

D: Uppsamlingskärl för utflöde

DEFINITIONER

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

kemikalier: termen kemikalie används i vid bemärkelse i Unced-avtal (Unced, United Nations Conference on the Environment and Development, dvs. Förenta nationernas konferens om miljö och utveckling) och i dokument som grundar sig på dessa, och termen omfattar ämnen, produkter, blandningar, beredningar eller motsvarande som kan användas i befintliga system.

▼B

C.11 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 ska användas vid huvudtestet.

1 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 grand 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.

▼B

För att beräkna ett testämnes hämmande verkan i en bestämd koncentration uttrycks respirationshastigheten som en procentdel av genomsnittet av de två kontrollrespirationshastigheterna.

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{ \% procentuellhämning}$$

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.

▼B

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 ska 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,

— 1 1 g 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 ska 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 ska 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.

1 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.

▼B

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 beskrivna 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).

▼B

Testkärlen ska 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 x 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 ska 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 for EC_{50}-värdena kan bestämmas genom standardförfaranden.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska 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 atypiska hämningskurvor. Sådana kurvor måste därför tolkas med försiktighet.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. International Standard ISO 8192 – 1986.

2. Broecker, B. och Zahn, R. (1977), *Water Research* 11, s. 165.

3. Brown, D., Hitz, H. R. och Schaefer, L. (1981), *Chemosphere* 10, s. 245.

4. ETAD (Ecological and Toxicological Association and Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103,* även beskriven av:

5. B. Robra (1976), *Wasser/Abwasser* 117, s. 80.

6. W. Schaefer (1977), *Textilveredlung* 6, s. 247.

7. OECD (1981), *Test Guideline 209,* rådets beslut K(81) 30 slutlig.

▼B

C.12 BIOLOGISK NEDBRYTBARHET

MODIFIERAT SCAS-TEST

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att bedöma den potentiella fullständiga bionedbrytbarheten av vattenlösliga, icke-flyktiga organiska ämnen när dessa utsätts för relativt höga koncentrationer av mikroorganismer under en längre perioder. Under denna period hålls mikroorganismerna vid liv genom daglig tillförsel av näring bestående av bottensatsen av spillvatten. (I samband med helgen kan spillvattnet förvaras vid 4 ºC. Alternativt kan det syntetiska spillvattnet till OECD Confirmatory test användas.)

Fysikalisk-kemisk adsorbtion kan inträffa på de suspenderade fasta ämnena, vilket man måste ta hänsyn till vid tolkningen av resultaten (se 3.2).

Till följd av den flytande fasens långa uppehållstid (36 timmar), och den med mellanrum tillförda näringen, simulerar testet inte de normala villkoren i en spillvattenanläggning. De resultat som uppnås med olika testämnen visar att denna metod har en hög bionedbrytningspotential.

De förhållanden som skapas i denna metod underlättar i hög grad val och/eller adaption av mikroorganismer som är i stånd till att bryta ned testämnet. (Detta förfarande kan dessutom användas för att framställa acklimatiserade inokulat för användning i andra test.)

I detta test bedöms testämnenas fullständiga bionedbrytbarhet genom mätning av koncentrationen av upplöst organiskt kol (DOC). Koncentrationen av DOC bör hellre bestämmas efter upprensning av den sura lösningen än som skillnaden mellan total C och oorganiskt C.

Vid samtidig användning av en specifik analysmetod kan testämnet primära nedbrytbarhet (nedbrytning av en ursprunglig kemisk förbindelse) bedömas.

Denna metod kan endast användas på organiska testämnen som vid den i analysen använda koncentrationen

— är lösliga i vatten,

— har ett obetydligt ångtryck,

— inte hämmar bakterierna,

— inte absorberas väsentligt i testsystemet,

— inte förloras genom att testämnet skummar.

Testämnet innehåll av organiskt kol ska vara känt.

▼B

Upplysningar om de relativa mängder av testämnets huvudbeståndsdelar kan vara till h)älp vid tolkningen av de uppnådda resultaten, särskilt när resultaten är låga eller marginella.

Upplysningar om ämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara användbar vid tolkningen av låga resultat och vid valet av en lämplig testkoncentration.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

C_T = Koncentration av organiskt kol i testämnet, i närvaro eller frånvaro av bottensats av spillvatten i början av luftningsperioden (mg/l).

C_t = Koncentrationen av upplöst organiskt kol i den överstående vätskan vid avslutningen av luftningsperioden (mg/l).

C_c = Koncentrationen av upplöst organiskt kol i kontrollens överstående vätska vid avslutning av luftningsperioden (mg/l).

Bionedbrytbarheten definieras i detta test som förlusten av organiskt kol. Bionedbrytningen kan uttryckas som:

1. Den procentuella förlusten av D_{da} av den mängd ämne som tillförs dagligen:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

där:

D_{da} = nedbrytning/daglig tillförsel.

2. Den procentuella förlusten av D_{ssd} av den mängd somm finns närvarande vid varje dags början:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

där:

D_{ssd} = nedbrytning/ämne vid dagens början.

Indexen i och (i + 1) hänvisar till testdagen.

Utjämning 2(a) rekommenderas om spillvattnets innehåll av upplöst organiskt kol varierar från dag till dag medan utjämning 2(b) kan användas när mängden av upplöst organiskt kol är förhållandevis konstant från dag till dag.

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

I vissa fall kan referensämnen vara användbara vid undersökning av ett nytt ämne. Ett bestämt referensämne kan dock inte rekommenderas.

Upplysningar om flera olika ämnen som är utvärderade i ringtester tillhandahålls (se tillägg 1) först och främst för att testmoden av och till kan kalibreras, men också för att resultaten kan jämföras om en annan metod används.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Aktiverat slam från ett biologiskt reningsverk placeras i en semikontinuerlig slamenhet (SCAS = semi-continous activated sludge). Testämnet och bottensatsen av spillvatten från hushåll tillförs och blandningen luftas i 23 timmar. Luftningen stoppas sedan och slammet ges tid att sätta sig och överstående vätska kasseras.

I det slam som finns kvar i luftningskammaren blandas sedan en ytterligare passande mängd av testämnet, varefter cykeln upprepas.

Bionedbrytning konstateras genom bestämning av innehållet av upplöst organiskt kol i överstående vätska. Detta resultat jämförs med resultaten från analysen av vätskan från en kontrollenhet, som endast tillförts bottensats av spillvatten.

Om en specifik analysmetod används kan änderingar av koncentrationen av den ursprungliga ämnet till följd av bionedbrytning mätas (primär bionedbrytbarhet).

1.5 KVALITETSKRITERIER

Denna metods reproducerbarhet, grundad på förlust av upplöst organiskt kol, är ännu inte fastställd. (I fråga om primär bionedbrytning har mycket tillfredsställande data uppnåtts för lätt ned-brytliga ämnen.)

Metodens känslighet är avhängig i vilken utsträckning variabiliteten i blindproven och i mindre grad av den korrekthet med vilken innehållet av upplöst organiskt kol kan bestämmas, eller av vätskans innehåll av testämne vid inledningen av varje enskild cykel.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 *Förberedelse*

Ett tillräckligt antal rena luftningsenheter, alternativt kan den ursprungliga 1,5 liters SCA-testenheten användas, och lufttillförselslangar (figur 1) för varje enskild testämne och till kontrollen sätts ihop. Den komprimerade luft som tillförs testenheterna rensas med ett vaddfilter och bör vara fri från organiskt kol och vara mättat med vatten för att minska ångförlust.

Ett prov av blandad vätska, innehållande 1–4 g suspenderat fast ämne/l, tas från en aktiverad slamanläggning. Cirka 150 ml av den blandade vätskan krävs för varje luftenhet.

▼B

Stamlösningar av testämnet framställs i destillerat vatten. Normalt krävs en koncentration av 400 mg organiskt kol per liter, vilket ger en koncentration av testämnet av 20 mg/l vid inledningen av varje luftningscykel, såvida inte bionedbrytning inträffar.

Högre koncentrationer kan användas om toxiciteten för mikroorganismer tillåter detta.

Slamlösningarnas innehåll av organiskt kol mäts.

1.6.2 *Testbetingelser*

Testet bör utföras vid 20–25 °C.

En hög koncentration av aeroba mikroorganismer (1–4 g suspenderad fast ämne per liter) används, och den effektiva uppehållstiden är 36 timmar. Det kolämneinnehållande materialet i det tillförda spillvattnet oxideras grundligt, normalt inom åtta timmar efter inledning av varje enskild luftningscykel. Därefter respirerar slammet endogent under resten av luftningsperioden, under vilken det enda tillgängliga substratet är testämnet, om inte också detta metaboliseras snabbt. Dessa förhållanden, kombinerade med daglig återinokulation av proven när spillvatten från hushåll används som medium, ger mycket goda förhållanden för såväl acklimatisering som en hög grad av bionedbrytning.

1.6.3 *Genomförande av testet*

Man framställer ett prov av blandad vätska från en laboratorieenhet som övervägande behandlar spillvatten från hushåll eller från en lämplig aktiverad slamanläggning, varvid proven förvaras under aeroba förhållanden tills de används i laboratoriet. Varje luftningsenhet samt kontrollenheten fylls på med 150 ml (om det ursprungliga SCAS-testet används multipliceras de angivna volymerna med 10) blandad vätska, och luftning inleds. Efter 23 timmar stoppas luftningen och slammet får sätta sig i 45 minuter. Hanen på varje kolv öppnas successivt och 100 ml överstående vätska uttas. Ett prov av bottensatsen av spillvatten från hushåll tas omedelbart före användning och 100 ml av detta tillsätts det resterande slammet i varje luftningsenhet. Luftningen inleds på nytt. På detta stadium tillsätts inget testämne. Enheterna tillsätts dagligen spillvatten från hushåll men endast upp till den tidpunkt utfällningen resulterar i en klar överstående vätska. Detta tar normalt upp till två veckor, varefter det upplösta organiska kolet i den överstående vätskan vid avslutningen av varje luftningscykel närmar sig ett konstant värde.

Vid avslutningen av denna tidsperiod blandas de olika bottensatserna av slamproverna och 50 ml av detta blandade slamprov tillsätts till varje enhet.

95 ml bottensats av spillvatten och 5 ml vatten tillsätts till kontrollenheterna, och 95 ml av bottensatsen av spillvattnet plus 5 ml av den ifrågavarande stamlösningen av testämnet (400 mg/l) till testenheterna. Luftningen påbörjas på nytt och fortsätter i 23 timmar. Slammet sätter sig i 45 minuter och överstående vätska avlägsnas och analyseras för upplöst organiskt kol.

Ovanstående påfyllnings- och avtappningsförfarande upprepas dagligen under hela testet.

▼B

Innan utfällning kan det vara nödvändigt att tvätta enheternas väggar för att förhindra ackumulering av fasta ämnen över vätskenivån. Lör att undvika korskontaminering används en separat skrapa eller borste för varje enskild enhet.

Idealt bör innehållet av upplöst organiskt kol i överstående vätskor bestämmas dagligen, även om mindre regellbundna analyser kan tillåtas. Före analysen filtreras vätskorna genom tvättade membranfilter med en porstorlek av 0,45 μm, eller så centritugeras vätskorna. Membranfilter är lämpliga om det är fastställt att de varken avger kolämne eller adsorberar ämnet under filtrering. Provens temperatur får inte översiga 40 °C så länge det är i centrifugen.

Testens varaktighet är obestämd för ämnen som uppvisar obetydlig eller ingen bionedbrytning. Erfarenheten visar att detta bor vara minst tolv veckor, men inte längre än 26 veckor.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Värdena för innehållet av upplöst organiskt kol i de överstående vätskorna i kontrollenheten avbildas mot tiden i ett koordinatsystem.

Efterhand som bionedbrytning sker närmare sig nivån i testenheten nivån i kontrollenheten. När skillnaden mellan de två nivåerna är konstant vid tre på varandra följande mätningar genomförs ett tillräckligt stort antal ytterligare mätningar för en statistisk behandling av data, och den procentuella bionedbrytningen av testämnet beräknas (D_{da} eller D_{ssd}, se 1.2).

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande:

— Fullständiga uppgifter om slag av spillvatten, om vilken typ av enhet som har använts samt om försöksresultaten rörande testämnet, ett eventuellt referensämne, och blindproven.

— Temperatur.

— Kurva för förlusten av organiskt kol, med beskrivning av beräkningsmetoden (se 1.2).

— Datum och plats för provtagning av aktiverat slam och spillvatten, status angående adaption, koncentration, osv.

— Vetenskapliga motiveringar för eventuella ändringar av testförfarandet.

— Underskrift och datum.

▼B

3.2 TOLKNING AV RESULTAT

Eftersom det ämne som kan testas med denna metod inte kommer att vara lätt bionedbrytligt kommer förlusten av organiskt kol, som uteslutande beror på bionedbrytning, normalt att ske gradvis över dagar eller veckor, undantaget sådana fall där acklimatiseringen är plötslig, vilket framgår av en abrupt förslut efter några veckor.

Fysikalisk-kemisk adsorbtion kan emellertid i vissa fall spela en betydande roll. Detta är fallet när det vid inledningen inträder ett fullständigt eller ett delvist försvinnande av det tillsatta upplösta organiska kolet. Vad som därefter inträffar beror på olika faktorer, såsom adsorptionsgraden och koncentrationen av suspenderat fast ämne i det kasserade spillvattnet. Skillnaden mellan koncentrationen av upplöst organiskt kol i kontroll- och testenheternas överstående vätska ökar normalt gradvis från det först inträffade värdet, och denna skillnad förblir sedan vid det nya värdet under resten av testet, såvida inte acklimatisering sker.

När man ska skilja mellan bionedbrytning (eller delvis bionedbrytning) och adsorption krävs ytterligare analyser. Detta kan göras på flera sätt, men den mest pålitliga metoden är att använda överstående vätska, eller slam, som inokulat i en basistest (helst ett respirometiskt test).

Testämnen som resulterar i ett omfattande, icke-adsorptivt försvinnande av upplöst organiskt kol bör i denna test betraktas som potentiellt bionedbrytbara. Delvist icke-adsorptivt försvinnande tyder på att ämnet i varje fall är bionedbrytbart till viss grad.

Obetydligt eller inget försvinnande av upplöst organiskt kol kan bero på testämnets hämning av mikroorganismer. Detta kan också avslöja lysis och förlust av slam vilket ger oklara överstående vätskor. Testet bör i sådana fall göras om med användning av en lägre koncentration av testämnet.

Användning av en specifik analysmetod eller C-14-markerat testämne kan ge större känslighet. Om ett C-14-testämne används kommer återhämtning av $^{14}CO_2$ att bekräfta att bionedbrytning inträffat.

Om det dessutom anges resultat för primär bionedbrytning bör det om möjligt ges en förklaring på den förändring av den kemiska strukturern som medför att det ursprungliga testämnet inte kan påvisas.

Valideringen av analysmetoden ska anges tillsammans med värdena för blindprovmediet.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (1981), *Test Guideline 302 A,* rådets beslut K(81) 30 slutlig.

▼B

Tillägg 1

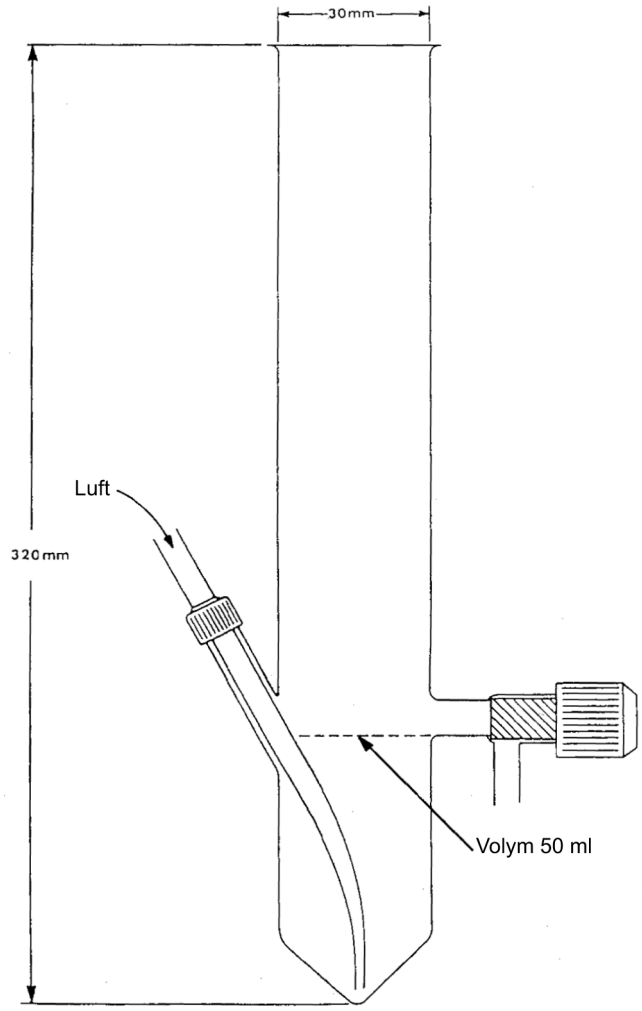
SCAS-test: Exempel på resultat

Ämne	c_T (mg/l)	C_t- C_c (mg/l)	Procent bioned-brytning	Testets längd (dagar)
4-acetylaminobensulfonat	17,2	2,0	85,0	40
Tetrapropylenbenzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyklopentantetrakavoxylat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Tillägg 2

Exempel på apparatur



▼B

C.13 **BIOKONCENTRATION: GENOMFLÖDESPROVNING MED FISK**

1. **METOD**

Denna biokoncentrationsmetod är en kopia av OECD TG 305 (1996).

1.1 INLEDNING

Denna metod beskriver en procedur för karakterisering av potentialen för biokoncentration av ämnen i fisk vid genomflöde. Även om genomflödesprov är att föredra, kan halvstatiska metoder tillåtas, förutsatt att giltighetskriterierna uppfylls.

Metoden ger tillräckliga upplysningar för genomförandet av provet, samtidigt som den ger lämplig frihet för experimentell utformning av förhållandena i vissa laboratorier och varierande karakteristik för de undersökta ämnena. Metoden gäller framför allt för stabila organiska kemikalier med värden på log P_{ow} mellan 1,5 och 6,0 (1) men kan även gälla för superlipofila ämnen (med log P_{ow} större än 6,0). Förbedömningen av biokoncentrationsfaktorn (BCF) ibland benämnd K_B för sådana superlipofila ämnen kommer sannolikt att vara högre än den biokoncentrationsfaktor vid stabilt tillstånd (BCF_{SS}) som kan förväntas fås vid laboratorieexperiment. Uppskattningar av biokoncentrationsfaktorn för organiska kemikalier med värden för log P_{ow} upp till ungefär 9,0 kan fås med Bintein-ekvationen vid al (2). De parametrar som karakteriserar biokoncentrationspotentialen inkluderar upptagningskonstanten (k_1), utsöndringskonstanten (k_2) och BCF_{SS}.

Radioaktiv märkning av de ämnen som ska undersökas kan underlätta analysen av vatten- och fiskprover och kan användas för att fastställa huruvida degraderingsidentifiering och kvantifiering ska göras. Om den totala radioaktiva resten mäts (t.ex. genom förbränning eller vävnadsupplösning), grundas BCF på huvudblandningen, eventuella kvarvarande metaboliter och assimilerat kol. BCF-värden grundade på de totala radioaktiva resterna kan därför inte jämföras direkt med ett BCF från specifika analyser av enbart huvudblandningen.

Rengöringsprocedurer kan användas i undersökningar där radioaktiv märkning förekommer, för fastställande av BCF grundat på huvudblandningen, och de större metaboliterna kan vid behov karakteriseras. Det är också möjligt att kombinera en fiskmetabolismstudie med en biokoncentrationsstudie genom analys och identifiering av vävnadsrester.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Biokoncenrationen/bioackumulationen är ökningen av koncentrationen av det undersökta ämnet i eller på en organism (specificerad vävnad därav) i förhållande till koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium.

Biokoncentrationsfaktorn (BCF eller K_B) vid varje tidpunkt under upptagningsfasen av ackumulationsprovet är det undersökta ämnets koncentration i/på fisken eller den specificerade vävnaden därav (C, i *µg/g* (ppm)), dividerat med det kemiska ämnets koncentration i omgivande medium (C_a som µg/ml (ppm)).

▼B

Den stabila biokoncentrationsfaktorn (BCF_{SS} eller K_B) genomgår ingen väsentlig förändring under en längre tidsperiod, om koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium är konstant under denna tidsperiod.

Plattån eller stabiliteten nås när mängden undersökt ämne i fisk (C_f) i den tidpunkt där kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande C_f-analyser, på prover tagna med intervaller på minst två dagar, ligger inom ± 20 % på de tre proverna och det inte är några betydande skillnader mellan de tre provningsperioderna. När kombinerade prover analyseras krävs minst fyra på varandra följande analyser. När de undersökta ämnena tas upp långsamt bör provtagningsintervallerna vara sju dagar.

Biokoncentrationsfaktor som beräknas direkt från förhållandet mellan kinetiska konstanter (k_1/k_2) kallas kin etisk koncentrationsfaktor, BCF_k.

Fördelningskoeficienten oktanol/vatten (P_{ow}) är förhållandet då det kemiska ämnet lösbarhet i n-oktanol och vatten nar balans (metod A.8), också uttryckt som K_{ow}. Logaritmen för P_{ow} används som en indikering på det kemiska ämnets potential för biokoncentration i vattenorganismer.

Exponerings- eller upptagningsfasen är den tid under vilken fisken exponeras för det undersökta ämnet.

Konstanten för upptagningsförhållandet (K_1) är det numeriska värde som definierar ökningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i/på den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav, när fisken exponeras för nämnda kemiska ämne (k_1 uttrycks som dag^{-1}).

Efterexponerings- eller utsöndringsfasen (förlustfasen) är den period, efter det att den undersökta fisken flyttats från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne, under vilken utsöndringen (eller nettoförlusten) av det aktuella ämnet från den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav studeras.

Utsöndrings-konstanten (förlustkonstanten) (k_2) är det numeriska värdet för minskningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i den undersökta fisken eller i specificerad vävnad därav, efter överföring av den undersökta fisken från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne (k_2 uttrycks som dag^{-1}).

1.3 PROVNINGSMETODEN

Provet består av två faser: exponerings-(upptagnings-)fasen och efterexponerings-(utsöndrings-)fasen. Under upptagningsfasen exponeras separata grupper av en fiskart för minst två koncentrationer av det undersökta ämnet. Fiskarna överförs därefter till ett medium fritt från det undersökta ämnet för utsöndringsfasen. Utsöndringsfas krävs alltid med mindre ämnesupptagningen under upptagningsfasen varit obetydlig, t.ex. om BCF är mindre än 10. Koncentrationen av det undersökta ämnet i/på fisken eller specificerad vävnad därav ska följas under de bägge provningsfaserna. Utöver de två provningskoncentrationerna ska en kontrollgrupp fiskar hållas under identiska förhållanden, förutom frånvaron av det undersökta ämnet, för att kunna jämföra eventuella negativa effekter i biokoncentrationsprovet mot en jämförbar kontrollgrupp och för att få bakgrundskoncentrationen av det undersökta ämnet.

▼B

Upptagningsfasen sträcker sig över 28 dagar, med mindre det kan visas att balans nås tidigare. Beräkning av upptagningsfasens längd fram till stabilitet kan göras med den ekvation som visas i bilaga 3. Utsöndringsperioden inleds därmed genom överföring av fisken till samma medium, men utan det undersökta ämnet, i ett annat rent kärl. När så är möjligt ska biokoncentrationsfaktorn beräknas helst både som koncentrationsförhållandet (BCF_{SS}) i fisken (C_f) och i vattnet (C_w) vid uppenbar stabilitet och som en kinetisk biokoncentrationsfaktor, BCF_K, som förhållandet mellan konstanterna för upptagningshastigheten (k_1) och utsöndringen (k_2), varvid första ordningens kinetik ska förutsättas. Om första ordningens kinetik uppenbarligen inte följs, ska mer komplexa modeller tillämpas (se bilaga 5).

Om stabilitet inte uppnås inom 28 dagar ska upptagningsfasen förlängas tills stabilitet nås eller till 60 dagar, beroende på vilket som inträffar först, varefter utsöndringsfasen påbörjas.

Konstanten för upptagningshastigheten, konstanten för utsöndringshastigheten (eller konstanterna om mer komplexa modeller används), biokoncentrationsfaktorn och när så är möjligt tillförlitlighetsgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas med den modell som bäst beskriver den uppmätta koncentrationen av det undersökta ämnet i fisken och vattnet.

BCF uttrycks som en funktion av fiskens totala, våta vikt. I specialfall kan emellertid specificerade vävnader eller organ, som t.ex. muskler, lever osv. användas, om fisken är tillräckligt stor eller den kan delas upp i ätbara (filé) och icke ätbara (inälvor) delar. Eftersom det för många organiska ämnen föreligger ett klart samband mellan potentialen för biokoncentrationen och fettupptagningsförmågan, finns det också ett motsvarande förhållande för fettinnehållet i den undersökta fisken och observerade biokoncentrationen av sådana ämnen. För att minska denna källa till variationer i provningsresultaten för ämnen med hög fettupptagningsförmåga, dvs. med log $P_{ow} > 3$, bör därför biokoncentrationen uttryckas i förhållande till fettinnehållet förutom i förhållande till hela kroppsvikten.

Fettinnehållet ska fastställas för samma biologiska materia som används för fastställande av koncentrationen av det undersökta ämnet om så är genomförbart.

1.4 INFORMATION OM DET UNDERSÖKTA ÄMNET

Innan biokoncentrationsprovet utförs ska följande information om det undersökta ämnet finnas tillgänglig:

a) Lösningsbarhet i vatten.

b) Uppdelningskoefficienten P_{ow} för oktanol/vatten (också beteckand K_{ow} fastställd med HPLC-metod i A.8).

c) Hydrolys.

d) Ljusöverföring i vatten fastställd vid solbestrålning eller simulerad solstrålning och under de strålningsförhållanden som gäller för undersökningen av biokoncentrationen (3).

▼B

e) Ytspänning, dvs. för ämnen där log P_{ow} inte kan fastställas.

f) Ångtryck.

g) Biologisk nedbrytbarhet (när så är tillämpligt).

Annan information som krävs är giftigheten för de fiskarter som ska användas under provet, företrädesvis det asymptotiska LC_{50}, dvs. tidsoberoende. Det måste finnas lämplig analysmetod med känd noggrannhet, precision och känslighet för fastställande av mängden undersökt ämne i provlösningar och biologisk materia, tillsammans med uppgifter om beredning och förvaring av proverna. Den analytiska detektionsgränsen för det undersökta ämnet ska också vara känd för både vatten och fiskvävnad. När ^{14}C-märkta ämnen används ska procentandelen radioaktivitet kopplad till föroreningar vara känd.

1.5 PROVETS GILTIGHET

Följande omständigheter ska vara uppfyllda för att provet ska vara giltigt:

— Temperaturvariationen ska vara mindre än ± 2 °C.

— Koncentrationen av löst syre får inte falla under en mättnad på 60 %.

— Koncentrationen av det undersökta ämnet i kärlen ska hållas inom ± 20 % av det medelvärde som mäts under upptagningsfasen.

— Dödligheten eller andra negativa effekter/sjukdomar i både kontroll- och behandlingsgrupp ska vara mindre än 10 % vid slutet av försöket. Om försöket förlängs över flera veckor eller månader ska dödligheten eller andra negativa effekter i bägge fiskgrupperna vara mindre än 5 % per månad och får inte överstiga 30 % totalt.

1.6 REFERENSBLANDNINGAR

Användning av referensblandningar med känd biokoncentrationspotential kan vara lämpligt vid kontroll av experimentförfarandet när så krävs. Specifika ämnen kan emellertid ännu inte rekommenderas.

1.7 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.7.1 *Apparater*

Material som kan lösas upp, absorberas eller läcka och som har negativ effekt på fisken ska nogsamt undvikas i alla delar av utrustningen. Vanliga rektangulära eller cylindriska tankar, tillverkade av kemiskt beständigt material och med lämplig kapacitet vad gäller fyllningshastigheten ska användas. Användning av mjuka plaströr bör minimeras. Helst bör rör av teflon (R), rostfritt stål och/eller glas användas. Erfarenheter visar att kiselglas kan krävas för ämnen med hög absorptionskoefficient, som t.ex. syntetiska pyretroider. I dessa fall ska utrustningen slängas efter användningen.

▼B

1.7.2 *Vatten*

Naturligt vatten används vanligtvis vid undersökningen och bör tas från en oförorenad källa med jämn kvalitet. Lösningsvattnet måste hålla en kvalitet som möjliggör överlevnad för valda fiskarter under acklimatiserings- och provningsperioderna, utan att fiskarna uppvisar onormala förändringar eller beteende. I idealfallet ska det kunna visas att de arter som används kan överleva, växa och reproducera sig i vattenlösningen, t.ex. vid laboratorieodling eller en giftundersökning under livscykeln. Vattnet ska bestämmas avseende pH, hårdhet, partikelförekomst, total mängd organiskt kol och helst även ammonium, nitrit och alkalitet, samt för havslevande arter även salthalt. De parametrar som är viktiga för fiskens optimala välstånd är fullt ut kända, men i bilaga 1 anges rekommenderade maximala koncentrationer för ett antal parametrar för söt- och havsvattenprover.

Vattnet ska hålla jämn kvalitet under hela undersökningen. pH-värdet ska ligga mellan 6,0 och 8,5, men under pågående provning ska det ligga inom ± 0,5 enheter. För att säkerställa att vattnet inte påverkar undersökningsresultatet på oönskat sätt, t.ex. genom förändring av det undersökta ämnet, eller negativt påverkar fiskbeståndets förutsättningar, ska prover tas med jämna mellanrum för analys. Tungmetaller, t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, viktigare an- och katjoner, t.ex. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4, bekämpningsmedel, t.ex. medel som helt består av organisk fosfor eller organiska kloriner, totala mängden organiskt kol och utfällda fasta partiklar ska göras t.ex. var tredje månad när vattenlösningen är känd för att hålla en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras mer sällan och intervallerna utökas, till t.ex. var sjätte månad.

Den naturliga partikelinnehållet samt den totala mängden organiskt kol (TOC) i vattenlösningen ska vara så låg som möjligt för undvikande av absorbtion av det undersökta ämnet i organisk materia, vilket skulle kunna minska dess biotillgänglighet (4). Det maximalt acceptabla värdet är 5 mg/l för partiklar (torr materia som inte passerar ett filter på 0,45 μm) och 2 mg/l för helorganiskt kol (se bilaga 1). Vattnet ska vid behov filtreras före användning. Bidraget till innehållet av organiskt kol i vattnet (exkrementer) från fisk och foderrester ska vara så litet som möjligt. Koncentrationen av organiskt kol i vattnet (exkrementer) från fisk och foderrester ska vara så litet som möjligt. Koncentrationen av organiskt kol i provningskärlet ska under undersökningen inte överstiga den koncentration av organiskt kol som härrör från det undersökta ämnet och om sådan används, från lösningsagenten med mer än 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3 *Provlösningar*

Det undersökta ämnet ska lösas upp vid lämplig koncentration för förvaring. Förrådslösningen ska helst beredas genom att det undersökta ämnet helt enkelt blandas eller rörs i vattenlösningen. Användningen av lösningsmedel eller dispersanter (lösningsagenter) rekommenderas inte. Det kan emellertid i vissa fall vara nödvändigt för att få en lämpligt koncentrerad förrådslösning. Lösningsmedel som kan användas är etanol, metanol, etylenglykolmonometyleter, etylenglykoldimetyleter, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispersanter som kan användas är kremofor RH40, Tween 80, metylcellulosa på 0,01 % och HCO-40. Försiktighet ska iakttas vid användning av lätt biologiskt nedbrytbara agenter, eftersom dessa kan förorsaka problem med bakterietillväxt vid genomflödesprovning. Det undersökta ämnet kan vara radioaktivt märkt och ska hålla högsta renhet, företrädesvis > 98 %.

▼B

Vid genomflödesprovet krävs ett system som kontinuerligt släpper ut och löser upp förrådslösningen av det undersökta ämnet, t.ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem, för att leverera provningskoncentrationerna till provningskärlen. Helst ska minst fem volymsombyten per dag göras i provningskärlen. Genomflödessystemet är att föredra, men när detta inte är genomförbart, t.ex. om den undersökta organismen påverkas negativt därav, kan en halvstatisk teknik användas, förutsatt att giltighetskriterierna uppfylls. Förrådslösningens och lösningsvattnets flöden ska kontrolleras både 48 timmar före och minst en gång dagligen under pågående provning, Denna kontroll ska omfatta fastställande av flödeshastigheten genom varje provningskammare, samt ska den garantera att flödeshastigheten inte varierar med mer än 20 % inom eller mellan kärlen.

1.7.4 *Val av arter*

Viktiga kriterier vid val av arter är att de ska finnas enkelt tillgängliga, kan skaffas i lämpliga storlekar och kan hållas på ett tillfredsställande sätt i laboratoriemiljö. Andra kriterier vid val av fiskart är betydelsen för rekreation, handel och ekologi samt jämförbar känslighet, tidigare framgångsrik användning osv.

Rekommenderade provarter anges i bilaga 2. Andra arter kan användas, men provningsförfarandet kan då behöva anpassas för att ge lämpliga provningsförhållanden. Underlaget för val av art och experimentmetod ska i detta fall rapporteras.

1.7.5 *Hållande av fisk*

Fiskbeståndet ska acklimatiseras under minst två veckor i vatten med provningstemperaturen och hela tiden matas med tillräcklig diet av samma typ som ska användas under provet.

Efter en anpassningsperiod på 48 timmar ska dödligheten registreras och följande kriterier tillämpas:

— Större dödlighet än 10 % av beståndet under sju dagar – fiskbeståndet ska inte användas.

— Dödlighet på mellan 5 och 10 % av beståndet på sju dagar – beståndet ska acklimatiseras under ytterligare sju dagar.

— Dödlighet på mindre än 5 % av beståndet under sju dagar – acceptera beståndet, om mer än 5 % av beståndet dött under den andra sjudagarsperioden ska hela beståndet avlägsnas.

Kontrollera att fisk som använts vid undersökningen inte har några synliga sjukdomar eller abnormaliteter. Bortskaffa eventuell sjuk fisk. Fisken ska inte behandlas mot sjukdomen under de två närmast på undersökningen följande veckorna.

▼B

1.8 FÖRFARANDE VID UNDERSÖKNINGEN

1.8.1 *Preliminärt prov*

Det kan vara lämpligt att göra ett preliminärt experiment för att optimera provningsförhållandena för den slutgiltiga provningen, t.ex. val av koncentration för det undersökta ämnet och längd på upptagnings- och utsöndringsfaserna.

1.8.2 *Exponeringsförhållanden*

1.8.2.1 Upptagningsfasens längd

Upptagningsfasens längd kan bedömas utifrån praktiska erfarenheter, t.ex. från tidigare undersökning eller en ackumulationsrelaterad kemikalie, eller från vissa empiriska förhållanden tillsammans med kunskap om antingen det undersökta ämnets vattenlöslighet eller partitionskoeffecient i oktanol/vatten (se bilaga 3).

Upptagningsfasen ska vara 28 dagar, med mindre det kan visas att balans nås tidigare. Om stabilitet inte nåtts inom 28 dagar, ska upptagningsfasen förlängas med ytterligare mätningar, tills stabilitet nås eller 60 dagar, om detta inträffar först.

1.8.2.2 Utsöndringsfasens varaktighet

En period motsvarande halva upptagningsfasen är normalt tillräcklig för att få tillräcklig minskning, t.ex. 95 %, av det undersökta ämnet i fiskkroppen (se bilaga 3 för förklaring av bedömningen). Om den tid som krävs för att få en 95-procentig minskning blir orimligt lång, dvs. att den överskrider dubbla normala varaktigheten för upptagningsfasen, dvs. mer än 56 dagar, kan en kortare period användas, dvs. tills koncentrationen av det undersökta ämnet är mindre an 10 % av koncentrationen vid stabilitet. För ämnen med ett mer komplext mönster för upptagning och utsöndring än det som representeras av en enstaka fiskmodell med första ordningens kinetik, krävs emellertid utsöndringsfas för fastställande av utsöndringshastigheten. Periodens längd bör emellertid styras utifrån längden på den period som koncentrationen av det undersökta ämnet i fisken ligger kvar över analytiskt mätbar gräns.

1.8.2.3 Antal fiskar

Välj antalet fiskar per undersökt koncentration på ett sådant satt att minst fyra fiskar per prov finns tillgängliga för varje provtagning. Om större statistisk noggrannhet krävs, behövs fler fiskar per prov.

Om vuxna fiskar användas ska det i rapporten anges huruvida han- eller honfiskar eller bägge sorter använts vid experimentet. Om bägge könen används ska skillnader avseende fettinnehåll mellan könen visas vara utan betydelse innan exponeringen påbörjas. Det kan vara nödvändigt att hålla han-och honfiskar var för sig.

▼B

Vid denna typ av undersökningar ska fiskar med jämn vikt alltid väljas på ett sådant sätt att den minsta fisken inte väger mindre än 2/3 av vad den största väger. Samtliga fiskar ska vara från samma årskull och från samma källa. Eftersom fiskens vikt och ålder ibland förefaller ha stor betydelse för BCF-värdena (1), ska dessa uppgifter registreras korrekt. Det rekommenderas att delar av fiskbeståndet vägs före undersökningen, för fastställande av medelvikten.

1.8.2.4 Fisktäthet

En hög fisktäthet används för att minimera minskningen av C_w provningskärlet ska under undersökningen inte överstiga den koncentration av organiskt kol p.g.a. tillförsel av fiskar vid undersökningens början samt för att undvika en ökning av koncentrationen upplöst syre. Det är viktigt att fisktätheten är anpassad för den art som används. En täthet på 0,1–1,0 g fisk (våt vikt) per liter vatten och dag rekommenderas normalt. Hög täthet kan användas om det visar sig att önskad koncentration av det undersökta ämnet kan upprätthållas inom ± 20 % och att koncentrationen av upplöst syre inte faller under 60 % mättnad.

Vid val av lämpliga system ska hänsyn tas till fiskartens normala beteende. Bottenlevande fisk kan således kräva en större bottenyta i ett akvarium för en viss vattenvolym i förhållande till ytlevande fiskarter.

1.8.2.5 Utfodring

Under acklimatiserings- och provningsperioderna ska fisken utfodras med lämplig diet med känd fetthalt och totalt proteininnehåll, i sådan utsträckning att de hålls friska och behåller kroppsvikten, Fisken ska under acklimatiserins- och provningsperioderna utfodras med ungefär 1 — 2 % av kroppsvikten per dag. Detta håller fetthalten relativt konstant i de flesta fiskarter under provet. Fodermängden ska räknas om, t.ex. en gång per vecka, för att upprätthålla jämn kroppsvikt och fetthalt. Vid denna beräkning kan fiskens vikt i respektive provningskammare bedömas utifrån vikten på den fisk som senast tagits som prov från respektive kammare. Väg inte den fisk som lämnas kvar i kammaren.

Kvarvarande foder och exkrementer ska sugas ut från provningskammaren kort efter utfodringen (30 minuter till 1 timma). Kärlen ska hållas så rena som möjligt under provningen, så att koncentrationen av organisk materia hålls så låg som möjligt, eftersom förekomst av organisk kol kan begränsa det undersökta ämnets biotillgänglighet (1).

Eftersom många foder tillverkas av fiskmjöl, ska fodret analyseras avseendes det undersökta ämnet. Det är också önskvärt att fodret analyseras avseede bekämpningsmedel och tungmetaller.

▼B

1.8.2.6 Ljus och temperatur

Ljusperioden är vanligtvis 12 till 16 timmar, och temperaturen (± 2 °C) ska vara anpassad för den undesökta arten (ser bilaga 2). Belysningens typ och egenskaper ska vara kända. Hänsyn ska tas till det undersökta ämnets eventuella fototransformation under strålningsförhållanden vid försöket. Lämplig belysning ska användas för undvikande av exponering av fisken för onaturliga ljusprodukter. Det kan i vissa fall vara lämpligt att använda ett filter för bortfiltrering av UV-strålning under 290 nm.

1.8.2.7 Provningskoncentrationer

Fisken exponeras under genomflödesförhållandena för minst två koncentrationer av det undersökta ämnet i vatten. Normalt väljs den högre (eller högsta) koncentrationen av det undersökta ämnet till ungefär 1 % av dess akuta asymptotiska LC_{50} och så att den är minst tio gånger högre än den gräns som ska överskridas för detektion i vatten med den använda analysmetoden.

Den högsta provningskoncentrationen kan också fastställas genom division av den akuta LC_{50} under 96 timmar med lämpligt akut/kroniskt förhållande (lämpliga förhållanden för vissa kemikalier kan vara från ungefär 3 upp till 100). Om möjligt bör andra koncentrationer väljas på ett sådant sätt att de avviker från ovannämnda med en fartor på 10. Om detta inte är möjligt p.g.a. kravet på 1 % av LC_{5O} och det analytiska gränsvärder, kan en lägre faktor än 10 tillämpas eller ^{14}C-märkning av det undersökta ämnet beaktas. Ingen av använda koncentrationer får ligga över det undersökta ämnets lösningsbarhet.

När lösningsagent avvänds ska dess koncentration inte vara större än 0,1 ml/l och vara lika stor i samtliga kärl. Dess bidrag tillsammans med det undersökta ämnet till det totala innehållet av organsikt kol i provningsvattnet ska vara känt. Denna typ av ämne bör emellertid undvikas i största möjliga utsträckning.

1.8.2.8 Kontroller

Kontroll av lösningsvattnet eller, om så är tillämpligt, kontroll av lösningsagenten, ska göras utöver provningsserierna, förutsatt att det kunnat fastställas att agenten inte har någon effekt på fisken. Om så inte är fallet ska bägge kontrollerna göras.

1.8.3 *Frekvens för mätning av vattenkvalitet*

Upplöst syre, TOC, pH och temperatur ska mätas i samtliga kärl under provningen. Den totala hårdheten och eventuellt salthalten ska mätas vid kontrollerna i ett kärl med högre (eller högst) koncentration. Det upplösta syret och eventuellt salthalten ska mätas minst tre gånger – i början, ungefär i mitten och mot slutet av upptagningsperioden – och en gång i veckan under utsöndringsperioden. TOC ska mätas vid början av provet (24 och 48 timmar innan upptagningsfasen initieras) före det att fisken tillsätts och minst en gång i veckan under både upptagnings- och utsöndringsfaserna. Temperaturen ska mätas dagligen, pH i början och slutet av varje period och hårdheten en gång under varje provning. Temperaturen ska helst avläsas kontinuerligt i åtminstone ett kärl.

▼B

1.8.4 *Provtagning och analys ar fisk och vatten*

1.8.4.1 Schema för provtagning på fisk och vatten

Vatten från provningskärlen ska tas både före det att fisken tillsätts samt under upptagnings- och utsöndringsfaserna, för fastställande av koncentrationen av det undersökta ämnet. Prover ska tas av vattnet åtminstone samtidigt som av fisken samt före utfodring. Under upptagningsfasen fastställs koncentrationen av det undersökta ämnet för kontroll av överensstämmelse med giltighetskriterierna.

Prover ska tas på fisken minst fem gånger under upptagningsfasen och vid minst fyra tillfällen under utsöndringsfasen. Eftersom det i bland är svårt att göra en exakt uppskattning av BCF-värdet grundat på detta antal prover, framför allt när annan utsöndringskinetik än första ordningens kan påvisas, kan det vara tillrådligt att ta prover med tätare mellanrum under bägge perioderna (se bilaga 4). Extraproverna ska lagras och bara analyseras om resultaten från första omgångens analyser visar sig vara otillräckliga för beräkning av BCF med önskad noggrannhet.

I bilaga 4 ges ett exempel på ett acceptabelt provtagningsschema. Andra scheman kan lätt räknas ut med andra antagna värden för P_{ow}, för beräkning av exponeringstiden för att få 95-procentig upptagning.

Provtagningen ska försätta under upptagningsfasen tills stabil nivå uppnås, dock minst 28 dagar. Om stabil nivå inte nåtts inom 28 dagar, ska provtagningen fortsätta tills stabil nivå nås, dock minst 60 dagar, om detta inträffar först. Innan utsöndringsfasen inleds ska fisken överföras till rena tankar.

1.8.4.2 Provtagning och beredning av prover

Vattenprover för analys tas genom en tät röranslutning i provningskammarens mittpunkt. Eftersom varken filtrering eller centrifugering alltid separerar den icke-biologiska fraktionen från det undersökta ämnet från den biotillgängliga delen (särskilt för superlipofila kemikalier, dvs. kemikalier med log $P_{ow} > 5$) (1) (5), ska proverna inte utsättas för sådan behandling.

Åtgärder bör istället vidtas för att hålla tankarna så rena som möjligt och innehållet fullorganiskt kol ska övervakas under både upptagnings- och utsöndringsfasen.

Ett lämpligt antal fiskar, i normalfallet minst fyra, ska tas från provningskammaren vid varje provtagning. Provtagningsfisken ska sköljas snabbt med vatten, torkas torr, dödas omedelbart på lämpligaste och humanaste sätt och därefter vägas.

Det är lämpligt att under den tid som provet pågår analysera fisken och vattnet omedelbart efter provtagning, för att förhindra försämring eller andra förluster samt för beräkning av ungefärlig upptagnings- och utsöndringshastighet. Mellananalyser förhindrar också förseningar vid fastställande av när en nivå har nåtts.

▼B

Om mellananalyser inte görs ska proverna lagras pa lämpligt sätt. Innan undersökningen påbörjas ska information om lämplig förvaringsmetod för det aktuella ämnet, t.ex. djupfrysning, nedkylning vid 4 °C, förvaringstid, extraktion osv., skaffas.

1.8.4.3 Analysmetodens kvalitet

Eftersom hela proceduren i huvudsak styrs av noggrannhet, precision och känslighet i den analysmetod som används för det undersökta ämnet, ska precision och reproduktionsbarhet för den kemiska analysen kontrolleras experimentellt, vilket även gäller för återhämtning av det undersökta ämnet från både vatten och fisk, vilket ska vara tillfredsställande med den aktuella metoden. Kontrollera också att det undersökta ämnet inte kan upptäckas i det lösningsvatten som används.

Om så krävs ska C_w- och C_f-värden som fås från undersökningen korrigeras för återhämtnings- och bakgrundsvärden från kontrollerna. Fisk- och vattenprover ska alltigenom hanteras på ett sådant sätt att förorening och förlust minimeras, t.ex. på grund av absorbtion från provtagningsanordningarna.

1.8.4.4 Analys av fiskprov

Om radioaktivt märkt material används vid undersökningen är det möjligt att analysera den totala radioaktiva märkningen, dvs. moderblandning och metaboliter, eller kan proverna rengöras så att moderblandningen kan analyseras separat. De viktigare metabohterna kan karakteriseras vid stabil nivå, dock senast vid upptagningsfasens slut. Om BCF som total radioaktivt märkt rest är ≥ 1 000 %, kan det vara lämpligt och för vissa kemikaliekategorier, som t.ex. bekämpningsmedel, starkt rekommendabelt att identifiera och mängdbestämma de rester dom uppgår till ≥ 10 % av den totala resten i fiskvävnaden vid stabil nivå. Om resterna representerar ≥ 10 % av den totala radioaktivt märkta resten if fiskvävnaden identifieras och kvantifieras, är det också rekommendabelt att identifiera och mängdbestämma resterna i provningsvattnet.

Koncentrationen av det undersökta ämnet ska normalt fastsfällas för varje vägd fiskindivid. Om detta inte är möjligt kan sammanslagning av proverna vid varje provtagningstillfälle göras, men detta begränsar det statistiska förfarandet för erhållna data. Om ett visst statistiskt förfarande och dess funktion är viktiga, skal! ett tillräckligt antal fiskar för att tillfredsställa den önskade sammanslagningsproceduren och effekten införas i undersökningen (6) (7).

BCF ska uttryckas både som en funktion av total våt vikt och, för kraftigt lipofila ämnen, som en funktion av fettinnehållet. Fettinnehållet i fisken fastställs om möjligt vid varje provtagningstillfälle. Lämpliga metoder ska användas för fastställandet av fettinnehållet (punkterna 8 och 2 i bilaga 3). Extraktionstekniker med kloroform/metanol kan vara att rekommendera som standardmetod (9). De olika metoderna ger inte identiska värden (10), varför det är viktigt att ange vilken metod som använts. När så är möjligt ska fettanalysen göras på samma extrakt som det som tagits fram för analys av det undesökta ämnet, eftersom fettet ofta måste tas bort från extraktet innan kromatografisk analys kan göras. Fettinnehållet i fisken (som mg fett per kg våt vikt) får vid slutet av experimentet inte skilja sig från innehållet vid experimentets början med mer än ± 25 %. Andelen fasta partiklar i vävnaden ska också registreras för att möjliggöra omvandling av fettkoncentrationen från vått till torrt värde.

▼B

2. **DATA**

2.1 RESULTATBEARBETNING

Upptagningskurvan för det undersökta ämnet fås genom plottning av dess koncentration i/på fisk (eller specificerad vävnad därav) under upptagningsfasen i förhållande till tiden på aritmetisk skala. Om kurvan när en platå, dvs. blir ungefär asymptotisk med tidsaxeln, beräknas BCF_{SS} med följande formel:

$$\frac{C_f \text{ vid stabilitet (medel)}}{C_w \text{ vid stabilitet (medel)}}$$

När stabilitet inte nås, kan BCF_{SS} beräknas med tillräcklig noggrannhet för riskbedömning från en stabilitet vid 80 % ($1{,}6/k_2$) eller 95 % ($3{,}0/k_2$) balans.

Koncentrationsfaktorn (BCF_k) fastställs också som förhållandet k_1/k_2 de två kinetiska konstanterna av första ordningen. Konstanten för utsöndringshastighet, k, fastsälls normalt ur utsöndringskurvan, dvs. en plottning av ökningen av det undersökta ämnets koncentration i fisken i tiden. Konstanten för upptagningshastigheten, k_1, beräknas utifrån konstanten k_2 och värdet på C_f som fås från upptagningskurvan (se också bilaga 5). Den bästa metoden för erhållande av BCF_k och hastighetskonstanterna k_1 och k_2 är att göra en icke-linjär parameterbedömning i en dator (11). I annat fall kan grafiska metoder användas för beräkning av k_1 och k_2. Om det är uppenbart att utsöndringskurvan inte är en kurva av första ordningen, ska mer komplexa modeller tillämpas (se referenser i bilaga 3) och råd inhämtas från biostatistiker.

2.2 TOLKNING AV RESULTAT

Resultaten ska tolkas med försiktighet när uppmätta koncentrationer av den undersökta lösningen påträffas på nivåer nära den analytiska metodens gränsvärdet för detektion.

Tydligt definierade upptagnings- och förlustkurvor är en indikation på att biokoncentrationsdatan är av god kvalitet. Skillnaden i upptagnings/utsöndringskonstanterna mellan de två provningskoncentrationerna ska vara mindre än 20 %. Observera att väsentliga skillnader i upptagnings-/utsöndringshas-tigheterna mellan de två tillämpade provningskoncentrationerna ska registreras och om möjligt förklaras. Tillförlitlighetsgränsen för BCF kan för väl utformade studier sägs ligga runt ± 20 %.

3. **RAPPORTERING**

Undersökningsrapporten måste innehålla följande information:

3.1 UNDERSÖKT ÄMNE

— Fysisk form och, när så är tillämpligt, fysiokemikaliska egenskaper.

— Kemisk identifiering (inklusive eventuellt innehåll av organiskt kol).

— Om ämnet är radioaktivt märkt ska den märkta atomens exakta position och andelen radioaktivitet kopplad till föroreningar anges.

▼B

3.2 UNDERSÖKTA ARTER

— Vetenskapligt namn, variant, källa, eventuell förbehandling, acklimatisering, ålder, storleksområde osv.

3.3 PROVNINGSFÖRHÅLLANDEN

— Tillämpat provningsförfarande, t.ex. genomflöde eller halvstatiskt.

— Typ och karakteristik för använd belysning och ljusperiod.

— Provets utformning, t.ex. antal och storlek på provningskammare, vattenväxlingshastighet, antal kopior, antal fiskar per kopia, antal provningskoncentrationer, upptagnings- och utsöndringsfasernas längd, provtagningsfrekvens för fisk och vatten.

— Metod för beredning av förrådslösningar och förnyelsefrekvensen (lösningsagent, dess koncentration och bidrag till innehåll av orgnaiskt kol i provningsvattnet måste anges när sådan används).

— Nominella provningsförhållanden, medelvärden för uppmätta värden samt deras standardavvikelser i provningskärlen och metod som använts för beräkning av dessa värden.

— Vattenkälla, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat från eventuell undersökning av fiskens förmåga att överleva i vattnet, samt vattnets karakteristik: pH, hårdhet, temperatur, syrehalt, klorrestvärde om detta mäts, total mängd organiskt kol, utfällda fasta partiklar, salthalt i det undersökta mediet, om tillämpligt, och eventuella andra gjorda mätningar.

— Vattenkvalitet i provningskärlen, pH, hårdhet, TOC, temperatur och syrehalt.

— Detaljerad information om utfodringen, t.ex. fodertyp, källa, sammansättning (åtminstone fett- och proteininnehåll) mängd och frekvens.

— Information om behandlingen av fisk- och vattenprover, inklusive uppgifter om beredning, förvaring, extraktion och analytiska förfaranden, samt deras noggrannhet, för det undersökta ämnet och fettinnehållet (om detta mäts).

3.4 RESULTAT

— Resultat från eventuell preliminär studie.

— Dödligheten för kontrollfisken och fisken i varje exponerat kärl, samt eventuellt observerat onormalt beteende.

— Fettinnehållet i fisken (om detta fastställs vid provningen).

— Kurvor, inklusive samtliga mätdata, över upptagningen och utsöndringen av den undersökta kemikalien i fisken, tiden till stabilitet.

▼B

— C_f en C_w (med standardavvikelse och område, om tillämpligt) för samtliga provtagningstillfällen (C, uttryckt som µg/g våt vikt (ppm) i hela kroppen eller den specificerade vävnaden därav, t.ex. fett, och C_w som µg/ml (ppm)), C_w-värden för kontrollserierna (bakgrundsvärden ska också rapporteras).

— Biokoncentrationsfaktorn vid stabilitet (BCF_{ss}) och/eller den kinetiska koncentrationsfaktorn (BCF_k) och om tillämpligt den 95-procentiga tillförlitlighetsgränsen för upptagnings- och utsöndringshastighetskonstanterna (samtliga uttryckta i förhållande till hela kroppen och det totala fettinnehållet, om detta mäts, i djuret eller den specificerade vävnaden därav), tillförlitlighetsgränser och standardavvikelser (om tillgängliga) samt metoder för beräkning/dataanalys av samtliga koncentrationer av det undersökta ämnet.

— Om strålningsmarkerade ämnen används och om så krävs, kan ackumulationen av eventuella upptäckta metaboliter visas.

— Eventuella anmärkningar avseende undersökning, eventuell avvikelse från förfarandet och annan relevant information.

Undvik resultat som t.ex. ”ej upptäckt vid detektionsgränsen” vid framtagningen av undersökningsmetoden och dess experimentella utformning, eftersom sådana resultat inte kan användas för beräkning av hastighetskonstanter.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms (ung. Bestående kemikaliers bioackumulationsheteende i vattenorganismer), Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, s. 117–156.

2. Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. (Fiskbiokoncentrationens icke-linjära beroende av parti tionskoefficienten för non-oktanol/vatten). SAR and QSAR in Environmental Research, s. 29–390.

3. OECD (1996), Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals (ung. Direkt ljustransformering av kemikalier i vatten. Riktlinjer för miljöskydd – provning och bedömning av kemikalier), nr 3.

4. Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals (ung. Biokoncentration i fisk: Jämförelse av biokoncentrationsfaktorer från OECD:s och ASTM:s provningsmetoder, partikelformigt organiskt materials påverkan på kemikaliers biotillänglighet), Water Quality Institute, Danmark.

5. US EPA 822-R-94-002 (1994), Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors (ung. Tekniskt underlag för kvalitetsinitiativet för vattnet i Stora sjöarna, för fastställande av bioackumulationsfaktorer), juli 1994.

6. US FDA (Myndigheten för livsmedel och droger) Revision. Handbok för analys av bekämpningsmedel, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, juli 1975.

7. US EPA (1974), Avsnitt 5, A(l) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples (ung. Analys av fettvävnad från människa eller djur vid analys av bekämpningsmedelsrester i prov från människa eller djur), Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

8. Compaan H. (1980), in ”The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation” (ung. Fastställande av möjliga effekter från kemikalier och avfall på vattenmiljön: degradering, giftighet, bioackumulation), kap. 2.3, del 2. Government Publisching Office, The Hague, The Netherlands.

▼B

9. Gardner et al. (1995), Limn. & Oceanogr. 30, 1099–1105.

10. Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J, Lake J.L. and Pruell R.J. (1991), Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem (ung. Utvärdering av vissa fettmetoder för oskadliggörande av förorenande bioackumulation) 10, s. 1431–1436.

11. CEC. Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984–1985 (ung. Biokoncentration av kemikalier i fisk: genomflödesmetoden – Ringprovningsprogrammet 1984–1985), slutrapport 1987, författare: P. Kristensen and N. Nyholm.

12. ASTM E-l022-84 (Återantagen 1988), Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fisches and Saltwater Bivalve Molluscs (ung. Standardförfarande för biokoncentrationsundersökning med fisk och saltvattenblötdjur med två kanaler).

▼B

Bilaga 1

Kemisk karakteristik för acceptabelt lösningsvatten

	Ämne	Koncentrations-gränsvärde
1	Partiklar	5 mg/l
2	Total mängd organiskt kol	2 mg/l
3	Ojoniserad ammonium	1 µg/l
4	Klorrester	10 µg/l
5	Total mängd fosforganiska bekämpningsmedel	50 ng/l
6	Total mängd klororganiska bekämpningsmedel plus flerklorerade bifenyler	50 ng/1
7	Total mängd organiskt klor	25 ng/1
8	Aluminium	1 µg/l
9	Arsenik	1 µg/l
10	Krom	1 µg/l
11	Kobolt	1 µg/l
12	Koppar	1 µg/l
13	Järn	1 µg/l
14	Bly	1 µg/l
15	Nickel	1 µg/l
16	Zink	1 µg/1
17	Kadmium	100 ng/1
18	Kvicksilver	100 ng/1
19	Silver	100 ng/1

▼B

Bilaga 2

Fiskarter som rekommenderas för undersökning

	Rekommenderade arter	Rekommenderat temperaturområde för undersökningen (ºC)	Rekommenderad total längd på det undersökta djuret (cm)
1	Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20–25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow (art av kvidd)	20–25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Vanlig karp	20–25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Ricefish (risfiskart)	20–25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20–25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill (art av solabborre)	20–25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regnbågslax	13–17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Stenspigg	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993), Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 2.52, s. 231.

Flera söt- och saltvattenarter har använts i olika länder, t.ex:

Spot	*Leiostomus xantburus*
Sheepshead minnow (art av tandkarp)	*Cyprinodon variegatus*
Silverside	*Menidia beryllina*
Shiner perch	*Cymatogaster aggregata*
English sole	*Parophrys vertulus*
Staghorn sculpin	*Leptocottus armatus*
Stenspigg	*Gasteroteus aculeatus*
Havsaborre	*Dicentracus labrax*
Benlöja	*Alburnus alburnus*

Insamling

Den sötvattenfisk som anges i ovanstående tabell är lätt att skaffa och/eller finns lätt tillgänglig under hela aret, medan tillgängligheten for havs- och bräckvattenarterna delvis begränsas till respektive länder. De kan födas upp och odlas på fiskodlingar eller laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade förhållanden, så att det använda djuret är friskt och har känd stamtavla. Dessa fiskar finns tillgängliga i stora delar av världen.

▼B

Bilaga 3

Förbestämning av längden på upptagnings- och utsöndringsfaserna

1. *Förbestämning av upptagningsfasens längd*

Innan provet påbörjas ska en uppskattning av k_2 göras, och hänsyn till hur stor del av tiden som krävs för att nå stabilitet kan inhämtas från empiriska förhållanden mellan k_2 och n- oktanol/vattenfördelningskoeffecienten (P_{ow}) eller k_2, och vattenlösligheten (s).

En uppskattning av k_2 (dag^{-1}) kan erhållas med t.ex. följande empiriska förhållande (1):

$$\log_{10}k_2 = 0{,}414\ \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47\ (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{(ekvation 1)}$$

För andra förhållanden se hänvisning 2.

Om partitionskoeffecienten (P_{ow}) inte är känd, kan en bedömning göras (3) utifrån kunskapen om ämnets vatten löslighet (s) med följande formel:

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862\ \log_{10}(s) + 0{,}710\ (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{(ekvation 2)}$$

där:

s står för lösligheten i mol/l: (n = 36).

Dessa förhållanden gäller enbart för kemikalier med log P_{ow}-värden mellan 2 och 6,5 (4).

Tiden för att nå en viss del av den stabila nivån kan fås genom tillämpning av så kallad k_2-bedömning, med den allmänna kinetiska ekvationen för upptagning och utsöndring (första ordningens kinetik):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

eller om C_w är konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w\ (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(ekvation 3)}$$

När stabiliteten börjar närma sig ($t \rightarrow \infty$), kan ekvation 3 reduceras (5) (6) till:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ eller } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

(k_1/k_2) C_w närmar sig då koncentrationen i fisken vid stabilitet ($C_{f,\,s}$).

Ekvation 3 kan skrivas om på följande sätt:

$$C_f = C_{f,s}\ (1 - e^{-k_2 t}) \text{ eller } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(ekvation 4)}$$

Vid användning av ekvation 4 kan tiden för att nå viss stabilitet förutsägas när k_2 förutbestäms med ekvation 1 eller 2.

▼B

Som riktlinje kan sägas att den statistiskt optimala längden på upptagningsfasen, för produktion av statistiskt acceptabla data (BCF_k) är den period som krävs för att kurvan över koncentrationslogaritmen för det undersökta ämnet i fisken, plottad mot linjär tidsaxel, till medelpunkten är $1,6/k_2$ eller 80 % av den stabila nivån, men inte mer än $3,0/k_2$ eller 9.5 -procentig stabilitet (7).

Tiden för att nå 80-procentig stabilitet är (ekvation 4)

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ eller } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{(ekvation 5)}$$

95-procentig stabilitet fås på motsvarande sätt med ekvationen:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad \text{(ekvation 6)}$$

Upptagningsfasens (upp) längd för ett undersökt ämne med log P_{ow} = 4 blir då (med ekvationerna 1,5 och 6):

$\log_{10}k_2$ = -0,414.(4) + 1,47 k_2 = 0,652 dag^{-1}

upp (80 %) = 1,6/0,652, t.ex. 2,45 dagar (59 timmar)

eller upp (95 %) = 3,0/0,652, t.ex. 4,60 dagar (110 timmar)

För ett undersökt ämne med s = 10^{-5} mol/l (log(s) = -5,0), är upptagningsfasen (med ekvationerna 1,2,5 och 6):

$\log_{10}$ (P_{ow}) = -0,862 . (-5,0) + 0,710 = 5,02

$\log_{10}$ k_2 = -0,414 . (5,02) + 1,47

k_2 = 0,246 $dagar^{-1}$

upp (80 %) = 1,6/0,246, t.ex. 6,5 dagar (156 timmar)

eller upp (95 %) = 3,0/0,246, t.ex. 12,2 dagar (293 timmar).

Alternativt kan följande uttryck användas:

t_{eq} = 6,54 × 10^3 P_{ow} + 55,31 (timmar)

Detta uttryck används för beräkning av tiden till det att faktiskt stabilitet nås (4).

2. *Förutbestämning av utsöndringsfasens varaktighet*

Förutbestämning av den tid som krävs för att minska mängden ämne i kroppen, till en viss del av den ursprungliga koncentrationen, kan också göras med den allmänna ekvationen för upptagning och utsöndring (första ordningens kinetik) (1) (8).

C_w antas vara noll för utsöndringsfasen. Ekvationen kan reduceras till:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ eller } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

där $C_{f,0}$ är koncentrationen vid början av utsöndringsperioden. 50-procentig utsöndring nås då vid tiden (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ eller } t_{50} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

95-procentig utsöndring fås på motsvarande sätt med ekvationen:

$$t_{95} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Om en upptagning på 80 % används för den första perioden ($1{,}6/k_2$) och en 95-procentig förlust i utsöndringsfasen ($3{,}0/k_2$), är utsöndringsfasen ungefär dubbelt så lång som utsöndringen i upptagningsfasen.

Det är emellertid viktigt att observera att dessa beräkningar är grundade på förutsättningen att upptagnings-och utsöndringsmönstren följer första ordningens kinetik. Om det är uppenbart att första ordningens kinetik inte följs, ska mer komplexa beräkningsmodeller användas (se hänvisning 1).

Hänvisningar (för bilaga 3)

l. Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), *Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem.* (ung. Alternativa modeller för beskrivning av biokoncentrationen av organiska ämnen i fisk; miljö; gift; kemikalie) 1, s. 309–320.

2. Kristensen P. (1991), *Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals (ung.* Biokoncen tration i fisk: jämförelse av biokoncentrationsfaktorerna från OECD:s och ASTM:s provningsmetoder, partikelformiga ämnens påverkan på kemikaliernas biotillgänglighet). Danska vattenkvalitetsinstitutet.

3. Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982), *Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol* (ung. Fördelning av organiska blandningar i oktanol-vattensystem; miljö; forsk ning; teknik). 16 (1), s. 4–10.

4. Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), *Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish* (ung. Lipofila blandningars partitionskoefficients påverkan på biokoncentrationskinetiken med fisk). Wat. Res. 22 (6), s. 701–707.

5. Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975), *Transactions of the American Fisheries Society* (ung. Amerikanska fiskeförbundets transaktioner), 104 (4), s. 785–792.

6. Ernst W. (1985), *Accumulation in aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environ mental behaviour of chemicals* (ung. Ackumulering i vattenorganismer. In: Bedömning av provningar för att förutsäga kemikaliers beteende i miljön). Författad av Sheehman P., Korte F., Klein W. och Bourdeau P.H., del 4.4 sid 243–255. SCOPE, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

7. Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), *Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kenetic models* (ung. Riktlinjer för optimal utformning av experiment för bedömning av parametrar i modeller för första ordningens kinetik), Can. J. Chem. Eng. *SS,* s. 614–622.

8. Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980), T*oxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere* (ung. Toxicokinetik i fisk: Ackumulering och eliminerig av sex klorbenzener i guppy), 9, s. 3–19.

▼B

Bilaga 4

Teoretiskt exempel på provtagningsschema för biokoncentrationsundersökningar för ämnen med log P_{ow} = 4

Provtagning av fisk	Tidsschema för provtagning		Antal vattenprover	Antal fiskar per prov
	Längsta tänkbara provtagningsfrekvens (dagar)	Tilläggsprover		
Upptagningsfas	- 1 0		2 (*) 2	tillsätt 45–80 fiskar
Första	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
Andra	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
Tredje	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
Fjärde	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
Femte	4,7		2	6
Utsöndringsfas				Flytta över fisken till vatten fritt från den undersökta kemikalien
Sjätte	5,0	5,3		4 (4)
Sjunde	5,9	7,0		4 (4)
Ättonde	9,3	11,2		4 (4)
Nionde	14,0	17,5		6 (4)

(*) Ta prover på vattnet när minst tre kärlvolymer har levererats.

Värden inom parentes står för antal prover (vatten, fisk} som ska tas om tilläggsprovtagning görs.

Anmärkning: Föregående uppskattning för k, för log P_{ow} på 4,0 är 0,652 dagar . Experimentets totala varaktighet är fastställd till: 3 x upp = 3 x 4,6 dagar, dvs. 14 dagar. För uppskattning av ”upp”, se bilaga 3.

▼B

Bilaga 5

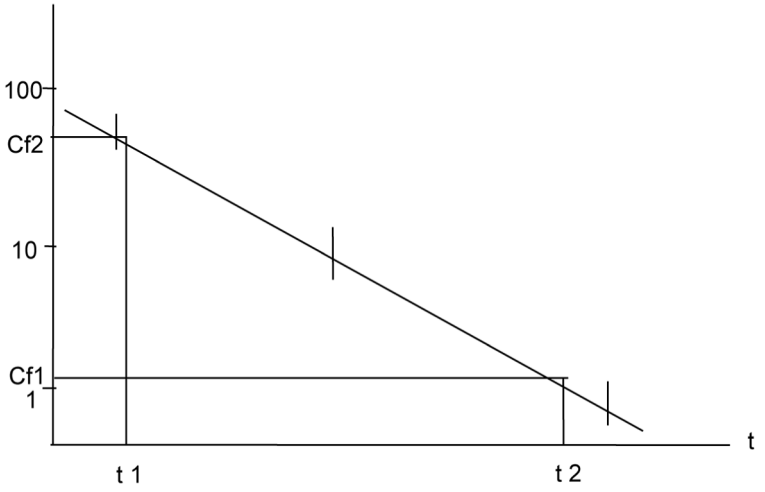
Modellbeskrivning

De flesta biokoncentrationsdata har förutsatts bli skäligen väl beskrivna med en enkel tvådelad modell eller tvåparametersmodell, på det sätt som visas med den räta kurva som närmar sig punkterna för koncentrationen i fisk under utsöndringsfasen, när dessa linjer plottas på halvlogaritmiskt papper. Om dessa punkter inte kan beskrivas av en rät kurva ska mer komplexa modeller användas, se t.ex Spacie och Hamelink, hänvisning 1 i bilaga 3.

Grafisk metod för bestämmning av konstanten k_2 för utsöndringshastigheten

Plotta en koncentration av det undersökta ämne som återfinns i varje fiskprov mot provtagningstiden på halvlogaritmiskt papper. Linjens lutning är k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Observera att avvikelser från rät linje kan vara ett tecken på ett mer komplext utsöndringsmönster än första ordningens kinetik. En grafisk metod kan användas för att särskilja utsöndringstyper som avviker från första ordningens kinetik.

Grafisk metod för fastställande av konstanten k_1 för upptagningshastigheten

När k_2 tagits fram kan konstanten k_1 beräknas med följande formel:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[ekvation 1]}$$

Värdet på C_f, avläses i mittpunkten på den jämna upptagningskurva som fås av datan när den logaritmiska koncentrationen plottas i förhållande till tiden på en aritmetrisk skala.

▼B

Metod för beräkning av konstanterna för upptagnings- och utsöndringshastigheten

De medel som föredras för erhållande av biokoncentrationsfaktorn och hastighetskonstanterna k_1 och k_2 är att använda en icke-linjär metod för parameteruppskattning på dator. Dessa program hittar värdena på k_1 och k_2 utifrån en uppsättning koncentrationsdata sekventiella i tiden och med följande ekvationer:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{[ekvation 2]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{[ekvation 3]}$$

där t_c står för tiden vid slutet av upptagningsfasen.

Med denna metod kan vanliga avvikelsebedömningar göras för k_1 och k_2.

Eftersom k_2 i de flesta fall kan uppskattas i utsöndringskurvan med förhållandevis hög precision och eftersom ett starkt samband finns mellan de två parametrarna k_1 och k_2 om de beräknas samtidigt, kan det vara tillrådligt att först beräkna k_2 från enbart utsöndringsdata och därefter beräkna k_1 från upptagningsdata med icke-linjär regression.

▼B

C.14 TILLVÄXTTEST PÅ UNGA EXEMPLAR AV FISK

1. METOD

Denna metod för tillväxttest avseende toxicitet motsvarar OECD TG 215 (2000).

1.1 INLEDNING

Testet är avsett för bestämning av vilka verkningar långvarig exponering för kemikalier har på tillväxten hos unga exemplar av fisk. Testet baserar sig på en metod för bestämning av verkningarna av kemikalier på tillväxten hos unga exemplar av regnbågslax *(Oncorynchus mykiss)* under genomflödesförhållanden, en metod som har utvecklats och ringtestats (1) (2) inom Europeiska unionen. Även andra väldokumenterade arter kan användas. Man har t.ex. erfarenheter från tillväxttest med sebrafisk *(Danio rerio)* ([1]) (3) (4) och ricefish medaka *Oryzias* latipes) (5) (6) (7).

Se också den allmänna inledningen, del C.

1.2 DEFINITIONER

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest observed effect concentration, LOEC):

den lägsta testade koncentrationen av ett testämne vid vilken man kan observera signifikanta verkningar (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som kan observeras vid LOEC.

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No observed effect concentration, NOEC): test-koncentrationen omedelbart under LOEC.

EC_x: den koncentration av testämnet som orsakar en tillväxtvariation på x % hos testexemplaren jämfört med kontrollgruppen.

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym. **Antalstäthet:** antalet exemplar per vattenvolym.

Individuell specifik tillväxthastighet: tillväxthastigheten hos en individ, uppmätt med startvikten som utgångspunkt.

Kärlmedelvärdet för specifik tillväxthastighet: medeltillväxthastigheten hos en kärlpopulation vid en viss koncentration.

Pseudospecifik tillväxthastighet: den individuella tillväxthastigheten jämförd med kärlpopulationens medel-begynnelsevikt.

([1]) Meyer A.. Bierman C. H. och Orti G. (1993), The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252, s. 231-236.

▼B

1.3 PRINICP FÖR TESTMETODEN

Unga fiskexemplar i exponentiell tillväxtfas vägs och placeras i testkärl där de exponeras för en serie subletala koncentrationer av testämnet upplöst i vatten. Exponeringen ska helst ske under genomflödesförhållanden eller, om detta inte är möjligt, under lämpliga halvstatiska förhållanden (statisk förnyelse). Testperiodens längd är 28 dagar. Fiskarna utfodras dagligen. Foderportionen baserar sig på fiskarnas begynnelsevikter och kan räknas om efter 14 dagar. Vid slutet av testet vägs fiskarna på nytt. Verkningarna på tillväxthastigheterna analyseras med en regressionsmodell för att bestämma den koncentration som leder till en variation på x % av tillväxthastigheten, dvs. EC_x (t.ex. EC_{10}, EC_{20} eller EC_{30}). Alternativt kan testdata jämföras med kontrollgruppens värden för att bestämma den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC).

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Det bör finnas tillgäng till resultaten från ett test avseende akut toxicitet (se metod Cl), som helst ska ha utförts med samma art som används för detta test. Testämnets vattenlöslighet och ångtryck måste vara kända. Det bör finnas tillgång till en tillförlitlig analysmetod for kvantifiering av ämnet i testlösningen och denna metod blir ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.

Till information som bör anges hör bl.a. testämnets strukturformel, ämnets renhet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C.4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Mortaliteten i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) får inte överskrida 10 % vid testets slut.

— Medelvikten hos fiskarna i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) måste ha ökat tillräckligt för att ge möjlighet att detektera den minsta variation som anses vara signifikant. Resultaten från ett ringtest (3) har visat att medelvikten för exemplar av regnbågslax i kontrollgrupperna under de 28 testdagarna måste ha ökat med minst hälften (50 %) av begynnelsevikten. Om t.ex. begynnelsevikten är 1 g per fisk (= 100 %) bör slutvikten efter 28 dagar vara ≥ 1,5 g per fisk (≥ 150 %).

— Koncentrationen upplöst syrgas måste under hela testet ha varit minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV).

— Under testet får vattentemperaturen inte vid någon tidpunkt variera med mer än ± 1 °C mellan olika testkärl och den får variera med högst 2 °C från de temperaturgränser som specificerats för den art som används (se tillägg 1).

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Utrustning**

Normal laboratorieutrustning och särskilt

a) syrgas- och pH-mätare,

▼B

b) utrustning för bestämning av hårdhet och alkalinitet hos vatten,

c) lämplig utrustning för temperaturreglering, helst med kontinuerlig övervakning,

d) kärl som är tillverkade av kemiskt inert material och tillräckligt stora med tanke på den rekommenderade fisktätheten och antalstätheten (se avsnitt 1.8.5 och tillägg 1),

e) lämplig precisionsvåg (t.ex. noggrannhet ± 0,5 %).

1.6.2 **Vatten**

Som testvatten kan användas allt vatten i vilket den berörda arten uppvisar lämplig överlevnad och tillväxt under en längre period. Testvattnet bör ha konstant kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH bör ligga inom intervallet 6,5–8,5 men får dock under ett givet test variera med högst ± 0,5 pH-enheter. Hårdhet över 140 mg/l (räknat som $CaCO_3$) rekommenderas. För att säkerställa att spädvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testämnet), bör vattenprover regelbundet tas för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca, Mg, Na, K, Cl och SO_4), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), totalt organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervall (t.ex. var sjätte månad). I tillägg 2 anges ett antal kemiska egenskaper för godtagbart spädvatten.

1.6.3 **Testlösningar**

Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning.

Stamlösningen bör helst beredas genom enkel blandning eller omskakning av testämnet i spädvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få stamlösning av lämplig koncentration.

I vissa fall kan lösnings- eller dispergeringsmedel (lösningsagenter) behövas för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylsulfoxid, dimetylformamid och trietylenglykol. Lämpliga dispergeringsmedel är t.ex. Cremophor RH40, Tween 80, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Om man använder agenter som är biologiskt lättnedbrytbara (t.ex. aceton) eller agenter med hög flyktighet bör man iaktta särskild försiktighet eftersom sådana agenter kan orsaka problem med bakterieansamling vid genomflödestest. Om en lösningsagent används får den inte ha signifikant verkan på fisktillväxten eller framkalla synliga skadliga verkningar på de unga exemplaren (verkningar som framkommit vid test med rent lösningsmedel).

▼B

För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut stamlösning av testämnet så att man får en tillförsel av en serie koncentrationer till testkärlen. Stamlösningens och spädvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. Resultaten från ett ringtest (3) har visat att en vattenavlägsning på 6 liter per gram fisk och dag är godtagbar vid test på regnbågslax (se avsnitt 1.8.2.2.).

För halvstatiskt test (statisk förnyelse) beror mediets förnyelsefrekvens på testämnets stabilitet, men daglig förnyelse rekommenderas. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte är stabilt (dvs. utanför området 80 — 120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under ett helt förnyelseintervall måste genomflödestest övervägas.

1.6.4 **Val av fiskart**

De flesta erfarenheterna från ringtest (1) (3) gäller regnbågslax *(Oncorhynchus mykiss)* och därför rekommenderas denna art för testet. Även andra väldokumenterade arter kan användas, men då måste testförfarandet eventuellt anpassas så att lämpliga testförhållanden erhålls. Det finns t.ex. erfarenheter från test med sebrafisk (Da-*nio rerio)* (4) (5) och ricefish (medaka, Oryzias *latipes)* (6) (7) (8). 1 ett sådant fall måste motiveringen för valet av art och testmetod rapporteras.

1.6.5 **Förvaring av fisk**

Testfiskarna ska tas från en population från en enda stam, helst från samma romläggning. Fiskarna bör, under minst två veckor före testets början, hållas i vatten med samma kvalitet och ljusförhållanden som det som används under testet. Fiskarna bör utfodras med en minimiportion på 2 % kroppsvikt per dag, helst 4 % kroppsvikt per dag, under hela förvaringsperioden och under testet.

Efter en inledande period på 48 timmar registreras mortaliteten och följande kriterier tillämpas:

— Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av populationen bör hela satsen förkastas.

— Om mortaliteten ligger mellan 5 och 10 % av populationen fortsätts acklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mortaliteten under den andra sjudagarsperioden är högre än 5 % bör hela satsen förkastas.

— Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av populationen kan satsen godtas.

Fiskarna bör inte ges behandling mot sjukdomar under de två veckorna före testet eller under testets gång.

▼B

1.7 TESTUTFORMNING

Begreppet ”testutformning” hänför sig till valet av antalet testkoncentrationer och deras inbördes nivåskillnad, antalet kärl vid varje koncentration och antalet fiskar per kärl. Vid testutformningen bör följande beaktas:

a) Undersökningens syfte.

b) Den statistiska analysmetod som kommer att användas.

c) Tillgången till försöksresurser och deras kostnader.

När det gäller undersökningens syfte bör man, om möjligt, specificera de statistiska krav som gäller för detekteringen av en given skillnad (t.ex. avseende tillväxthastighet) eller, alternativt, den noggrannhet med vilken EC_x (t.ex. x = 10, 20 eller 30 och helst inte under 10) måste bestämmas. Utan detta kan en hållbar definition av undersökningens storlek inte ges.

Det är viktigt att vara medveten om att en utformning som är optimal (bästa utnyttjande av resurser) för en viss metod för statistisk analys inte nödvändigtvis är optimal för en annan. Den utformning som rekommenderas för uppskattning av LOEC/NOEC är därför inte densamma som den utformning som rekommenderas för regressionsanalys.

1 de flesta fall är regressionsanalys att rekommendera framför variansanalys. Motiveringen till detta diskuteras av Stephan och Rogers (9). Om ingen lämplig regressionsmodell finns att tillgå ($r^2 < 0,9$) bör NOEC/LOEC användas.

1.7.1 **Utformning för regressionsanalys**

Följande faktorer är viktiga vid utformningen av ett test som ska analyseras med regression:

a) Den koncentration vid vilken verkningar observeras (t.ex. $EC_{10,20,30}$) och det koncentrationsområde som är av intresse med tanke på testämnets verkningar måste omfattas av de koncentrationer som används vid testet. Den noggrannhet med vilken man kan bestämma den koncentration vid vilken verkningar observeras är bäst när den berörda koncentrationen ligger i mitten av det testade koncentrationsområdet. Ett preliminärt orienterande försök kan vara till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

b) För att göra det möjligt att uppnå en tillfredsställande statistisk modell bör testet inbegripa minst ett kontrollkärl och fem extra kärl vid olika koncentrationer. När en lösningsagent används och när det är lämpligt bör ett kontrollkärl som innehåller lösningsagenten vid den högsta testade koncentrationen köras utöver testserien (se avsnitten 1.8.3 och 1.8.4).

c) En lämplig geometrisk eller logaritmisk serie (10) (se tillägg 3) kan användas. Fördelningen av testkoncentrationerna ska helst vara logaritmisk.

▼B

d) Om man har tillgång till fler än sex kärl bör de extra kärlen användas för replikat eller fördelas över koncentrationsområdet i syfte att minska skillnaderna mellan de olika koncentrationsnivåerna. Dessa båda alternativ är likvärdiga.

1.7.2 **Utformning för bestämning av NOEC/LOEC med variansanalys (ANOVA)**

Det ska helst finnas replikatkärl vid varje koncentration och den statistiska analysen bör göras på kärlnivå (10). Utan replikatkärl kan man inte beakta variabiliteten mellan kärl utöver den som beror på individuella skillnader mellan fiskar. Erfarenheterna har dock visat (11) att variabiliteten mellan kärl i de undersökta fallen har varit mycket liten jämförd med variabiliteten inom kärlet (dvs. mellan olika fiskar). Det är därför ett relativt godtagbart alternativ att göra den statistiska analysen pä nivån för individuella exemplar.

I regel används minst fem testkoncentrationer i en geometrisk serie med en faktor som helst inte bör överskrida 3,2.

När ett test utförs med replikatkärl bör antalet replikatkontrollkärl och därmed antalet fiskar i regel vara det dubbla jämfört med antalet vid testkoncentrationerna, och vid testkoncentrationerna bör antalet vara lika stort (13) (14) (15). Om däremot replikatkärl inte används bör antalet fiskar i kontrollgruppen vara lika stort som antalet vid varje testkoncentration.

Om man utgår från att ANOVA ska grunda sig på kärl i stället för individuella fiskar (det senare fallet skulle innebära antingen individuell märkning av fiskarna eller användning av pseudospecifika tillväxthastigheter [se avsnitt 2.1.2]), måste man ha ett tillräckligt antal replikatkärl för att möjliggöra bestämning av standardavvikelsen för koncentrationerna inom kärlen. Det betyder att frihetsgraderna för fel i variansanalysen bör vara minst 5 (10). Om endast kontrollgrupperna har replikat föreligger det fara för att felvariabiliteten ökar med ökande medelvärde för den berörda tillväxthastigheten. Eftersom tillväxthastigheten sannolikt minskar med ökande koncentration tenderar detta att leda till en överskattning av variabiliteten.

1.8 FÖRFARANDE

1.8.1 **Val och vägning av testfisk**

Det är viktigt att minimera fiskarnas viktvariationer vid testets början. 1 tillägg 1 anges lämpliga storleksområden för de olika arter som rekommenderas för detta test. De individuella vikterna för hela den fisksats som används för testet bor helst ligga inom ± 10 % av den aritmetiska medelvikten, och får under inga omständig- heter överskrida 25 %. Det rekommenderas att ett delprov av fiskar vägs före testet i syfte att uppskatta medelvikten.

▼B

Stampopulationen bör hållas utan foder under 24 timmar före testet. Därefter väljs fiskarna ut slumpmässigt. Fiskarna ges allmän bedövning (t.ex. med en vattenlösning av 100 mg/l trikainmetansulfonat (MS 222) neutraliserad genom tillsats av två delar natriumbikarbonat per del MS 222) och deras våtvikt (avtorkad fisk) bestäms individuellt med den noggrannhet som anges i tillägg 1. Fiskar med vikter inom det planerade området väljs ut och fördelas sedan slumpmässigt mellan testkärlen. Den totala vårvikten för fiskarna i vart och ett testkärl bör registreras. Bedövningen och hanteringen av fiskarna (inbegripet avtorkning och vägning) kan orsaka stress och skador pä de unga exemplaren, särskilt när det gäller små arter. Därför bör unga exemplar hanteras ytterst försiktigt så att stress och skador på testdjuren undviks.

Fiskarna vägs på nytt på testdag 28 (se avsnitt 1.8.6). Om det bedöms vara nödvändigt att räkna om foderportionen, kan fiskarna dock vägas på nytt på testdag 14 (se avsnitt 1.8.2.3). Det finns också andra metoder, t.ex. fotografiska metoder, för att bestämma om fiskarna har vuxit så mycket att portionerna behöver justeras.

1.8.2 **Exponeringsförhållanden**

1.8.2.1 *Varaktighet*

Testets varaktighet är ≥ 28 dagar.

1.8.2.2 *Fisktäthet och antalstäthet*

Det är viktigt att fisktätheten och antalstätheten är anpassade för de arter som testas (se tillägg 1). Om fisktätheten är för hög uppstår trängselstress som leder till minskade tillväxthastigheter och eventuellt också till sjukdomar. Om fisktätheten är for låg kan det uppstå ett territorialt beteende som också kan påverka tillväxten. Fisktätheten ska under alla omständigheter vara så låg att koncentrationen upplöst syrgas kan hållas på minst 60 % ASV utan luftning. Resultaten från ringtest (3) har visat att det för regnbågslax är lämpligt med en fisktäthet på 16 exemplar à 3 — 5 g i en 40-litersvolym. Rekommenderad vattenavlägsning under testet är 6 liter per fisk och dag.

1.8.2.3 *Utfodring*

Fiskarna ska ges lämpligt foder (tillägg 1) i tillräcklig mängd för att möjliggöra en godtagbar tillväxthastighet. Det är viktigt att se till att det inte uppstår mikrobtillväxt och vattenturbiditet. För regnbågslax kan man utgå från att villkoren uppfylls om fiskarna ges en portion på 4 % av kroppsvikten per dag (3) (16) (17) (18). Den dagliga portionen kan delas upp i två lika delar och ges vid två utfodringstillfällen per dag med minst 5 timmars mellanrum. Portionen baserar sig på fiskarnas totala begynnelsevikt i vart och ett av testkärlen. Om fiskarna vägs på nytt på dag 14 kan portionen därefter räknas om. Fiskarna ska inte ges foder under de 24 timmar som föregår vägningen.

▼B

Okonsumerat foder och fekalt material ska dagligen avlägsnas från testkärlen genom omsorgsfull rengöring av kärlets botten genom sugning.

1.8.2.4 *Ljus och temperatur*

Ljusperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade för den art som testas (se tillägg 1).

1.8.3 **Testkoncentrationer**

I regel krävs fem koncentrationer av testämnet, oavsett vilken testutformning som används (se avsnitt 1.7.2). Tidigare kunskaper om testämnets toxicitet (t.ex. från test av akut toxicitet eller preliminära orienterande undersökningar) ar till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer. Om färre än fem testkoncentrationer används måste detta motiveras. Den högsta testkoncentrationen får inte överskrida testämnets löslighetsgräns i vatten.

Om en lösningsagent används för att underlätta beredningen av testlösningar får agentens slutkoncentration i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör helst användas i alla testkärl (se avsnitt 1.6.3). Man bör dock sträva efter att undvika användning av lösningsagenter.

1.8.4 **Kontrollsatser**

Antalet spädvattenskontrollsatser beror på testutformningen (se avsnitten 1.7–1.7.2). Om en lösningsagent används bör testet även omfatta lika stort antal kontrollsatser för lösningsagenten som för spädvattnet.

1.8.5 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Under testets gång bör testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall (se nedan).

Vid genomflödestest bör flödeshastigheterna för spädlösning och testämnets stamlösning kontrolleras regelbundet, helst dagligen. Under testets förlopp får flödeshastigheterna inte variera med mer än 10 %. Om det förväntas att testämneskoncentrationerna kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena (dvs. inom området 80–120 %, se avsnitten 1.6.2 och 1.6.3) är det tillrådligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone vid testets början och därefter varje vecka. Vid test där det inte förväntas att testämnes-koncentrationen kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena (med hänvisning till testämnets stabilitetsdata) är det nödvändigt att analysera alla testkoncentrationer, men enligt samma schema.

Vid halvstatiska test (förnyelsetest) där det förväntas att testämneskoncentrationen kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena är det tillrådligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone när de är nyberedda och strax före förnyelsen. Detta görs vid testets början och därefter varje vecka. Vid test där det inte förväntas att testämneskoncentrationen kommer att hållas inom dessa gränser måste alla testkoncentrationer analyseras enligt samma schema som används för stabilare ämnen.

▼B

Det rekommenderas att resultaten grundar sig på de uppmätta koncentrationerna. Om det däremot finns bevis för att testämnets koncentration i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan resultaten grunda sig på nominella eller uppmätta värden.

Proverna kan behöva filtreras (t.ex. med porstorlek 0,45 μm) eller centrifugeras. Centrifugering rekommenderas. Om testmaterialet inte adsorberas på filter kan dock även filtrering godtas.

Under testets gång mäts upplöst syrgas, pH och temperatur i alla testkärl. Totalhårdhet och salthalt (om relevant) mäts i kontrollsatserna och i ett kärl med den högsta koncentrationen. Upplöst syrgas och salthalt (om relevant) mäts minst tre gånger (vid testets början, mitt och slut). Vid halvstatiskt test rekommenderas att upplöst syrgas mäts oftare, helst före och efter varje vattenförnyelse eller minst en gång i veckan. Vid halvstatiskt test mäts pH i början och i slutet av varje vattenförnyelse och vid genomflödestest minst varje vecka. Hårdheten och alkaliniteten mäts en gång per test. Temperaturen bör mätas dagligen och helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

1.8.6 **Observationer**

Vikt: Vid testets slut vägs alla fiskar (våtvikt, dvs. avtorkade exemplar) antingen i grupper per testkärl eller individuellt. Vägning per testkärl är att föredra eftersom individuell vägning förutsätter att fiskarna har märkts individuellt. Om man gör individuella vägningar för bestämning av individuell specifik tillväxthastighet bör den märkningsteknik som väljs stressa djuren minimalt (ett lämpligt alternativ till frysmärkning är t.ex. användning av färgad tunn fisklina).

Under testperioden bör fiskarna inspekteras dagligen och alla yttre abnormaliteter (t.ex. blödningar eller avfärgning) och onormalt beteende bör registreras. Varje fall av fiskdöd bör registreras, och döda fiskar bör avlägsnas så snart som möjligt. Döda fiskar ska inte ersättas eftersom fisktätheten och antalstätheten är tillräcklig för att tillväxten inte ska påverkas av ändringar i antalet fiskar per kärl. Mängden foder som ges måste dock justeras.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Det rekommenderas att en statistiker deltar i både utformning och analys av testet, eftersom metoden medger betydande variationer i fråga om testutformning, t.ex. antalet testkärl, antalet testkoncentrationer, antalet fiskar osv. Med hänvisning till de många alternativen för testutformning ges inga specifika anvisningar om statistiska procedurer.

▼B

Tillväxthastigheterna bör inte beräknas för testkärl där mortaliteten överskrider 10 %. Mortaliteten bör dock anges för alla testkoncentrationer.

Oavsett vilken metod som väljs för analys av data består det centrala konceptet av den specifika tillväxthastigheten mellan tidpunkten t, och tidpunkten t,. Denna kan definieras på flera olika sätt, beroende på om fiskarna är individuellt märkta eller inte och om det krävs ett kärlmedelvärde.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

där:

r_1 = individuell fiskspecifik tillväxthastighet

r_2 = specifik medeltillväxthastighet i kärlet

r_3 = pseudospecifik tillväxthastighet

w_1, w_2 = vikten hos en viss fisk vid tidpunkten t_1 respektive t_2

$\log_e w_1$ = logaritmen av vikten hos en individuell fisk vid testperiodens början

$\log_e w_2$ = logaritmen av vikten för en individuell fisk vid testperiodens slut

$\log_e W_1$ = medelvärdet för logaritmerna av värdena w_1 för fiskarna i kärlet vid testperiodens början

$\log_e W_2$ = medelvärdet för logaritmerna av värdena w_2 för fiskarna i kärlet vid testperiodens slut

t_1, t_2 = tidpunkten (dagar) vid testperiodens början och slut

r_1, r_2, r_3 kan beräknas för perioden dag 0–28 och i tillämpliga fall (t.ex. om mätning har gjorts dag 14) för perioderna dag 0–14 och dag 14–28.

2.1.1 **Analys av resultaten genom regression (koncentration-respons-modellering)**

Denna analysmetod innebär att en lämplig matematisk modell anpassas till förhållandet mellan den specifika tillväxthastigheten och koncentrationen. Genom modellen kan man uppskatta EC_X. dvs. önskat EC-värde. När denna metod används behöver r inte beräknas för individuella fiskar (r_1), utan analysen kan i stället basera sig på kärlets medelvärde for r (r_1). Den senare metoden är att föredra. Den är också lämpligare när man använder de minsta arterna.

Karlmedelvärdena för de specifika tillväxthastigheterna (r_2) plottas grafiskt mot koncentrationen, vilket ger möjlighet att granska förhållandet mellan koncentration och respons.

▼B

En lämplig modell bör väljas för att uttrycka förhållandet mellan r_2 och koncentrationen. Valet måste motiveras på tillbörligt sätt.

Om antalet fiskar som överlever inte är lika stort i varje kärl bör modellanpassningen, antingen den är enkel eller icke-linjär. viktas för att kompensera för de olika stora grupperna.

Den metod som används för anpassning av modellen måste ge möjlighet att uppskatta t.ex. EC_{20} och få fram spridningen kring värdet (standardfel eller konfidensintervall). Kurvan för den anpassade modellen bör visualiseras i förhållande till data så att det framgår i hur hög grad modellen stämmer (9) (19) (20) (21).

2.1.2 **Analys av resultaten för uppskattning av LOEC**

Om testet har omfattat replikering av kärl vid alla koncentrationsnivåer kan uppskattningen av LOEC basera sig på en variansanalys (ANOVA) av kärlmedelvärdet för specifik tillväxthastighet (se avsnitt 2.1) åtföljd av en lämplig metod (t.ex. Dunnetts eller Williams test (13) (14) (15 (22)) för jämförelse av medelvärdet r för varje koncentration med medelvärdet r för kontrollsatserna, i syfte att hitta den lägsta koncentration för vilken denna skillnad är signifikant vid en sannolikhetsnivå på 0,05. Om de antaganden som krävs för parametriska metoder inte uppfylls – onormal fördelning (t.ex. Shapiro-Wilks test) eller variansen är heterogen (Bartletts test) – bör man överväga att homogenisera varianserna genom transformering av data före ANOVA. Alternativt kan viktad ANOVA övervägas.

Om testet inte har omfattat replikering av kärl vid varje koncentration är kärlbaserad ANOVA okänslig eller omöjlig. I en sådan situation är det en godtagbar kompromiss att basera ANOVA på den pseudospecifika tillväxthastigheten r_3 för individuella fiskar.

Medelvärdet r_3 för varje testkoncentration kan sedan jämföras med medelvärdet r_3 för kontrollsatserna. LOEC kan därefter fås fram på ovan beskrivet sätt. Det bör konstateras att denna metod inte beaktar eller ger skydd mot variabiliteten mellan kärl, utöver den variabilitet som beaktas genom variabiliteten mellan individuella fiskar. Erfarenheter har dock visat (9) att variabiliteten mellan kärl är mycket liten jämfört med variabiliteten inom ett kärl (dvs. mellan fiskar). Om individuella fiskar inte inkluderas i analysen bör metoden för identifiering av utanförliggande värden anges tillsammans med en motivering.

2. TOLKNING AV RESULTATEN

Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta koncentrationerna av det toxiska ämnet i testlösningen ligger på nivåer nära analysmetodens detektionsgräns eller – vid halvstatiska test – när koncentrationen av testämnet minskar mellan nyss beredd lösning och lösningen före förnyelsen.

2.3 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

▼B

2.3.1 **Testämne:**

— Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemiska identifieringsdata, inklusive renhet och i tillämpliga fall analysmetod för identifiering av testäm net.

2.3.2 **Testdjur:**

— Vetenskapligt namn.

— Tillgängliga uppgifter om stam, storlek, leverantör, eventuella förbehandlingar osv.

2.3.3 **Testförhållanden:**

— Testförfarande som har använts (t.ex. halvstatiskt test eller genomflödestest, fisktäthet, antalstäthet, osv.).

— Testutformning (t.ex. antalet testkarl, testkoncentrationer och replikat, antalet fiskar per karl).

— Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösningsagenten och dess koncentration anges).

— Nominella testkoncentrationer, de uppmätta värdenas medelvärden och standardavvikelser i testkärlen och den metod med vilken dessa erhölls samt bevis för att mätningarna hänför sig till testämnets koncentratio ner i lösningen.

— Spädvattnets egenskaper: pH, hårdhet, alkalinitet, temperatur, koncentrationen upplöst syrgas, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol, partikelinnehåll, testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar.

— Vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och halten upplöst syrgas.

— Detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta).

2.3.4 **Resultat:**

— Bevis för att kontrollgrupperna uppfyller validitetskriterierna för överlevnad. Data om varje förekomst av fiskdöd.

— Statistiska analystekniker som har använts, statistik baserad på replikat eller fisk, behandlingen av data och motivering för de tekniker som har använts.

— Data i tabellform över individuella fiskvikter och medeltal dag 0, dag 14 (om uppmätt) och dag 28, kärl medelvärde eller pseudospecifika tillväxthastigheter (enligt det som är lämpligt) för periodernadag 0–28, eller eventuellt dag 0–14 och dag 14–28.

— Resultat av den statistiska analysen (regressionsanalys eller ANOVA), helst i tabellform och grafisk form samt LOEC (p=0,05) och NOEC eller EC_X, om möjligt med standardfel (enligt det som är lämpligt).

▼B

— Förekomsten av eventuella ovanliga reaktioner hos fiskarna och eventuella synliga verkningar som har orsakats av testämnet.

3. HÄNVISNINGAR

1. Solbe J. K de LG (1987), Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

2. Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N.). (1990), EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

3. Grossland N. O. (1985), A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, s. 1855–1870.

4. Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M, Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991), Effect of 3,4-dichloroanilinc on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, s. 157–164.

5. Yamamoto, Tokio. (1975), Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

6. Holcombe, G./V.. Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995), Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, s. 287–297.

7. Benoit, D. A., Holcombe, G. \V. and Spehar, R. L. (1991), Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

8. Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985), Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, s. 328–338.

9. Environment Canada (1992), Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

10. Cox D. R. (1958), Planning of experiments. Wiley Edt.

11. Pack S. (1991), Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10–12 December 1991.

12. Dunnett C. W. (1955), A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control,]. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096–1121.

13. Dunnett C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 482–491.

▼B

14. Williams D. A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, s. 103–117.

15. Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994), A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, s. 123–133.

16. Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990), The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus* mykiss. Journal of Fish Biology, 37, s. 33–41.

17. Post, G. (1987), Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

18. Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. 11, s. 1485–1494.

19. DeGraeve, G. M., Cooncy, |. M., Pollock, T. L, Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and Mclntyre, D. O. (1989), Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

20. Norbert-King T. J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05–88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

21. Williams D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, s. 510–531.

Tillägg 1

LÄMPLIGA TESTBETINGELSER OCH FISKARTER SOM REKOMMENDERAS FÖR TESTNING

Art	Rekommenderat temperaturområde (°C)	ljusperiod (timmar)	Rekommenderat intervall för fiskarnas begynnelsevikt (fe)	Mätningsnoggrannhet	Fisktäthet (g/l)	Antalstäthet (antal per liter)	Foder	Testets varaktighet (dagar)
Rekommenderad art								
Oncorhynchus mykiss Regnbågslax	12,5–16,0	12–16	1–5	Närmaste 100 mg	1,2–2,0	4	Torrfoder som är särskilt ägnat för laxyngel	≥ 28
Andra väldokumenterade arter								
Danio rerio Sebrafisk	21–25	12–16	0,050–0,100	Närmaste 1 mg	0,2–1,0	5–10	Levande föda (B*rachionus Artemia)*	> 28
Oryzias latipes ”Ricefish” (Medaka)	21–25	12–16	0,050–0,100	Närmaste 1 mg	0,2–1,0	5–20	Levande föda *(Brachionus Artemia)*	> 28

▼B

Tillägg 2

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART SPÄDVATTEN

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska klorföreningar samt polyklorerade bifeny-er	< 50 ng/l
Total mängd organiskt bundet klor	< 25 ng/l

▼B

Tillägg 3

i logaritmisk serie av koncentrationer lämpliga för toxicitetstest (9)

Kolumn (antalet koncentrationer mellan 100 och 10 eller mellan 10 och 1)(*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) En serie av fem (eller flera) på varandra följande koncentrationer kan väljas ur en kolumn, Mittpunkterna mellan koncentrationerna i kolumn (x) finns i kolumn (2x + 1). De listade värdena kan representera koncentrationer uttryckta som procenthalt per volym eller vikt (mg/l eller µg/l). Värdena kan om nödvändigt multipliceras eller divideras med en eller flera tiopotenser. Kolumn 1 kan användas om det råder betydande osäkerhet om toxicitetsnivån.

▼B

C.15 FISK, KORTTIDSTEST AVSEENDE TOXICITET PA *EMBRYO-* OCH SÄCKYNGELSTADIERNA

1. Metod

Denna metod för korttidstest avseende toxicitet motsvarar OECD TG 212 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid detta korttidstest avseende toxicitet på fiskembryon och säckyngel exponeras levnadsstadierna från nyligen befruktade ägg till slutet av säckyngelstadiet. Inget foder ges vid detta test, och testet avslutas medan säckynglen fortfarande får sin näring från gulesäcken.

Testet är avsett för bestämning av de letala och, i begränsad utsträckning, subletala verkningarna av kemikalier på de specifika stadier och specifika arter som testas. Testet kan ge användbar information i flera avseenden: dels bildar det en brygga mellan test avseende letala verkningar och test avseende subletala verkningar, dels kan det användas som ett screeningtest inför ett komplett test av de tidiga levnadsstadierna eller för test avseende kronisk toxicitet. Dessutom kan det användas för test av arter för vilka uppfödningsteknikerna inte är tillräckligt utvecklade för att täcka perioden för övergång från endogen till exogen utfodring.

Man bör beakta att endast tester som täcker alla stadier av fiskens livscykel i regel kan ge en tillförlitlig uppskattning om en kemikalies kroniska toxicitet för fisk, och att minskad exponering av levnadsfaser kan medföra lägre känslighet och underskattning av den kroniska toxiciteten. Man kan därför anta att ett test på embryon och säckyngel är mindre känsligt än ett komplett test av de tidiga levnadsstadierna, särskilt när det gäller kemikalier som är starkt lipofila (log P_{ow} > 4) och kemikalier med ett specifikt toxiskt verkningssätt. Man kan dock förvänta sig mindre skillnader i känslighet mellan de två testerna när det gäller kemikalier som har ett icke-specifikt, narkotiskt verkningssätt (1).

Fram till offentliggörandet av detta test har de flesta erfarenheterna från test på embryon och säckyngel erhållits med sötvattenfisken *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – sebrafisk). Närmare anvisningar om testförfarandet för denna art finns i tillägg 1. Det finns dock inga hinder för att använda andra arter för vilka det finns erfarenheter att tillgå (tabell 1).

1.2 DEFINITIONER

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest observed effect concentration, LOEC): den lägsta testade koncentrationen av ett testämne vid vilken man kan observera signifikanta verkningar (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som kan observeras vid LOEC.

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No observed effect concentration, NOEC): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

▼B

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Fiskens embryo- och säckyngelstadier exponeras för en serie koncentrationer av testämnet upplöst i vatten. Testprotokollet innehåller en möjlighet att välja mellan halvstatiskt test och genomflödestest. Det valda alternativet beror på testämnets egenskaper. Testet inleds med att befruktade ägg placeras i testkärl. Testet avslutas strax innan någon av gulesäckarna i något av testkärlen har absorberats helt eller innan ynglen i kontrollgrupperna börjar dö på grund av svält. De letala och subletala verkningarna bedöms och jämförs med kontrollgruppernas värden i syfte att bestämma den lägsta koncentrationen vid vilken verkningar observeras och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras. Alternativt kan verkningarna analyseras med hjälp av en regressionsmodell i syfte att uppskatta den koncentration som framkallar en given procentuell verkan (t.ex. LC/EC_x, där x är en definierad procentuell verkan).

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Man bör ha tillgång till resultaten från ett test avseende akut toxicitet (se metod C.1), som helst ska ha utförts med samma art som används för detta test. Sådana resultat kan vara till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer för testet på tidiga levnadsstadier. Testämnets vattenlöslighet (inbegripet lösligheten i testvattnet) och ångtryck måste vara kända. Man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningen. Metoden bör ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.

För definition av testförhållandena bör man ange bl.a. testämnets strukturformel, ämnets renhet, stabilitet i ljus, stabilitet i testförhållandena. pKa, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C. 4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Den totala överlevnaden hos de befruktade äggen i kontrollgrupperna, och i tillämpliga fall i kärlen med rent lösningsmedel, måste vara högre eller lika med de gränsnivåer som definieras i tilläggen 2 och 3.

— Koncentrationen löst syrgas måste under hela testet ligga mellan 60 och 100 % av luftmättnadsvärdet (ASV).

— Under testet får vattentemperaturen inte variera med mer än ± 1,5 °C mellan olika testkärl eller mellan påföljande dagar. Vattentemperaturen bör hållas inom de temperaturgränser som specificerats för den art som används (se bilagorna 2 och 3).

▼B

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Testkärl**

Kärl av glas eller annat kemiskt inert material kan användas. Kärlen måste vara tillräckligt stora med tanke på lämplig fisktäthet (se avsnitt 1.7.1.2). Det rekommenderas att kärlen placeras slumpvis i testutrymmet. En randomiserad blockutformning med en behandling per block är att föredra framför en fullständigt randomiserad utformning, i de fall där det i laboratoriet förekommer sådana systematiska effekter som kan kontrolleras med hjälp av blockuppdelning. Eventuell blockuppdelning måste beaktas i de efterföljande dataanalyserna. Testkärlen bör avskärmas från oönskade störningar.

1.6.2 **Val av fiskart**

I tabell 1A anges rekommenderade fiskarter. Det hindrar inte att andra arter används (se exemplen i tabell 1B), men då måste testförfarandet eventuellt justeras så att lämpliga testförhållanden kan säkerställas. I ett sådant fall måste testrapporten innehålla en motivering för valet av art och testmetod.

1.6.3 **Förvaring av fiskyngel**

Närmare uppgifter om lämplig förvaring av fiskyngelstammen finns i OECD TG 210 ([1]) och i hänvisningarna (2), (3), (4), (5), (6).

1.6.4 **Hantering av embryon och yngel**

Embryon och yngel kan exponeras i mindre kärl, placerade i huvudkärlet, med sidor eller ändar av nät som möjliggör ett flöde av testlösning genom kärlet. För att få ett icke-turbulent flöde genom dessa små kärl kan de hållas hängande från en arm som sänker och höjer kärlen (de får dock inte höjas över ytan). Ett sifonspolat system kan också användas. Befruktade ägg av laxfiskar kan hållas på ställningar eller galler med så stora öppningar att ynglen kan falla igenom efter kläckningen. Om halvstatiskt testförfarande med fullständig daglig förnyelse används rekommenderas pasteur-pipetter för avlägsnandet av embryon och yngel (se avsnitt 1.6.6).

Om äggbehållare, galler eller nät har använts för att hålla äggen inom huvudkärlet tas dessa tillbehör bort efter att ynglen har kläckts ([1]), med undantag av nät som behövs för att hålla fiskarna på plats. Om yngel måste flyttas får de inte utsättas för luft, och nät får inte användas för att släppa ut fisk från äggbehållare (dessa säkerhetsåtgärder ar eventuellt inte nödvändiga om arten inte är så känslig, t.ex. när man använder karp). Överföringstidpunkten varierar beroende på art och det är inte alltid nödvändigt med en överföring. Vid halvstatiskt test kan man använda bägare eller grunda behållare, vid behov försedda med ett nät som finns en bit ovanför bägarens botten. Om bägarnas volym är tillräcklig med tanke på fisktätheten (se 1.7.1.2) är det eventuellt inte nödvändigt att överföra embryon eller yngel.

([1]) OECD. Paris. 1992,. Test Guideline 210. ”Fish. Early-life Stage Toxicity Test”.

▼B

1.6.5 **Vatten**

Som testvatten kan användas allt vatten som uppfyller de kemiska kraven för godtagbart spädvatten enligt tillägg 4 och i vilket testarternas kontrollgrupper har minst den överlevnadsgrad som anges i tilläggen 2 och 3. Testvattnet bör ha konstant kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH-värde får variera med högst ± 0,5 pH-enheter. För att säkerställa att spädvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testämnet) eller har skadliga verkningar på yngelstammens prestanda, tas vattenprover regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca, Mg, Na, K, Cl och SO4), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), totalt organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervall (t.ex. var sjätte månad).

1.6.6 **Testlösningar**

Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning.

Stamlösningen bör helst beredas genom enkel blandning eller omskakning av testämnet i spädvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få stamlösning av lämplig koncentration. Man bör så långt som möjligt undvika att använda lösnings- eller dispergeringsmedel (lösningsagenter). Sådana medel kan dock i vissa fall behövas för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol. Lämpliga dispergeringsmedel är t.ex. Cremophor RH40, Tween 80, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Om man använder agenter som är biologiskt lättnedbrytbara (t.ex. aceton) eller agenter med hög flyktighet bör man iaktta särskild försiktighet eftersom sådana agenter kan orsaka problem med bakterieansamling vid genomflödestest. Om en lösningsagent används får den inte ha signifikant verkan på överlevnaden eller framkalla synliga skadliga verkningar på tidiga levnadsstadier (verkningar som framkommit vid test med rent lösningsmedel). Användningen av sådana ämnen bör undvikas med alla medel.

Vid halvstatiskt test kan man välja mellan två olika förnyelseförfaranden. Det ena innebär att nya testlösningar bereds i rena kärl och överlevande ägg och yngel överförs försiktigt till de nya kärlen i en liten volym gammal lösning, samtidigt som man undviker exponering för luft. Det andra förfarandet innebär att organismerna hålls kvar i kärlen medan en andel (minst tre fjärdedelar) av testvattnet byts ut. Hur ofta mediet måste förnyas beror på testämnets stabilitet, men daglig förnyelse rekommenderas. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte är stabilt (dvs. utanför området 80–120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under ett helt förnyelseintervall, måste genomflödestest övervägas. Under alla omständigheter bör man undvika att stressa ynglen när man förnyar vattnet.

▼B

För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut stamlösning av testämnet, så att man får en tillförsel av en serie koncentrationer till testkärlen. Stamlösningens och spädvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. En flödeshastighet som motsvarar minst fem testkärlsvolymer per 24 timmar har konstaterats vara lämplig (2).

1.7 FÖRFARANDE

I litteraturen finns information om kapaciteten hos toxicitetstest på fiskembryon och säckyngel. Ett antal exempel på litteratur finns i hänvisningarna (7), (8), (9).

1.7.1 **Exponeringsförhållanden**

1.7.1.1 *Varaktighet*

Testet bör helst inledas inom 30 minuter efter befruktning av äggen. Embryona läggs i testlösningen före eller så snart som möjligt efter att blastocysten påbörjar klyvning, och under alla omständigheter innan gastrulastadiet inleds. Om äggen kommer från en kommersiell leverantör kan det hända att det inte är möjligt att starta testet strax efter befruktningen. Testets känslighet kan allvarligt påverkas av en försenad teststart. Testet måste inledas inom åtta timmar efter befruktningen. Eftersom ynglen inte utfodras under exponeringsperioden, bör testet avslutas strax innan någon av gulesäckarna i något av testkarlen har absorberats helt eller innan ynglen i kontrollgrupperna börjar dö på grund av svält. Testperiodens längd beror på den art som används. Vissa rekommendationer gällande testperiodens längd finns i tilläggen 2 och 3.

1.7.1.2 *Fisktäthet*

Antalet befruktade ägg vid testperiodens början bör vara tillräckligt med tanke på statistiska krav. Äggen fördelas slumpmässigt mellan behandlingsgrupperna. För varje koncentration används minst 30 befruktade ägg, jämnt fördelade (eller så jämnt det är möjligt – med vissa arter är det svårt att få likadana satser) mellan minst tre likadana testkärl. Fisktätheten (biomassa per volym testlösning) får inte vara högre än att man kan hålla koncentrationen löst syrgas på minst 60 % ASV utan luftning. För genomflödestest rekommenderas en fisktäthet som inte överskrider 0,5 g/l per 24 timmar och som under inga omständigheter överskrider 5 g/l lösning (2).

1.7.1.3 *Ljus och temperatur*

Ljusperioden och vattentemperaturen bör anpassas till den art som testas (tilläggen 2 och 3). Temperaturövervakningen kan gärna ordnas med hjälp av ett extra testkärl.

▼B

1.7.2 **Testkoncentrationer**

I regel krävs fem koncentrationer av testämnet. Koncentrationerna bör ligga i en serie med en konstant faktor som inte överskrider 3,2. När man väljer testkoncentrationsområde är det viktigt att beakta kurvan som visar sambandet mellan LC_{50} och exponeringsperioden vid test avseende akut toxicitet. I vissa fall kan det vara motiverat med mindre än fem koncentrationer, t.ex. vid gränstest, och ett snävare koncentrationsintervall. Om mindre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Ämneskoncentrationer som är högre än LC_{50} under 96 timmar eller 100 mg/l, beroende på vilken som är lägre, behöver inte testas. Ämnen får inte testas ovanför sin löslighetsgräns i testvattnet.

Om en lösningsagent används för att underlätta beredningen av testlösningar (se avsnitt 1.6.6) får agentens slutkoncentration i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör användas i alla testkärl.

1.7.3 **Kontrollsatser**

En kontrollsats med spädvatten (med tillämpliga replikat) och, om det är relevant, en kontrollsats med lösningsagenten (med tillämpliga replikat) bör köras utöver testserierna.

1.7.4 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Under testets gång bör testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall.

Vid halvstatiskt test, där testämnets koncentration bör hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen (dvs. inom området 80–120 %, se avsnitten 1.4 och 1.6.6), rekommenderas att de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone analyseras strax efter beredningen och strax före förnyandet vid minst tre tillfällen som är jämnt fördelade över testperioden (analyserna görs på ett prov av samma lösning – när den är nyberedd och när den förnyas).

Om det är förväntat att testämnets koncentration inte kommer att hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen (på grundval av stabilitetsdata om ämnet) måste alla testkoncentrationer analyseras, när de är nyberedda och när de förnyas, men enligt samma schema (dvs. vid minst tre tillfällen som är jämt fördelade över hela testperioden). Bestämning av testämnets koncentration före förnyandet behöver bara göras på ett replikatkärl per testämneskoncentration. Intervallet mellan bestämningarna får inte vara längre än sju dagar. Det rekommenderas att resultaten grundar sig på de uppmätta koncentrationerna. Om det däremot finns bevis för att testämnets koncentration i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan resultaten grunda sig på nominella eller uppmätta startvärden.

Vid genomflödestest kan man lämpligen använda samma provtagningsschema som för halvstatiskt test (även om mätningen av ”gammal” lösning då inte är tillämplig). Om testperioden sträcker sig över mer än sju dagar kan det vara tillrådligt att utöka antalet provtagningstillfällen under den första veckan (t.ex. tre mätningsomgångar) för att kontrollera att testkoncentrationerna hålls stabila.

▼B

Proverna kan behöva centrifugeras eller filtreras (t.ex. med porstorlek 0,45 μm). Eftersom det inte alltid är möjligt att separera den icke-biotillgängliga fraktionen av testämnet från den biotillgängliga fraktionen genom centrifugering eller filtrering bör emellertid dessa behandlingar undvikas.

Under testets förlopp mäts upplöst syrgas, pH och temperatur i alla testkärl. Totalhårdhet och salthalt (om relevant) mäts i kontrollsatserna och i ett kärl med den högsta koncentrationen. Upplöst syrgas och salthalt (om relevant) mäts minst tre gånger (vid testets början, mitt och slut). Vid halvstatiskt test rekommenderas att upplöst syrgas mäts oftare, helst före och efter varje vattenförnyelse eller minst en gång i veckan. Vid halvstatiskt test mäts pH i början och i slutet av varje vattenförnyelse och vid genomflödestest minst varje vecka. Hårdheten mäts en gång per test. Temperaturen bör mätas dagligen och helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

1.7.5 **Observationer**

1.7.5.1 *Stadiet för embryonal utveckling*

Det embryonala stadium (dvs. gastrulastadium) som råder när exponeringen för testämnet inleds bör bekräftas så exakt som möjligt. Detta kan göras på ett representativt prov av ägg som har förvarats på lämpligt sätt. Även litteratur kan konsulteras i fråga om beskrivning och illustration av de embryonala stadierna (2), (5), (10) och (11).

1.7.5.2 *Kläckning och överlevnad*

Observationer av kläckning och överlevnad bör göras minst en gång per dag. Alla antal bör registreras. Det kan vara önskvärt med tätare observationer i början av testperioden (t.ex. med 30 minuters intervall under de tre första timmarna) eftersom överlevnadstiderna i vissa fall kan ha större relevans än blotta antalet dödsfall (t.ex. när det förekommer akuta toxiska verkningar). Döda embryon och yngel bör avlägsnas så snart de observeras, eftersom förruttnelse kan ske snabbt. Yttersta försiktighet bör iakttas när döda individer avlägsnas så att man inte slår till eller orsakar fysiska skador på närliggande ägg eller yngel eftersom de är extremt sköra och känsliga. Kriterierna för död varierar beroende på levnadsstadium:

— **Ägg**: särskilt i tidiga stadier en tydligt förlust av genomskinlighet och färgförändringar orsakade av koagulering eller utfällning av protein, vilket leder till ett vitt ogenomskinligt utseende.

— **Embryon**: avsaknad av kroppsrörelse, avsaknad av hjärtslag eller ogenomskinlig missfärgning hos arter vars embryon normalt är genomskinliga.

— **Yngel**: orörlighet, avsaknad av andningsrörelse, avsaknad av hjärtslag, vit ogenomskinlig färgning av centrala nervsystemet eller avsaknad av reaktion på mekanisk stimulering.

▼B

1.7.5.3 *Onormalt utseende*

Gulesäckens absorptionsstadium och antalet yngel som har onormal kroppsform eller pigmentering bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd och karaktären hos de abnormaliteter det gäller. Man bör beakta att onormala embryon och yngel även förekommer av naturliga skäl, och kan för vissa arter uppgå till flera procent i kontrollgruppen (kontrollgrupperna). Onormala djur bör inte avlägsnas från testkärlet förrän de har dött.

1.7.5.4 *Onormalt beteende*

Abnormaliteter, t.ex. hyperventilation, okoordinerat simmande och atypisk passivitet bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd. Sådana verkningar kan vara svåra att kvantifiera men kan, när de observeras, vara till hjälp vid tolkningen av dödlighetsdata, dvs. ge upplysningar om ämnets toxiska verkningssätt.

1.7.5.5 *Längd*

Vid testets slut rekommenderas matning av individuella längder. Om det förekommer röta på stjärtfenan eller frätning av fenorna bör standardlängder användas. I ett väl utfört test bör variationskoefficienten med avseende på längden hos replikaten i kontrollgrupperna i regel vara ≤ 20 %.

1.7.5.6 *Vikt*

Vid testets slut kan individuella vikter bestämmas. Härad är torrvikt (24 timmar vid 60 °C) att föredra framför våtvikt (avtorkning). I ett väl utfört test bör variationskoefficienten med avseende på vikt för replikaten i kontrollgrupperna i regel vara ≤ 20 %.

Från dessa observationer fås följande data, till alla delar eller delvis, för statistisk analys:

— Kumulativ mortalitet.

— Antalet friska yngel vid försökets slut.

— Tidpunkten för kläckningens början och slut (dvs. kläckning till 90 % i varje replikat).

— Antalet yngel som kläcks per dag.

— Längd (och vikt) för överlevande djur vid testets slut.

— Antalet yngel som är missbildade eller har onormalt utseende.

— Antalet yngel som beter sig onormalt.

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Det rekommenderas att en statistiker deltar i både utformning och analys av testet, eftersom metoden medger betydande variationer i fråga om testutformning, t.ex. antalet testkärl, antalet testkoncentrationer, ursprungligt antal befruktade ägg och vilka parametrar som mäts. Med hänvisning till de många alternativen för testutformning ges inga specifika anvisningar om statistiska procedurer.

Om man avser att uppskatta LOEC- eller NOEC-värden är det nödvändigt att analysera variationerna inom varje replikatgrupp med hjälp av variansanalys (ANOVA) eller kontingenstabellprocedurer. För multipla jämförelser mellan resultaten vid enskilda koncentrationer och resultaten för kontrollgrupperna kan Dunnetts metod rekommenderas (12), (13). Det finns också exempel på andra användbara metoder (14), (15). Storleken på den verkan som kan detekteras med hjälp av ANOVA eller andra procedurer (dvs. testets kapacitet) beräknas och rapporteras. Anmärkningsvis kan konstateras att analys med ANOVA inte lämpar sig för alla observationer som uppräknas i avsnitt 1.7.5.6. Kumulativ mortalitet och antalet friska yngel i slutet av testet kan t.ex. analyseras med probitmetoder.

Om man avser att uppskatta värden på LC eller EC_x bör en eller flera kurvor, t.ex. logistisk kurva, anpassas till relevanta data med hjälp av en statistisk metod, t.ex. minsta kvadrat-metoden eller ickelinjär minsta kvadratmetod. Kurvan (kurvorna) parametriseras så att relevanta värden på LC eller EC_x och motsvarande standardfel kan uppskattas direkt. Därigenom underlättas beräkningen av konfidensintervallet kring LC eller EC_x betydligt. Tvåsidig konfidens på 95 % bör tillämpas, utom när det finns goda skäl för att föredra avvikande konfidensnivåer. Anpassningsproceduren bör helst ge tillgång till ett medel för bedömning av signifikansen eller bristen på signifikans. Grafiska metoder för kurvanpassning kan användas. Regressionsanalys är lämplig för alla observationer som uppräknas i avsnitt 1.7.5.6.

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta koncentrationerna av det toxiska ämnet i testlösningen ligger på nivåer nära analysmetodens detektionsgräns. Likaså bör man vara försiktig vid tolkning av resultaten när det galler koncentrationer ovanför ämnets vattenlöslighetsgräns.

2.3 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.3.1 **Testämne:**

— Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemiska identifieringsdata, inklusive renhet och i tillämpliga fall analysmetod för kvantificering av testämnet.

▼B

2.3.2 **Testdjur:**

— Vetenskapligt namn, stam, antalet föräldrafiskar (dvs. hur många honor som behövdes för produktion av det antal ägg som användes i testet), ursprung, metoden för insamling av befruktade ägg och efterföljande behandling av äggen.

2.3.3 **Testförhållanden:**

— Testförfarande som har använts (t.ex. halvstatiskt test eller genomflödestest, tiden mellan befruktningen och testets början, fisktäthet osv.).

— Ljusperiod(er).

— Testets utformning (t.ex. antalet testkärl och replikat, antalet embryon per replikat).

— Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösningsagenten och dess koncentration anges).

— Nominella testkoncentrationer, uppmätta värden, deras medelvärden och standardavvikelser i testkärlen och den metod med vilken dessa erhölls. Om testämnet är vattenlösligt vid koncentrationer under de testade, måste man bevisa att mätningarna hänför sig till testämnets koncentrationer i lösningen.

— Spädvattnets egenskaper: pH, hårdhet, koncentrationen upplöst syrgas, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol, partikelinnehåll, testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar.

— Vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och halten upplöst syrgas.

2.3.4 **Resultat:**

— Resultaten från eventuella preliminära test gällande testämnets stabilitet.

— Bevis för att kontrollgrupperna uppfyller normerna för total överlevnad för testdjur (tilläggen 2 och 3).

— Data om mortalitet och överlevnad på embryo- och yngelstadiet och total mortalitet och överlevnad.

— Antalet dagar fram till kläckning och antalet kläckta ägg.

— Data om längd (och vikt).

— Förekomst och beskrivning av morfologiska abnormaliteter (i förekommande fall).

— Förekomst och beskrivning av verkningar pä beteendet (i förekommande fall).

— Statistisk analys och behandling av data.

— För test som analyseras med hjälp av ANOVA bör man rapportera den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) vid p = 0,05 och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC) för varje respons som har varit föremål för bedömning, tillsammans med en beskrivning av de statistiska procedurer som har använts och angivelse av hur stark verkan som kunde detekteras.

▼B

— För test som har analyserats med hjälp av regressionstekniker bör man ange LC eller EC_x, konfidensintervall och en kurva med den anpassade modell som har använts för beräkningen.

— Motiveringar för varje avvikelse från denna testmetod.

3. **HÄNVISNINGAR**

(1) Kristensen P. (1990), Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other EELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 sidor, juni 1990.

(2) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 sidor.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. s. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977), The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, s. 121–173.

(6) Legault R. (1958), A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, s. 328–330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987), Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, s. 61–71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985), Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, s. 807–821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986), Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri).* J. Aquatic Toxicology, 9, s. 129–145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969), Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1–4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976), The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina, 36 sidor.

(12) Dunnett C. W. (1955), A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096–1121.

(13) Dunnett C. W. (1964), New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, s. 482–491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980), Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990), Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, s. 321–334.

(16) Environment Canada. (1992), Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS I/RM/28, December 1992, 81 sidor.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991), Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish. *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, s. 126–134.

(18) Meyer A.. Bierman C. H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252, s. 231–236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995), Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, s. 19–28.

20. US EPA (1991), Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias* latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21. US EPA (1991), Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias* latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22. De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L, Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991), Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, s. 1189–1203.

23. Calow P. (1993), Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24. Balon E. K. (1985), Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 sidor.

25. Blaxter J. H. S. (1988), Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, s. 1–58.

Tabell 1A

Fiskarter som rekommenderas för testning

Sötvatten
Oncorhynchus mykis
Regnbågslax (9), (16)
Danio rerio
Sebrafisk (7), (17), (18)
Cyprinus caprio
Karp (8), (19)
Oryzias latipes
Japanese ricefish/Medaka (20), (21)
Pimephales promelas
Fathead minnow (8), (22)

▼B

Tabell 1B

Exempel på övriga väldokumenterade arter som också har använts

Sötvatten	Saltvatten
Carassius auratus Guldfisk (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23), (24), (25)
Lepomis *macrochirus* Solaborre (”Bluegill”) (8)	*Clupea harengus* Sill (24), (25)
	Gadus rnorhua Torsk (24), (25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23), (24), (25)

▼B

Bilaga 1

ANVISNINGAR FÖR TOXICITETSTEST PÅ EMBRYON OCH SÄCKYNGEL AV SEBRAFISK *(BRACHYDAMO RERIO)*

INLEDNING

Sebrafisken härstammar från indiska Coromandel-kusten där den lever i snabbströmmande vatten. Den är en vanlig akvariefisk som tillhör karpfamiljen. Information om vård och odling finns i allmänt tillgängliga referensböcker om tropiska fiskar. En översikt över sebrafiskens biologi och användning för fiskforskning har sammanställts av Laale (1).

Fisken blir sällan längre än 45 mm. Den har en cylinderformad kropp med 7–9 mörkblå silverskiftande strimmor. Strimmorna löper in i stjärt- och analfenorna. Ryggen är olivgrön. Hanarna är slankare än honorna. Honorna är mer silverskiftande och har en svällande buk, särskilt före romläggningen.

Vuxna exemplar klarar av stora variationer i temperatur, pH och vattenhårdhet. För att få friska exemplar som producerar ägg av god kvalitet bör man dock se till att betingelserna är optimala.

Vid romläggningen följer hanen efter honan och trycker sig mot henne, och äggen befruktas efterhand som de kommer ut. Äggen, som är genomskinliga och icke-vidhäftande, faller till botten där de i vissa fall kan bli uppätna av föräldrarna. Romläggningen påverkas av ljus. Om morgonljuset är tillräckligt lägger fisken i regel sin rom under de första timmarna efter soluppgången.

En hona kan producera satser om hundratals ägg med en veckas intervall.

BETINGELSER FÖR FÖRÄLDRAGENERATIONEN, REPRODUKTION OCH TIDIGA LEVNADSSTADIER

Ett antal friska exemplar väljs ut och hålls i lämpligt vatten (se t.ex. tillägg 4) under minst två veckor före planerad romläggning. Fiskgruppen bör ha producerat minst en sats avkomma innan den producerar de ägg som används för testet. Fisktätheten under denna period får inte överskrida 1 gram fisk per liter. Om vattnet byts regelbundet eller om det finns ett reningssystem kan högre täthet tillåtas. Temperaturen i förvaringskärlen bör hållas på 25 ± 2 °C. Fisken bör få varierande foder, såväl vanligt torrfoder som levande foder, t.ex. nyckläckta artemia, mygglarver, daphnia och vita maskar (enkyträer).

Nedan beskrivs två förfaranden som i praktiken har gett tillräcklig mängd friska och befruktade ägg för testningsändamål:

i) 8 hanar och 16 honor placeras i en behållare som innehåller 50 liter spädvatten. Behållaren bör vara avskärmad från direkt ljus och lämnas så ostörd som möjligt i minst 48 timmar. På eftermiddagen till den dag som föregår testets början placeras en romläggningsbricka på akvariets botten. Romläggningsbrickan består av en ram (plexiglas eller annat lämpligt material) som är 5–7 cm hög med ett grovt nät (2–5 mm) fäst upptill och ett fint nät (10–30 μm) nedtill. Ett antal ”romläggningsträd” av otvinnat nylonrep fästes vid det grova nätet. Efter att fiskarna har hållits i mörker i 12 timmar utsätts de för ett svagt ljus som stimulerar till romläggning. Två till fyra timmar efter romläggningen tas romläggningsbrickan bort och äggen samlas in. Romläggningsbrickan hindrar fiskarna från att äta upp äggen och underlättar samtidigt insamling av äggen. Fiskgruppen bör ha lagt rom minst en gång innan den lägger den rom som används för testet.

▼B

ii) 5–10 hanar och honor förvaras separat i minst två veckor före den planerade romläggningen. Efter 5–10 dagar har honorna uppsvälld buk och deras genitalpapiller är synliga. Hanfiskarna har inga papiller. Romläggningen utförs i romläggningsbehållare med natförsedd botten (se ovan). Behållaren fylls med spädvatten så att vattendjupet ovanför nätet är 5–10 cm. En hona och två hanar placeras i behållaren två dagar före den planerade romläggningen. Vattentemperaturen ökas stegvis till ett värde som är en grad högre än acklimatiseringstemperaturen. Ljuset släcks och behållarna lämnas så ostörda som möjligt. På morgonen tänds ett svagt ljus för att stimulera romläggningen. Efter 2–4 timmar tas fiskarna bort och äggen samlas in. Om det behövs större äggmängder än en hona kan producera kan man använda tillräckligt antal parallella romläggningsbehållare. De enskilda honornas reproduktionskapacitet registreras före testet (satsens storlek och kvalitet) för att ge möjlighet att välja ut honorna med de bästa reproduktionsegenskaperna för romläggningen.

Äggen överförs till testkärlen med hjälp av glasrör (innerdiameter minst 4 mm) som är försedda med en mjuk sugboll. Vid överföring av äggen bör den medföljande vattenmängden vara så liten som möjligt. Äggen är tyngre än vatten och sjunker ut ur röret. Det är viktigt att se till att ägg (och yngel) inte kommer i kontakt med luft. Ett eller flera prover av satsen eller satserna undersöks i mikroskop för att kontrollera att det inte förekommer irregulariteter i de första utvecklingsstadierna. Det är inte tillåtet att desinfektera äggen.

Mortaliteten för äggen är högst under de första 24 timmarna efter befruktningen. Under denna period är det vanligt med en mortalitet på 5–40 %. Äggen kan degenerera till följd av misslyckad befruktning eller utvecklingsstörningar. Äggens kvalitet verkar bero på fiskhonan, eftersom vissa honor genomgående producerar ägg av god kvalitet medan andra aldrig gör det. Även utvecklingshastigheten och kläckningshastigheten varierar mellan olika satser. Framgångsrikt befruktade ägg och säckyngel överlever till stor del, i regel över 90 %. Vid 25 °C kläcks äggen 3–5 dagar efter befruktningen och gulesäcken har absorberats cirka 13 dagar efter befruktningen.

Den embryonala utvecklingen har definierats väl av Hisaoka och Battle (2). Äggen och nykläckta yngel är genomskinliga och därför kan man följa med fiskens utveckling och observera eventuella missbildningar. Cirka fyra timmar efter romläggningen kan man se skillnaden mellan obefruktade ägg och befruktade ägg (3). För denna undersökning placeras ägg och yngel i små testkärl och granskas under mikroskop.

De testbetingelser som bör användas för de tidiga levnadsstaderna uppräknas i tillägg 2. Optimala värden för pH och spädvattnets hårdhet är 7.8 respektive 250 mg $CaCO_3$/l.

BERÄKNINGAR OCH STATISTIK

En tvåstegsmetod rekommenderas. Först görs en statistisk analys av data gällande mortalitet, onormal utveckling och kläckningstid. Därefter görs en statistisk utvärdering av kroppslängden hos de exemplar som behandlats i koncentrationer vid vilka inga skadliga verkningar på någon av de nämnda parametrarna har detekterats. Denna metod rekommenderas eftersom ett toxiskt ämne selektivt kan döda mindre fisk, förlänga kläckningstiden och framkalla grova missbildningar, vilket leder till missvisande längdmätningsresultat. Dessutom mäts ungefär samma antal fiskar per behandling, vilket säkerställer de statistiska resultatens giltighet.

▼B

BESTÄMNING AV LC_{50} OCH EC_{50}

Procentandelen överlevande ägg och yngel beräknas och korrigeras för mortaliteten i kontrollgrupperna, enligt Abbotts formel (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

där:

P = korrigerad procentandel överlevande,

P' = procentandel överlevande som observerats i testkoncentrationen,

C = procentandelen överlevande i kontrollgruppen.

I mån av möjlighet bestäms LC_{50} vid testets slut med en lämplig metod.

Anvisningar för hur man kan få in morfologiska abnormaliteter i EC_{50}-statistiken har publicerats av Stephan (5).

UPPSKATTNING AV LOEC OCH NOEC

Ett av syftena med testet på ägg och säckyngel är att jämföra koncentrationer över noll med kontrollgruppens koncentrationer, dvs. att bestämma värdet på LOEC. Därför bör förfaranden med multipeljämförelse användas (6), (7), (8), (9). (10).

HÄNVISNINGAR

1. Laale FE W. (1977), The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, s. 121–173.

2. Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958), The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 sidor.

3. Nagel R. (1986), Untersuchungen zur Elproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, s. 173–181.

4. Finney D. J. (1971), Probit Analysis, 3rd cd., Cambridge University Press, Great Britain, s. 1–333.

5. Stephan C. E. (1982), Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B, Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, s. 69–81.

6. Dunnett C. W. (1955), A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control.). Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096–1121.

7. Dunnett C. W. (1964), New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, s. 482–491.

8. Williams D. A. (1971), A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, s. 103–117.

9. Williams D. A. (1972), The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, s. 519–531.

10. Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981), Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Bilaga 2

TESTBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADSKRITERIER FÖR REKOMMENDERADE ARTER

Arter	Temperatur (°C)	Salthalt (0/00)	Ljusperiod (timmar)	Stadierna s längd (dagar)		Typisk testperiod	Överlevnad i kontrollgrupper, (minimum %)	
				Embryo	Säckyngel		Kläcknings-framgång	Efter kläckning
SÖTVATTEN								
Brachydanio rerio Sebrafisk	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till fem dagar efter kläckning (8–10 dagar)	80	90
Oncorhvnchus mykiss Regnbågslax	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30–35	25–30	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 20 dagar efter kläckning (50–55 dagar)	66	70
Cyprinus carpio Karp	21–25	—	12–16	5	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (8–9 dagar)	80	75
Oryzias *latipes Japanese* ricefish/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 5 dagar efter kläckning (13–16 dagar)	80	80
Pimephales *promelas* Fathead minnow	25 ± 2	—	16	4–5	5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (8–9 dagar)	60	70

(1) För embryon.
(2) För yngel.
(a) Mörker for embryon och yngel tills att det gått en vecka efter kläckning, utom när de inspekteras. Därefter dämpad belysning till testets slut.

Bilaga 3

Testsbetingelser, testperiod och överlevnadskriterier för andra väldokumenterade arter

Arter	Temperatur (°C)	Salthalt (0/00)	Ljusperiod (timmar)	Stadiernas längd (dagar)		Typisk period för test på embryo och säckyngel	Överlevnad i kontrollgrupper (minimum %)	
				Embryo	Test på säckyngel		Kläcknings-framgång	Efter kläckning
SÖTVATTEN								
Carassius auratus Guldfisk	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (7 dagar)	—	80
Leopomis macrochirus Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (7 dagar)	—	75
SALTVATTEN								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22–25	15–22	12	1,5	10	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 5 dagar efter kläckning (6–7 dagar)	80	60
Clupea harengus Sill	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 3 dagar efter kläckning (23–27 dagar)	60	80
Gadus morhua Torsk	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 3 dagar efter kläckning (18 dagar)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15–30	12	—	—	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-staditim) till 4 eller 7 dagar efter kläckning (28 dagar)	> 75	80

▼B

BILAGA 4

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART SPÄDVATTEN

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska klorföreningar samt poly-klorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt bundet klor	< 25 ng/l

▼B

C.16 HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (ORALT)

1. METOD

Denna testmetod för akut toxicitet motsvarar OECD TG 213 (1998).

1.1 INLEDNING

Detta test är en laboratoriemetod for bedömning av växtskyddsprodukters och andra kemikaliers akuta toxicitet (oralt) på vuxna arbetsbin.

Vid bedömning och utvärdering av olika ämnens toxiska egenskaper kan det vara nödvändigt att bestämma den akuta toxiciteten (oralt) på honungsbin, t.ex. när det är sannolikt att bin kommer att exponeras för en viss kemikalie. Testet för akut toxicitet (oralt) används för att bestämma bekämpningsmedels och kemikaliers toxicitet för bin. Resultatet av detta test används för att avgöra om det behövs ytterligare utvärderingar. Metoden kan särskilt användas i stegvisa program för bedömning av de risker som bekämpningsmedel kan medföra för bin. Dessa program bygger på en sekventiell arbetsgång från laboratorietoxicitetstest till semifält- och fältförsök (1). Bekämpningsmedel kan testas som verksamma ämnen eller som formulerade produkter.

En giftekvivalent bör användas för att fastställa binas känslighet och testförfarandets noggrannhet.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (oralt): de skadliga verkningar som uppträder inom en period på högst 96 timmar efter oral tillförsel av en engångsdos av testämnet.

Dos: den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikten (μg) testämne per försöksdjur (μg/bi). Den faktiska dosen per enskilt bi kan inte beräknas eftersom bina matas kollektivt, men det går att uppskatta en genomsnittsdos (total konsumtion av testämnet dividerat med antalet testbin i en bur).

LD_{50} (median letal dose) oralt: en statistiskt fastställd engångsdos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur som fått dosen på oral väg. LD_{50}-värdet uttrycks som μg testämne per bi. När det gäller bekämpningsmedel kan testämnet vara ett verksamt ämne eller en formulerad produkt som innehåller ett eller flera verksamma ämnen.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är helt orörligt.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Vuxna arbetsbin honungsbi (Apis *mellifera)* exponeras för en serie doser av testämnet som dispergerats i sackaroslösning. Därefter utfodras bina med samma foder, men utan tillsats av testämne. Mortaliteten registreras dagligen under minst 48 timmar och jämförs med kontrollgruppens värden. Om mortaliteten ökar under perioden 24–48 timmar efter tillförseln, medan kontrollgruppens mortalitet hålls på en godtagbar nivå, dvs. < 10 %, bör testet förlängas till högst 96 timmar. Resultaten analyseras för beräkning av LD_{50} vid 24 och 48 timmar och, om testet har förlängts, även vid 72 och 96 timmar.

▼B

1.4 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Genomsnittsmortaliteten för det totala antalet kontrolldjur får inte överskrida 10 % vid testets slut.

— De värden som erhålls for LD_{50} för giftekvivalenterna ska ligga inom det specificerade området.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Insamling av bin**

För testet används unga vuxna arbetsbin av samma ras, ålder, näringstillstånd osv. Bina tas från adekvat utfodrade, friska, så långt som möjligt sjukdomsfria samhällen med renrasiga drottningar med känd historia och fysiologisk status. Bina bör samlas in på testdagens morgon eller kvällen före testet och hållas i testförhållandena fram till följande dag. Bin som insamlats från yngelfria ramar rekommenderas. Insamling tidigt på våren eller sent på hösten bör undvikas eftersom bina då har genomgått fysiologiska förändringar. Om ett test måste genomföras tidigt pä våren eller sent på hösten kan bina kläckas i en inkubator och födas upp med ”bibröd” (pollen som insamlats från vaxkakan) och sackaroslösning under en vecka. Bin som har behandlats med kemiska ämnen såsom antibiotika, varroabekämpningsmedel osv. får inte användas för toxicitetstest förrän det har gått fyra veckor från att den sista behandlingen avslutades.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsförhållanden**

Burarna bör vara enkla att rengöra och välventilerade. De kan vara tillverkade i t.ex. rostfritt stål, nät eller plast. Även träburar för engångsbruk kan användas. Grupper om tio bin per bur rekommenderas. Burarnas storlek bör anpassas efter antalet bin och vara tillräckligt rymliga.

Bina hålls i mörker i ett testrum med en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relativa fuktigheten, i regel kring 50–70 %, registreras under hela testförloppet. Hanteringen, såsom behandling och observationer, kan däremot genomföras i (dags)ljus. Som foder ges sackaroslösning i vatten med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % vikt per volym). Efter tillförsel av testdoserna ges bina fri tillgång till foder. Utfodringssystemet bör vara utformat på sådant sätt att foderkonsumtionen per bur kan registreras (se avsnitt 1.6.3.1). För utfodringen kan ett cirka 50 mm långt och 10 mm brett glasrör användas, vars öppna ända smalnar av till en diameter på cirka 2 mm.

1.5.3 **Förberedelse av bina**

De insamlade bina fördelas slumpvis i testburarna som placeras ut slumpvis i testrummet.

▼B

Bina kan hållas utan foder i upp till 2 timmar före testets början. Det rekommenderas att bina inte ges foder före behandlingen för att alla bin ska ha jämförbart tarminnehåll vid testets början. Döende bin avlägsnas och ersätts med friska bin före testets början.

1.5.4 **Förberedelse av doserna**

Om testämnet är vattenlösligt kan det dispergeras direkt i en 50 % sackaroslösning. För tekniska produkter och ämnen med låg vattenlöslighet kan ett organiskt lösningsmedel, emulgeringsämnen eller dispergeringsämnen med låg toxicitet användas som vehikel (t.ex. aceton, dimetylformamid eller dimetylsulfoxid). Vehikelkoncentrationen beror på testämnets löslighet och bör vara densamma för alla testkoncentrationer. I regel är en vehikelkoncentration på 1 % lämplig och denna koncentration bör inte överskridas.

Det behövs också lämpliga kontrollösningar, dvs. om lösningsmedel eller dispergeringsmedel används för att lösa upp testämnet måste två separata kontrollgrupper användas: en som får vattenlösning och en som får sackaroslösning med lösningsmedlet eller vehikeln i samma koncentration som används för doseringslösningarna.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 **Test- och kontrollgrupper**

Antalet doser och replikat som testas bör väljas så att de uppfyller de statistiska kraven för bestämning av LD_{50} med 95 % konfidensintervall. I regel används fem doser i en geometrisk serie med en faktor på högst 2,2. Doserna bör täcka området för LD_{50}. Utspädningsfaktorn och antalet doskoncentrationer fastställs med beaktande av toxicitetskurvans lutning (dos i förhållande till mortalitet) och den statistiska metod som används för analys av resultaten. Ett preliminärt test kan användas som stöd för valet av lämpliga doskoncentrationer.

Varje testkoncentration bör ges till minst tre likadana testgrupper med tio bin per grupp. Utöver själva testserierna bör minst tre kontrollgrupper med tio bin per grupp också behandlas. Kontrollgrupper bör också användas för eventuella lösningsmedel eller vehiklar som används (se avsnitt 1.5.4).

1.6.2 **Giftekvivalent**

Testserien bör även omfatta en giftekvivalent. Minst tre doser bör väljas på sådant sätt att de täcker det förväntade LD_{50}-värdet. Minst tre likadana burar med tio bin per bur bör användas för varje testdos. Som giftekvivalent rekommenderas dimetoat, vars LD_{50}-värde (oralt, 24 timmar) enligt rapporterade uppgifter ligger inom området 0,10–0,35 µg verksamt ämne per bi (2). Även andra giftekvivalenter kan godtas förutsatt att man har tillgång till tillräckliga data om förväntad dosrespons (t.ex. paration).

▼B

1.6.3 **Exponering**

1.6.3.1 *Tillförsel av doser*

Varje testgrupp med bin ges 100–200 µl 50 % sackaroslösning i vatten som innehåller den valda koncentrationen av testämnet. För ämnen som har låg löslighet, låg toxicitet eller låg koncentration i formuleringen krävs en större volym, eftersom större proportioner måste användas i sackaroslösningen. Mängden behandlat foder som konsumeras per grupp följs upp. När utfodringsbehållaren är tom (i regel inom 3–4 timmar) tas den ut ur buren och ersätts med en behållare som innehåller ren sackaroslösning. Bina får därefter fri tillgång till sackaroslösning. För vissa ämnen kan högre koncentrationer i testdosen leda till att bina avvisar den och endast konsumerar lite eller inget alls. Efter en period på högst 6 timmar bör okonsumerat behandlat foder ersättas med ren sackaroslösning. Mängden konsumerat behandlat foder uppskattas (t.ex. genom mätning av återstodens volym eller vikt).

1.6.3.2 *Testperiodens längd*

Testet fortsätts i regel i 48 timmar efter det att testlösningen har ersatts med ren sackaroslösning. Om mortaliteten fortsätter att stiga med mer än 10 % efter de första 24 timmarna bör testperioden förlängas (till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

1.6.4 **Observationer**

Mortaliteten registreras när det har gått 4 timmar från testets början och därefter vid 24 timmar och 48 timmar efter tillförsel av dosen. Om det behövs en förlängd testperiod görs efterföljande bedömningar med 24 timmars intervall (upp till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

En uppskattning görs av mängden behandlat foder som konsumeras per grupp. Genom att jämföra hur stor mängd behandlat och obehandlat foder som har konsumerats inom de angivna 6 timmarna kan man få upplysningar om i vilken grad bina accepterar det behandlade fodret.

Alla avvikelser i beteende som observeras under testperioden bör registreras.

1.6.5 **Gränstest (Limit-test)**

I vissa fall (t.ex. om ett testämne förväntas ha låg toxicitet) kan gränstest utföras med 100 µg verksamt ämne per bi, i syfte att demonstrera att LD_{50} är högre än detta värde. Förfarandet bör vara detsamma, dvs. tre likadana testgrupper per testdos, relevanta kontrollgrupper, uppskattning av mängden konsumerat behandlat foder och användning av giftekvivalent. Om det förekommer mortalitet bör ett fullständigt test genomföras. Alla eventuella observerade subletala verkningar bör registreras (se avsnitt 1.6.4).

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Alla uppgifter bör sammanställas i en tabell. Av tabellen ska framgå, för varje testgrupp samt för varje kontrollgrupp och varje giftekvivalentgrupp, antalet bin som använts, mortaliteten vid varje observationstidpunkt och antalet bin med ett beteende som tyder på skadliga verkningar. Mortalitetsdata bör analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, rörligt medelvärde eller binominal sannolikhet} (3), (4). Dosresponskurvor uppritas för varje rekommenderad observationstidpunkt. Kurvornas lutning och median letal dos (LD_{50}) beräknas med 95 % konfidensintervall. Korrigeringar för kontrollgruppens mortalitet kan göras med hjälp av Abbott-korrigering (4), (5). Om det behandlade fodret inte har konsumerats helt bör man göra en uppskattning av hur stor dos av testämnet som har konsumerats per grupp. LD_{50}-värdet uttrycks som µg testämne per bi.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. stabilitet i vatten, ångtryck).

— Kemiska identifieringsdata, inklusive strukturformel, renhet (för bekämpningsmedel t.ex. identiteten och halten av verksamt ämne eller verksamma ämnen).

2.2.2 **Försöksdjur**

— Vetenskapligt namn. ras, ungefärlig ålder (i veckor), insamlingsmetod, insamlingsdatum.

— Information om de samhällen som används för insamling av testbin, inklusive hälsa, eventuella vuxensjukdomar, eventuella förbehandlingar osv.

2.2.3 **Testförhållanden**

— Temperatur och relativ fuktighet i testrummet.

— Förvaringsförhållanden, inklusive burarnas typ, storlek och material.

— Metoder för beredning av stam- och testlösningar (i förekommande fall anges även lösningsmedlet och dess koncentrationer).

— Testets utformning, t.ex. antal testkoncentrationer och deras värden, antalet kontrollgrupper, samt för varje testkoncentration och kontrollgrupp även antalet replikatburar och antalet bin per bur.

— Testdatum.

▼B

2.2.4 **Resultat**

— Resultaten från preliminära test (i förekommande fall).

— Rådata: mortaliteten för varje testad dos vid varje observationstidpunkt.

— Dos-responskurvorna vid testets slut.

— LD_{50}-värden med 95 % konfidensintervall, vid varje rekommenderad observationstidpunkt, för testämnet och för giftekvivalenten.

— Statistiska metoder som har använts för att bestämma LD_{50}.

— Mortaliteten i kontrollgrupperna.

— Övriga biologiska verkningar som har observerats eller uppmätts, t.ex. om bina har betett sig onormalt (inklusive om de avvisat testdosen), konsumtionen av foder i behandlade och obehandlade grupper.

— Varje avvikelse från de här beskrivna testförfarandena samt all annan relevant information.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. EPPO/Council of Europe (1993), Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.l. s. 151–165, March 1993.

2. Gough, H. j., McIndoe, EX., Lewis, G.B. (1994), The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis *mellifera* L.) 1981–1992, Journal of Apicultural Research, 22, s. 119–125.

3. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, s. 99–113.

4. Finney, D. J. (1971), Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

5. Abbott, W. S. (1925), A method for computing the effectiveness of an insecticide, Jour. Econ. Entomol, 18, s. 265–267.

▼B

C.17 HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (KONTAKT)

1. METOD

Denna testmetod för akut toxicitet motsvarar OECD TG 214 (1998).

1.1 INLEDNING

Detta test är en laboratoriemetod för bedömning av växtskyddsprodukters och andra kemikaliers akuta toxicitet (kontakt) på vuxna arbetsbin.

Vid bedömning och utvärdering av de toxiska egenskaperna hos ämnen kan det vara nödvändigt att bestämma den akuta toxiciteten (kontakt) på honungsbin, t.ex. när det är sannolikt att bin kommer att exponeras för en viss kemikalie. Testet för akut toxicitet (kontakt) används för att bestämma bekämpningsmedels och kemikaliers toxicitet för bin. Resultatet av detta test används för att avgöra om det behövs ytterligare utvärderingar. Metoden kan särskilt användas i stegvisa program för bedömning av de risker som bekämpningsmedel kan medföra för bin. Dessa program bygger på en sekventiell arbetsgång från laboratorietoxicitetstest till semifält-och fältförsök (1). Bekämpningsmedel kan testas som verksamma ämnen eller som formulerade produkter.

En giftekvivalent bör användas för att fastställa binas känslighet och testförfarandets noggrannhet.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (kontakt): de skadliga verkningar som uppträder inom en period på högst 96 timmar efter lokal applicering av en engångsdos av testämnet.

Dos: den mängd testämne som appliceras. Dosen uttrycks som vikten (μg) testämne per försöksdjur (μg/bi).

LD_{50} (median letal dose) kontakt: en statistiskt fastställd engångsdos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur på vilka dosen har applicerats. LD_{50}-värdet uttrycks som μg testämne per bi. När det gäller bekämpningsmedel kan testämnet vara ett verksamt ämne eller en formulerad produkt som innehåller ett eller flera verksamma ämnen.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när der är helt orörligt.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Vuxna arbetsbin (honungsbin – Apis *mellifera)* exponeras för en serie doser av testämnet upplöst i lämplig vehikel. Exponeringen sker genom direkt applicering på bröstkorgen (droppar). Testperiodens längd är 48 timmar. Om mortaliteten ökar under perioden 24–48 timmar efter tillförseln, medan kontrollgruppens mortalitet hålls på en godtagbar nivå, dvs. < 10 %, bör testet förlängas till högst 96 timmar. Mortaliteten registreras dagligen och jämförs med kontrollgruppens värden. Resultaten analyseras för beräkning av LD_{50} vid 24 och 48 timmar, och om testet förlängs, vid 72 och 96 timmar.

▼B

1.4 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Genomsnittsmortaliteten för det totala antalet kontrolldjur får inte överskrida 10 % vid testets slut.

— De värden som erhålls för LD_{50} för giftekvivalenten ska ligga inom det specificerade området.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Insamling av bin**

För testet används unga vuxna arbetsbin med samma ålder, näringstillstånd, ras osv. Bina tas från adekvat utfodrade, friska, så långt som möjligt sjukdomsfria samhällen med renrasiga drottningar med känd historia och fysiologisk status. Bina bor samlas in på testdagens morgon eller kvällen före testet och hällas i testförhållandena fram till följande dag. Bin som insamlats från yngelfria ramar rekommenderas. Insamling tidigt på våren eller sent på hösten bör undvikas eftersom bina då har genomgått fysiologiska förändringar. Om test måste genomföras tidigt på våren eller sent på hösten kan bina kläckas i en inkubator och födas upp med ”bibröd” (pollen som insamlats från vaxkakan) och sackaroslösning under en vecka. Bin som har behandlats med kemiska ämnen såsom antibiotika, varroabekämpningsmedel osv. får inte användas för toxicitetstest förrän det har gått fyra veckor från det att den sista behandlingen avslutades.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsförhållanden**

Burarna bör vara enkla att rengöra och välventilerade. Burarna kan vara tillverkade av t.ex. rostfritt stål, nät eller plast. Även träburar för engångsbruk kan användas. Burarnas storlek bör anpassas efter antalet bin och vara tillräckligt rymliga. Grupper om tio bin per bur rekommenderas.

Bina hålls i mörker i ett testrum med en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relativa fuktigheten, i regel kring 50–70 %, bör registreras under hela testförloppet. Hanteringen, såsom behandling och observationer, kan däremot genomföras i (dags)ljus. Sackaroslösning i vatten med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % vikt per volym) används som foder och tillhandahålls fritt för bina med hjälp av en utfodringsanordning. För utfodringen kan ett cirka 50 mm långt och 10 mm brett glasrör användas, vars öppna ända smalnar av till en diameter på cirka 2 mm.

1.5.3 **Förberedelse av bina**

De insamlade bina kan bedövas med koldioxid eller kväve före appliceringen av testämnet. Mängden bedövningsmedel och exponeringstiden för medlet bör minimeras. Döende bin avlägsnas och ersätts med friska bin före testets början.

1.5.4 **Förberedelse av doserna**

Testämnet appliceras upplöst i en vehikel, t.ex. ett organiskt lösningsmedel eller vattenlösning med ett vätmedel. Som organiskt lösningsmedel rekommenderas aceton men även andra organiska lösningsmedel med låg toxicitet kan användas (t.ex. dimetylformamid, dimetylsulfoxid). I fråga om formulerade produkter som är dispergerade i vatten och mycket polära organiska ämnen som inte är lösliga i organiska vehikellösningsmedel kan lösningarna vara enklare att applicera om de bereds i en svag lösning av ett vanligt vätmedel (t.ex. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton eller Tween).

▼B

Lämpliga kontrollösningar bör beredas. I fall där ett lösningsmedel eller ett dispergeringsmedel används för att lösa upp testämnet bör två separata kontrollgrupper användas, en som behandlas med vatten och en som behandlas med lösningsmedlet eller dispergeringsmedlet.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 **Test- och kontrollgrupper**

Antalet doser och replikat som testas bör väljas så att de uppfyller de statistiska kraven för bestämning av LD_{50} med ett konfidensintervall på 95 %. För testet används i regel fem doser i en geometrisk serie vars faktor inte överskrider 2,2. Doserna bör täcka området för LD_{50}. Antalet doser fastställs med beaktande av toxicitetskurvans lutning (dos i förhållande till mortalitet) och den statistiska metod som används för analys av resultaten. Ett preliminärt test kan användas som stöd för valet av lämpliga doser.

Varje testkoncentration bör ges till minst tre likadana testgrupper med tio bin per grupp.

Utöver själva testserierna bör minst tre kontrollgrupper med tio bin per grupp också behandlas. Om ett organiskt lösningsmedel eller ett vätmedel används måste tre extra kontrollgrupper med tio bin per grupp användas för lösningsmedlet eller vätmedlet.

1.6.2 **Giftekvivalent**

En giftekvivalent måste tas med i testserien. Minst tre doser bör väljas på sådant sätt att de täcker det förväntade LD_{50}-värdet. Minst tre likadana burar med tio bin per bur bör användas för varje testdos. Som giftekvivalent rekommenderas dimetoat. vars LD_{50}-värde (kontakt) enligt rapporterade uppgifter ligger inom området 0,10–0,30 μg verksamt ämne per bi (2). Även andra giftekvivalenter kan godtas förutsatt att man har tillgång till tillräckliga data om förväntad dosrespons (t.ex. paration).

1.6.3 **Exponering**

1.6.3.1 *Tillförsel av doser*

De bedövade bina behandlas individuellt genom lokal applicering. Bina väljs slumpmässigt ut för de olika testdoserna och kontrollgrupperna. En volym på 1 μl lösning innehållande testämnet i lämplig koncentration appliceras med mikroapplikator på flanksidan på bröstkorgen av varje bi. Om det är motiverat kan andra volymer användas. Efter appliceringen fördelas bina i testburarna där de bör ha tillgång till sackaroslösning.

1.6.3.2 *Testperiodens längd*

Rekommenderad testperiod är 48 timmar. Om mortaliteten ökar med mer än 10 % när det har gått 24–48 timmar från appliceringen bör testperioden förlängas (till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

▼B

1.6.4 **Observationer**

Mortaliteten registreras vid 4 timmar efter doseringen och därefter vid 24 och 48 timmar. Om det behövs en längre testperiod görs efterföljande bedömningar med 24 timmars intervall (upp till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

Allt avvikande uppförande som observeras under testperioden bör registreras.

1.6.5 **Gränstest**

I vissa fall (t.ex. om ett testämne förväntas ha låg toxicitet) kan gränstest utföras med 100 µg verksamt ämne per bi, i syfte att demonstrera att LD_{50} är högre än detta värde. Förfarandet bör vara detsamma, inklusive tre likadana testgrupper för testdosen, relevanta kontrollgrupper och användning av giftekvivalent. Om det förekommer mortalitet bör ett fullständigt test genomföras. Alla eventuella observerade subletala verkningar bör registreras (se avsnitt 1.6.4).

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Alla uppgifter bör sammanställas i en tabell. Av tabellen ska framgå, för varje testgrupp samt för varje kontrollgrupp och varje giftekvivalentgrupp, antalet bin som använts, mortaliteten vid varje observationstidpunkt och antalet bin med ett beteende som tyder på skadliga verkningar. Mortalitetsdata bör analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, rörligt medelvärde eller binominal sannolikhet) (3), (4). Dos-responskurvor uppritas för varje rekommenderad observationstidpunkt (24, 48 och i förekommande fall 72 och 96 timmar) och kurvornas lutning och median letal dos (LD_{50}) beräknas med 95 % konfidensintervall. Korrigeringar för kontrollgruppens mortalitet kan göras med hjälp av Abbott-korrigering (4), (5). LD_{50}-värdet uttrycks som µg testämne per bi.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. stabilitet i vatten, ångtryck).

— Kemiska identifieringsdata, inklusive strukturformel, renhet (för bekämpningsmedel t.ex. identiteten och halten av verksamt ämne eller verksamma ämnen).

2.2.2 **Försöksdjur**

— Vetenskapligt namn, ras, ungefärlig ålder (i veckor), insamlingsmetod, insamlingsdatum.

— Information om de samhällen som används for insamling av testbin, inklusive hälsa, eventuella vuxensjuk domar, eventuella förbehandlingar osv.

▼B

2.2.3 **Testförhållanden**

— Temperatur och relativ fuktighet i testrummet.

— Förvaringsförhållanden, inklusive burarnas typ, storlek och material.

— Metod för tillförsel av testamnet, t.ex. använt vehikellösningsmedel, tillförd volym testlösning och använd bedövning.

— Testets utformning, t.ex. antal doser och deras storlek, antalet kontrollgrupper, för varje testdos och kon trollgrupp även antalet likadana burar och antalet bin per bur.

— Testdatum.

2.2.4 **Resultat**

— Resultaten från preliminära test (i förekommande fall).

— Rådata: mortaliteten för varje koncentration som testats vid varje observationstidpunkt.

— Dos-responskurvorna vid testets slut.

— LD_{50}-värden med 95 % konfidensintervall, vid varje rekommenderad observationstidpunkt, för testämnet och för giftekvivalenten.

— Statistiska metoder som använts för att bestämma LD_{50}.

— Mortaliteten i kontrollgrupperna.

— Övriga biologiska verkningar som observerats eller uppmätts och all onormal respons från bina.

— Varje avvikelse från de testmetodförfaranden som beskrivs här samt all annan relevant information.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. EPPO/Council of Europe (1993), Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees, EPPO bulletin, Vol. 23, N.l, s. 151–165. March 1993.

2. Gough, H. J., McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994), The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis *mellifera* L.), 1981–1992, Journal of Apicultural Research 22, s. 119–125.

3. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments, Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, s. 99–113.

4. Finney, D. J. (1971), Probit Analysis. 3rd ed.. Cambridge, London and New York.

5. Abbott, W. S. (1925), A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, s. 265–267.

▼B

C.18 BESTÄMNING AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORD VID JÄMVIKT I UPPSLAMMAT JORDPROV

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 106 – Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method (2000).

1.1 INLEDNING

Metoden bygger bland annat på ett ringprov och en workshop för val av jordar för adsorptionstest (1) (2) (3) (4) samt existerande riktlinjer på nationell nivå (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptions- och desorptionstest används för att erhålla grundläggande uppgifter om kemiska ämnens rörlighet och deras fördelning i biosfärens jord, vatten och luft (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Uppgifterna kan utnyttjas för att förutspå eller uppskatta t.ex. ett visst kemiskt ämnes tillgänglighet vid organismernas nedbrytningsprocesser (22) (23) samt, omvandlings- och upptagningsprocesser (24), ämnets urlakning genom jordprofilen (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), ämnets flyktighet från jorden (21) (29) (30) eller ämnets avrinning från land och ytor in i naturliga vatten (18) (31) (32). Adsorptionsdata kan användas för jämförelser och för att skapa modeller (19) (33) (34) (35).

Ett kemiskt ämnes fördelning mellan jord- och vattenfas är en komplex process som beror på flera olika faktorer: ämnets kemiska natur (12) (36) (37) (38) (39) (40), jordfasens egenskaper (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) och klimatbetingade faktorer såsom regn, temperatur, sol och vind. Den mångfald fenomen och mekanismer som deltar i ämnets adsorption i jord kan därför inte beskrivas fullständigt med hjälp av den aktuella testmetoden, som utgör en förenklad laboratoriemodell. Även om detta test inte kan täcka alla tänkbara miljösituationer ger det ändå tillräckliga uppgifter om den betydelse för miljön som adsorptionen av det aktuella ämnet har.

Se även den allmänna inledningen.

1.2 TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Syftet med metoden är att kunna uppskatta ett ämnes adsorptions- och desorptionsbeteende i jordar. Målet är att få ett sorptionsvärde som kan användas för att uppskatta fördelningen när miljöbetingelserna varierar. För detta ändamål bestäms ämnets adsorptionskoefficient i jämvikt i olika jordar som funktion av jordens egenskaper (t.ex. halten av organiskt kol och lera samt jordens textur och pH). Olika jordtyper måste användas för att testet i så hög grad som möjligt ska täcka växelverkan mellan ett ämne och naturligt förekommande jordarter.

Inom ramen för denna metod avser man med begreppet adsorption den process när ett ämne binds till en jordyta, utan att i detta sammanhang skilja mellan olika adsorptionsprocesser (fysikalisk eller kemisk adsorption) eller processer såsom ytkatalyserad nedbrytning, bulkadsorption eller kemisk reaktion. Adsorption, som sker på kolloidala partiklar (diameter < 0,2 um) som har bildats av jordarterna, räknas inte.

▼B

De viktigaste jordparametrarna med tanke på adsorptionen anses vara följande: halten av organiskt kol (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), lerbaken och jordens textur (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) samt joniserbara föreningars pH (3) (4) (42). Andra jordparametrar som kan ha inverkar på adsorption/desorption för ett särskilt ämne är den effektiva katjonbyteskapaciteten (ECEC), halten av amorft järn och aluminiumoxider, särskilt i fråga om vulkaniska och tropiska jordar (4), samt den specifika ytan (49).

Syftet med testet är att utvärdera ett ämnes adsorption i olika jordtyper för vilka halten av organiskt kol, 1er-halten och jordens textur och pH varierar. Testet omfattar tre skeden:

Skede 1: Förberedande undersökningar för att bestämma följande:

— Jord-lösningsförhållandet.

— Tiden för att nä adsorptionsjämvikt och mängden av adsorberat testämne vid jämvikt.

— Testamnets adsorption på testkärlens yta och testämnets stabilitet under testningstiden.

Skede 2: Screeningtest: undersökning av adsorptionen i fem olika jordtyper genom adsorptionskinetik vid en vald koncentration och bestämning av fordelningskoefficienterna K_d och K_{oc}.

Skede 3: Bestämning av Freundlich-adsorptionsisotermer för att fastställa hur koncentrationen inverkar på adsorptionens omfattning i jordar.

Undersökning av desorption genom desorptionskinetik och Freundlich-desorptionsisotermer (bilaga 1).

1.3 MATSTORHETER – DEFINITIONER OCH MATTENHETER

Beteckning	Definition	Måttenhet
A_{t_i}	procentuell adsorption vid tidpunkten t_i	%
A_{eq}	procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massan av testämne som adsorberats i jorden vid tidpunkten t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massan av testämne som adsorberats i jorden under tidsintervallet Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massan av testämne som adsorberats i jorden vid adsorptionjämvikt	µg
m_0	massan av testämne i provröret vid adsorptionstestest början	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massan av testämne uppmät i ett delprov ($v_a{}^A$) vid tidpunkten t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massan av testämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt	µg
m_{jord}	mängd av jordfas, uttryckt som jordens torrmassa	g

▼B

Beteckning	Definition	Måttenhet
C_{st}	masskoncentrationen i ämnets stamlösning	µg cm^{-3}
C_0	ursprunglig masskoncentration i provlösningen som är i kontakt med jord	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	ämnets masskoncentration i vattenfasen vid tidpunkten t_i då analysen utförs	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	halten av ämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	ämnets masskoncentration i vattenfasen vid adsorptionjämvikt	µg cm^{-3}
V_0	ursprunglig volym av vattenfas i kontakt med jord under adsorptionstestet	cm^3
v_a^A	volymen för det delprov som används för att mätta testämnet	cm^3
K_d	adsorptionens fördelningskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	normaliserad adsorptionskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_{om}	normaliserad fördelningskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlich-adsorptionskoefficient	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlich-exponent	
D_{t_i}	procentuell desorption vid tidpunkten t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	procentuell desorption under intervallet Δt_i	%
K_{des}	skenbar desorptionskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlich-desorptionskoefficient	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massan av testämne som desorberats från jord vid tidpunkten t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massan av testämne som desorberats från jord under tidsintervallet Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	analytiskt bestämd ämnesmassa i vattenfasen vid desorptionsjämvikt	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	totala massan av testämne som desorberats vid desorptionsjämvikt	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massan av ämne som förblir adsorberat i jorden tidsintervallet Δt_i	µg
m_{aq}^{A}	massan av ämne som blivit över från adsorptionsjämvikten på grund av ofullständig volymersättning	µg
$C_s^{des}(eq)$	halten av testämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt	µg g^{-1}

▼B

Beteckning	Definition	Måttenhet
$C_{aq}^{des}(eq)$	testämnets masskoncentration i vattenfasen vid desorptionsjämvikt	µg cm^{-3}
V_T	totala volymen vattenfas i kontakt med jord under desorptionskinetiktest enligt seriemetoden	cm^3
V_R	volymen supernatant som har avlägsnats ur röret efter uppnådd adsorptionsjämvikt och som har ersatts med samma volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning	cm^3
v_a^D	volymen delprov som tagits för analytiskt syfte under ett desorptionskinetiktest enligt seriemetoden	cm^3
V_r^r	volymen lösning som tagits ur röret (i) för mättning av testämnet under desorptionskinetiktest (parallellmetod)	cm^3
V_r^F	volymen lösning som vid jämvikt tagits ur röret för mättning av testämnet	cm^3
MB	massbalans	%
m_E	totala massan av testämne som extraherats ur jorden och provkärlets väggar i två steg	µg
V_{rec}	volymen supernatant som insamlats efter uppnådd adsorptionsjämvikt	cm^3
P_{ow}	fördelningskoefficient för oktanol-vatten	
pKa	dissociationkoefficient	
S_w	vattenlöslighet	g l^{-1}

1.4 PRINCIPEN FOR TESTMETODEN

Kända volymer av testämneslösning, omärkta eller radioaktivt märkta och med kända koncentrationer i 0,01 M $CaCl_2$ blandas med jordprover av känd torrvikt som har bringats till jämvikt i 0,01 M $CaCl_2$. Blandningen rörs om tillräckligt länge. Jordsuspensionerna separeras därefter genom centrifugering, och om så önskas kan filtratet och vattenfasen analyseras. Mängden av testämne som adsorberats i jordprovet bestäms som skillnaden mellan den ursprungliga mängden av testämne i lösningen och mängden av kvarvarande testämne i slutet av testet (indirekt metod).

Alternativt kan mängden av adsorberat testämne bestämmas direkt genom jordanalys (direkt metod). Denna procedur, som inbegriper stegvis jordextraktion med lämpligt lösningsmedel, rekommenderas i fall dar skillnaden i lösningens halt av testämne inte kan bestämmas med tillräcklig noggrannhet. Detta kan förekomma om testämnet adsorberas pä provkärlens yta, om testämnet är instabilt inom den tidsskala testet sträcker sig över, om adsorptionen är så svag att halten bara ändras lite eller om adsorptionen är så stark att den resulterande halten ar for låg för att kunna bestämmas med tillräcklig noggrannhet. Om radioaktivt märkt ämne används kan man undvika jordextraktion genom att analysera jordfasen med förbränning och vätskescintilllationsräknare (LSC). LSC är dock en icke-specifik teknik som inte kan skilja mellan ursprungliga ämnen och omvandlingsprodukter och som därför bara kan användas om testämnet är stabilt under hela testet.

▼B

1.5 UPPGIFTER OM TESTÄMNET

De kemiska reagenser som används ska ha hög analytisk renhetsgrad. Rekommenderade testämnen är omärkta ämnen med känd sammansättning och en renhetsgrad på helst minst 95 % eller radioaktivt märkta ämnen med känd sammansättning och radioaktiv renhet. Om spårämnen med kort halveringstid används ska sönderfallskorrigering tillämpas.

Innan adsorptions- och desorptionstestet utförs ska följande uppgifter finnas om testämnet:

a) vattenlöslighet (A.6)

b) ångtryck (A.4) eller Henrys lag-koefficient

c) abiotisk nedbrytning: hydrolys som funktion av pH (C.7)

d) fördelningskoefficient (A.8)

e) ”lätt” biologisk nedbrytbarhet (C.4) eller aerobisk och anaerobisk omvandling i jord

f) pKa för joniserbara ämnen

g) direkt fotolys i vatten (t.ex. UV-Vis-absorptionsspektrum i vatten och kvantutbyte) och fotonedbrytning i jord.

1.6 TESTETS TILLÄMPBARHET

Testet kan tillämpas på kemiska ämnen som kan analyseras med tillräcklig noggrannhet. En viktig parameter som kan påverka tillförlitligheten hos resultaten, särskilt när den indirekta metoden används, är testämnets stabilitet inom testets tidsskala. Ämnets stabilitet måste därför kontrolleras med en förhandsundersökning, och om den visar att det förekommer omvandling inom testets tidsskala är det tillrådligt att huvudundersökningen utförs med analys av både jord- och vattenfasen.

Det kan vara svårt att genomföra testet med ämnen som har låg vattenlöslighet (S_w, $< 10^{-4}$ g l^{-1}) eller med ämnen som har hög elektrisk laddning, eftersom koncentrationen i vattenfasen då inte kan analyseras med tillräcklig noggrannhet. För sådana ämnen krävs vissa extra åtgärder. Närmare anvisningar finns i berörda avsnitt.

Vid testning av flyktiga ämnen är det viktigt att se till att det inte uppstår hanteringsförluster.

1.7 METODBESKRIVNING

1.7.1 **Apparatur och kemiska reagenser**

Normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

a) Provrör eller andra kärl för testet. Det är viktigt att rören eller kärlen

— passar direkt in i centrifugen så att hanterings- och överföringsfel kan undvikas,

— är gjorda av ett inert material så att adsorption av testämnet på rörets eller kärlets yta minimeras.

▼B

b) Skakapparat: rotationsskak eller motsvarande, i ett utförande där jorden hålls i suspension under omrö ringen.

c) Centrifug: helst i höghastighetsutförande, t.ex. med centrifugalkraft > 3 000 g, temperaturkontrollerad och med kapacitet att från vattenlösning separera partiklar med diameter större än 0,2 μm. Under omröring och centrifugering ska behållarna vara täckta med lock så att flyktighets- och vattenförluster kan undvi kas. För att minimera adsorption på locken ska dessa vara deaktiverade, t.ex. teflonbelagda skruvkorkar.

d) Gärna även: filtreringsapparat som har sterila engångsfilter med porositeten 0,2 μm. Särskild vikt ska fäs tas vid valet av filtermaterial så att förluster av testämne på filtret kan undvikas. För svårlösliga testämnen avråds användning av organiska filtermaterial.

e) Analysinstrument lämpliga för mätning av testämnets koncentration.

f) Laboratorieugn som kan hålla en temperatur mellan 103 °C och 110 °C.

1.7.2 **Karakterisering av jordar och urval av jordar för test**

Jordarna karakteriseras med hjälp av tre parametrar som anses vara i hög grad avgörande för adsorptionskapaciteten: organiskt kol, lerbak och jordens textur samt pH. Såsom tidigare nämnts (se avsnittet Tillämpningsområde) kan även andra fysikalisk-kemiska egenskaper hos jorden påverka adsorption och desorption av ett visst ämne, och de ska i så fall beaktas.

Valet av metoder för jordkarakteriseringen är av stor vikt och kan ha betydande inverkan på resultaten. Det rekommenderas därför att jordens pH mäts i en lösning av 0,01 M $CaCl_2$ (dvs. den lösning som används vid adsorptions- och desorptionstestet) enligt gällande ISO-metod (ISO-10390-1). Det rekommenderas också att övriga jordegenskaper av betydelse bestäms enligt standardmetoder (ISO Handbook of soil analysis) så att sorptionsdata kan analyseras på basis av globalt standardiserade jordparametrar. Arbetena (50–52) innehåller viss vägledning om existerande standardmetoder för jordanalys och jordkarakterisering. Det är tillrådligt att använda referensjordar för kalibrering av jordtestmetoderna.

Tabell 1 innehåller anvisningar för valet av jordar för adsorptions- och desorptionstest. De sju utvalda jordarna spänner över jordtyper som finns i tempererade geografiska zoner. För joniserbara testämnen ska de utvalda jordarna sträcka sig över ett stort pH-område så att ämnets adsorption kan bestämmas i joniserad och ojoniserad form. Anvisningar för hur många olika jordar som ska användas i de olika teststegen finns i avsnitt 1.9 (Mätförfarande).

Om andra jordtyper väljs ska de karakteriseras med användning av samma parametrar och ska ha liknande variationer i fråga om de egenskaper som beskrivs i tabell 1, även om de inte behöver motsvara kriterierna fullständigt exakt.

▼B

Tabell 1

Anvisningar för val av jordprover för adsorption och desorption

Jordtyp	pH-område (i 0,01 M $CaCl_2$)	Halt av organiskt kol (%)	Lerhalt (%)	Jordtextur ([1])
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	Clay
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	clay loam
3	5,5–7,0	1,5-3,0	15–25	silt loam
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	loam
5	< 4,0–6,0 ([2])	< 0,5–1,5 ([2]) ([3])	< 10–15 ([2])	loamy sand
6	> 7,0	< 0,5–1,0 ([2]) ([3])	40–65	clay loam/clay
7	< 4,5	> 10	< 10	sand/loamy sand

([1]) Enligt FAO och det amerikanska systemet (85).
([2]) Variablerna ska helst ha värden inom de angivna intervallen. Om det är svårt att hitta lämpligt jordmaterial kan värden under det angivna minimivärdet godtas.
([3]) Jordar med mindre an 0,3 % organiskt kol kan störa korrelationen mellan halten av organiskt material och adsorption. Det är därför tillrådligt att använda jordar med en minimihalt av 0,3 % organiskt kol.

1.7.3 **Provtagning och förvaring av jordprover**

1.7.3.1 *Provtagning*

Det finns inga särskilda rekommendationer om specifika metoder eller verktyg för provtagning. Provtagningsmetoden beror på undersökningens syfte (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Följande aspekter ska beaktas:

a) Platsen ska beskrivas i detalj, bl.a. genom läge, vegetationstäcke, behandlingar med bekämpnings- och gödningsmedel, biologiska tillsatser eller oavsiktlig förorening. Beskrivningen av provtagningsplatsen ska följa rekommendationerna i ISO-standarden för tagning av jordprover (ISO 10381-6).

b) Provtagningsplatsen ska anges med UTM-koordinater (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) eller geografiska koordinater. På så sätt kan man längre fram ta nya prover av viss jord. Det kan också underlätta bestämningen av jorden enligt de olika ländernas klassificeringssystem. Vidare ska endast A-horisont tas, ned till ett maximidjup på 20 cm. För jord 7 gäller särskilt att om det finns O_h-horisont närvarande i jorden ska denna horisont tas med i provet.

]ordproverna ska transporteras i behållare, och temperaturbetingelserna ska vara sådana att jordprovernas ursprungliga egenskaper inte förändras i någon signifikant grad.

▼B

1.7.3.2 *Förvaring*

Jordproverna ska helst användas färska. Om detta inte är möjligt ska jorden förvaras lufttorkad i omgivningstemperatur. Det finns inga rekommenderade gränser för förvaringstiden, men om ett jordprov är äldre än tre år måste det analyseras pä nytt avseende halten av organiskt kol, pH och CEC.

1.7.3.3 *Hantering och beredning av jordprover för test*

Jordproverna lufttorkas vid omgivningstemperatur (helst 20–25 °C). Finfördelningen ska göras så varsamt som möjligt för att minimera ändringarna i jordens ursprungliga textur. Jordarna sållas till en partikelstorlek < 2 mm med beaktande av rekommendationerna i ISO-standarden om tagning av jordprover (ISO 10381-6). Omsorgsfull homogenisering rekommenderas eftersom resultatens reproducerbarhet då förbättras. Fukthalten i varje jordprov bestäms i tre delprover genom torkning vid 105 °C tills ingen signifikant viktändring längre kan registreras (cirka 12 timmar). Vid alla beräkningar som omfattar jordmassa avses ugnstorkad massa, dvs. jordens vikt korrigerad med en fukthaltsfaktor.

1.7.4 **Beredning av testämnet före kontakten med jord**

Testämnet upplöses i en lösning av 0,01 M $CaCl_2$ i destillerat eller avjoniserat vatten. $CaCl_2$-lösningen används som vattenlösningsfas för att förbättra centrifugeringen och minimera katjonbytet. Stamlösningens koncentration ska helst vara tre tiopotenser högre an analysmetodens detektionsgräns. Genom denna tröskel säkerställs tillräcklig mätnoggrannhet med den använda metoden. Dessutom ska stamlösningens koncentration vara lägre än testämnets vattenlöslighet.

Stamlösningen ska helst beredas strax före kontakten med jordproverna och förvaras i stängd behållare vid 4 °C. Förvaringstiden beror på testämnets stabilitet och dess koncentration i lösningen.

Hjälplösningsmedel för upplösning av testämnet ska bara användas om ämnet är svårlösligt ($S_w < 10^{-4}$ g t^{-1}). Hjälplösningsmedlet ska a) vara blandbart med vatten, t.ex. metanol eller acetonitril, ska b) ha en koncentration som inte överskrider 1 % av stamlösningens totalvolym och en koncentration som är under 1 % i den testämneslösning som kommer i kontakt med jorden (helst under 0,1 %) och får c) inte vara ett ytaktivt ämne eller genomgå solvolytiska reaktioner med testamnet. Användningen av ett hjälplösningsmedel måste vara föreskriven och ska motiveras i rapporten.

Ett annat alternativ för att tillföra ett svårlösligt testämne i testsystemet är att använda tillsats (spiking). Det innebär att testämnet upplöses i ett organiskt lösningsmedel, och ett delprov av denna lösning tillsatts systemet bestående av jord och 0,01 M $CaCl_2$-lösning i destillerat eller avjoniserat vatten. Halten av organiskt lösningsmedel i vattenfasen ska hällas så låg som möjligt, normalt ska den inte överskrida 0,1 %. Tillsats från en organisk lösning kan innebära att reproducerbarheten går förlorad i fråga om volymen, dvs. ett nytt fel kan komma in eftersom testämnets och hjälplösningsmedlets koncentration inte är samma i alla test.

▼B

1.8 FÖRUTSÄTTNINGAR FÖR UTFÖRANDE AV ADSORPTIONS- OCH DESORPT1ONSTEST

1.8.1 **Analysmetod**

Följande nyckelparametrar kan påverka sorptionsmätningarnas noggrannhet: noggrannheten hos den metod som används för att analysera lösningen och de adsorberade faserna, testämnets stabilitet och renhet, uppnåendet av sorptionsjämvikt, storleksordningen på lösningens koncentrationsändring, förhållandet mellan jord och lösning samt ändringar i jordens struktur under jämviktsprocessen (35) (59–62). Noggrannheten tas upp i några av exemplen i tillägg 2.

Analysmetodens tillförlitlighet måste kontrolleras inom testets sannolika koncentrationsområde. Det står laboratoriet fritt att utveckla en lämplig metod med lämpliga värden i fråga om noggrannhet, reproducerbarhet, detektionsgränser och utbyte. Anvisningar för hur ett sådant test kan utföras ges nedan.

En lämplig volym av 0,01 M $CaCl_2$ (t.ex. 100 cm^2 rörs om under 4 timmar med en viktmängd (t.ex. 20 g) jord som har hög adsorptionsförmåga, dvs. hög halt av organiskt kol och lera. Dessa vikter och volymer kan variera beroende på analysbehoven, men ett jord-lösningsförhållande på 1:5 är en lämplig utgångspunkt. Blandningen centrifugeras och vattenfasen kan filtreras. En bestämd volym av testämnets stamlösning tillsätts till vattenfasen så att den nominella koncentrationen kommer inom testets sannolika koncentrationsområde. Volymen ska vara högst 10 % av vattenfasens slutliga volym, så att karaktären hos den jämviktade jordlösningen ändras så lite som möjligt. Lösningen analyseras.

Ett blindprov bestående av systemet jord + $CaCl_2$-lösning (utan testämne) måste ingå, för kontroll av falska indikationer i analysmetoden och matriseffekter orsakade av jorden.

Bland de analysmetoder som kan användas för sorptionsmätningar ingår gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC), spektrometri (t.ex. GC-masspektrometri och HPLC-masspektrometri) och vätskescintillationsräknare (för radioaktivt märkta ämnen). Oavsett vilken metod som används gäller kriteriet att metoden anses lämplig om utbytet är mellan 90 % och 110 % av det nominella värdet. För att möjliggöra detektion och utvärdering efter det att ämnet fördelats måste analysmetodens detektionsgränser vara minst två tiopotenser under den nominella koncentrationen.

Egenskaper och detektionsgränser hos den analysmetod som används vid adsorptionstest spelar en viktig roll när det gäller att definiera testbetingelserna och testets totala provningsprestanda. Den föreliggande metoden följer ett allmänt testförlopp och innehåller rekommendationer och anvisningar för alternativa tillvägagångssätt i fall där analysmetoden och laboratoriets betingelser kan medföra begränsningar.

▼B

1.8.2 **Val av optimalt förhållande mellan jord och lösning**

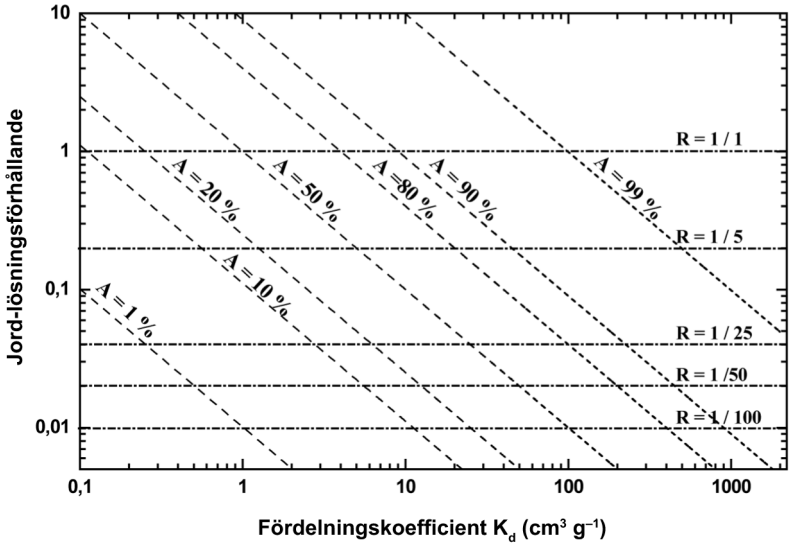
Valet av lämpligt jord-lösningsförhållande för sorptionsundersökningar är beroende av fördelningskoefficienten K_d och den önskade relativa adsorptionsgraden. Ämnets koncentrationsändring i lösningen avgör mätningens statistiska noggrannhet – grundat på adsorptionsekvationens form och analysmetodens gränser – vid detektion av ämnets koncentration i lösningen. För vanligt bruk är det därför praktiskt att bestämma sig för en uppsättning konstanta standardförhållanden för vilka adsorptionen är över 20 %, och helst över 50 % (62), samtidigt som man ska se till att testämnets koncentration i vattenfasen hålls så pass hög så att den kan mätas med tillräcklig noggrannhet. Detta är särskilt viktigt när adsorptionsprocenterna är höga.

Ett lämpligt tillvägagångssätt för att välja lämpliga jord-lösningsförhållanden grundar sig på estimering av K_d-värdet, antingen genom förberedande undersökningar eller genom vedertagna estimeringsmetoder (tillägg 3). Valet av lämpligt förhållande kan sedan göras med hjälp av ett diagram där jord-lösningsförhållandet har avsatts mot K_d för konstanta adsorptionsprocenter (figur 1). Härvid antas att adsorptionsekvationen är linjär ([1]). Det sökta sambandet erhålls genom att bilda om ekvation 4 för K_d så att den får formen enligt ekvation 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

eller logaritmisk form med antagande av att $R = m_{soil}/V_0$ and $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$



Figur 1 Sambandet mellan jord-lösningsförhållande och K_d vid olika procenthalter av adsorberat testämne

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

I figur 1 visas jord-lösningsförhållandet som funktion av K_d för olika adsorptionsnivåer. Exempel: För jord-lösningsförhållandet 1:5 och K_d = 20 blir adsorptionen cirka 80 %. För att få en adsorption på 50 % med samma K_d måste förhållandet 1:25 användas. Detta sätt att välja jord-lösningsförhållande ger möjlighet att anpassa till olika testningsbehov.

Däremot är det svårare att hantera områden där ämnet adsorberas väldigt mycket eller väldigt litet. Vid låg adsorption rekommenderas jord-lösningsförhållandet 1:1, men för vissa mycket organiska jordtyper kan ännu lägre förhållanden behövas för att erhålla slurry. Analysmetoden måste ägnas stor uppmärksamhet när det gäller matning av små ändringar i lösningens koncentration, annars blir adsorptionsmätningen inexakt. Å andra sidan kan man vid mycket höga värden på fördelningskoefficienten K_d gå upp till ett jord-lösningsförhållande på 1:100 för att lämna en signifikant mängd av ämnet i lösningen. Då är det viktigt med god omröring och att systemet får tillräcklig tid på sig för att uppnå jämvikt. Ett alternativt sätt är att uppskatta K_d-värdet med hjälp av estimeringsmetoder som t.ex. grundar sig på P_{ow}-värden (tillägg 3). Detta kan vara särskilt användbart för lågadsorberande och polära ämnen med $P_{ow} < 20$ och för lipofila och starkt sorptiva ämnen med $P_{ow} > 10^4$.

1.9 MÄTFÖRFARANDE

1.9.1 **Testbetingelser**

Alla test ska göras i omgivningstemperatur och om möjligt vid en konstant temperatur mellan 20 °C och 25 °C.

Centrifugeringsbetingelserna ska vara sådana att partiklar större än 0,2 μm kan avlägsnas från lösningen. Detta värde anger den minsta partikelstorleken för fasta partiklar och bildar gränsen mellan fasta och kolloidala partiklar. Anvisningar om lämpliga centrifugeringsbetingelser finns i bilaga 4.

Om det inte går att säkerställa att partiklar större an 0,2 um avlägsnas vid centrifugeringen, kan en kombination av centritugering och filtrering med 0,2 μm filter användas. Filtermaterialet ska vara inert så att det inte uppstår förluster av testamnet pä filtret. Under alla omständigheter måste det dokumenteras så att det inte uppstår förluster av testämnet under filtreringen.

1.9.2 **Skede 1 – Förberedande undersökning**

Syftet med den förberedande undersökningen beskrivs i avsnittet Tillämpningsområde. Anvisningar för hur en sådan förberedande undersökning kan läggas upp ges nedan.

1.9.2.1 *Val av optimala jord-lösningsförhållanden*

Två jordtyper och tre jord-lösningsförhållanden används (för sex tester). En av jordtyperna har hög halt av organiskt kol och låg lerhalt, och den andra typen har låg halt avorganiskt kol och hög lerhalt. Följande förhållanden föreslås:

— 50 g jord och 50 cm^3 vattenlösning av testämnet (förhållande 1:1),

▼B

— 10 g jord och 50 cm^3 vattenlösning av testämnet (förhållande 1:5),

— 2 g jord och 50 cm^3 vattenlösning av testämnet (förhållande 1:25).

Den minsta mängd jord som behövs för testet beror på laboratoriets utrustning och analysmetodernas prestanda. För tillförlitliga testresultat rekommenderas dock minst 1 g, helst 2 g.

Ett kontrollprov med enbart testämnet i 0,01 M $CaCl_2$-lösning (ingen jord) testas enligt exakt samma procedur som används för testsystemet, för att kontrollera testämnets stabilitet i $CaCl_2$-lösningen och dess eventuella adsorption på testkärlets ytor.

Ett blindprov per jord, med samma mängd jord och en totalvolym på 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-lösning (utan testämne) testas på samma sätt. Detta blindtest fungerar som bakgrundskontroll under analysen så att man kan detektera störande ämnen eller förorenade jordar.

Alla test, även kontroll- och blindtest, ska utföras minst två gånger. Det totala antalet prover som ska beredas för undersökningen bestäms utifrån den metod som används.

Metoderna för den förberedande undersökningen och huvudundersökningen är i regel desamma. I förekommande fall nämns skillnader som är av betydelse.

De lufttorkade jordproverna bringas till jämvikt genom omröring med en minimivolym på 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ över natten (12 timmar) dagen före testet. Därefter tillsätts en bestämd volym av testämnets stamlösning för att justera den slutliga volymen till 50 cm^3. Den tillsatta mängden av stamlösning ska a) vara högst 10 % av vattenfasens slutliga volym på 50 cm^3 för att minimera ändringen av karaktären hos den jämviktade jordlösningen och b) helst ge en ursprunglig koncentration av testämnet som är i kontakt med jorden (C_0) som är minst två tiopotenser högre än analysmetodens detektionsgräns. Med denna tröskel säkerställs möjligheten att utföra tillräckligt noggranna mätningar även när stark adsorption inträffar (> 90 %) och möjligheten att längre fram bestämma adsorptionsisotermerna. Helst ska också, om det är möjligt, ämnets ursprungliga koncentration (C_0) inte överskrida hälften av dess löslighetsgräns.

Nedan ges ett exempel på beräkning av stamlösningens koncentration (C_M). För beräkningen gäller antagandet att detektionsgränsen är 0,01 µg cm^{-3} och adsorptionen 90 %. Sålunda ska den ursprungliga koncentrationen av testämne i kontakt med jorden helst vara lug cm^3 (två tiopotenser högre än detektionsgränsen). Under antagandet att den maximala rekommenderade volymen stamlösning tillsätts, dvs. 5 cm^3 till 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-jämviktslösning (= 10 % stamlösning till 50 cm^3 total volym av vattenfas), bör stamlösningens koncentration vara 10 µg cm^3, dvs. tre tiopotenser högre än analysmetodens detektionsgräns.

Vattenfasens pH ska mätas före och efter kontakt med jorden eftersom pH-värdet spelar en viktig roll för hela adsorptionsprocessen, särskilt när det gäller joniserbara ämnen.

▼B

Lösningen rörs om så länge att adsorptionsjämvikt uppnås. Tiden för att nå jämvikt varierar kraftigt beroende på ämnet och jorden. I regel räcker 24 timmar (77). Vid den förberedande undersökningen kan sekventiella prover tas under en omröringstid på 48 timmar, t.ex. vid 4, 8, 24 och 48 timmar, men analystidpunkterna kan också anpassas till arbetsschemat på laboratoriet.

Det finns två alternativ för analys av testämnet i vattenlösningen: a) parallellmetoden och b) seriemetoden. Det måste betonas att parallellmetoden, även om den tar längre tid att utföra, innebär enklare matematisk behandling av resultaten (tillägg 5). Valet av metod måste avgöras utifrån laboratoriets tillgängliga utrustning och resurser.

a) Parallellmetoden: Prover med samma jord-lösningsförhållande bereds. Antalet prover bestäms av antalet tidsintervall som används för undersökning av adsorptionskinetiken. Efter centrifugering och i förekommande fall filtrering tas det första rörets vattenfas till vara så fullständigt som möjligt och mäts efter t.ex. 4 timmar, det andra rörets vattenfas mäts efter 8 timmar, det tredje rörets efter 24 timmar osv.

b) Seriemetoden: Endast två likadana prover bereds för varje jord-lösningsförhållande. Faserna separeras genom centrifugering med bestämda tidsintervall. Ett litet delprov av vattenfasen analyseras omedelbart med avseende på testämnet, och därefter fortsätts testet med den ursprungliga blandningen. Om filtrering utförs efter centrifugeringen bör laboratoriet ha lämplig utrustning för filtrering av små delprover av vattenlösning. Det rekommenderas att den totala volymen delprover som tas inte överskrider 1 % av lösningens totalvolym, så att det inte uppstår signifikanta ändringar i jord-lösningsförhållandet och minskningar i den mängd av löst ämne som är tillgänglig för adsorption under testet.

Den procentuella adsorptionen A_{t_i} beräknas för varje tidpunkt (t_i) på grundval av den nominella ursprungskoncentrationen och den uppmätta koncentrationen vid tidpunkten för provtagningen (A_{t_i}), med korrigering för blindprovets värde. En kurva där avsätts mot tiden (figur 1 i tillägg 5) ritas upp för uppskattning av jämviktsplatån ([1]). Likaså beräknas K_d-värdet vid jämvikt. Utifrån detta K_d-värde väljs lämpliga jord-lösningsförhållanden i figur 1 så att den procentuella adsorptionen hamnar över 20 %, och helst över 50 % (61). De tillämpliga ekvationerna och principerna för uppritningen av kurvan ges i avsnittet ”Data och rapportering” och i bilaga 5.

1.9.2.2 *Bestämning av adsorptionens jämviktstid och mängden av testämne som adsorberats vid jämvikt*

Kurvor där A_{t_i} ellerhar C_{aq}^{ads} avsatts mot tiden används, såsom tidigare nämnts, för att uppskatta när adsorptionsjämvikt inträtt och vilken mängd av testämne som adsorbcrats vid jämvikt. 1 figur 1 och 2 i tillägg 5 finns exempel på sådana kurvor. Jämviktstiden är den tid som systemet behöver för att nå en platå.

([1]) Jämviktsplatån kan också uppskattas genom att i ett diagram avsätta testämnets koncentration i vattenfasen ($\left(C_{aq}^{ads}\right)$)mot tiden (se figur 2 i bilaga 5).

▼B

Om en viss jord inte ger upphov till någon platå utan en oavbruten ökning, kan detta bero på komplicerande faktorer såsom biologisk nedbrytning eller långsam diffusion. Biologisk nedbrytning kan konstateras genom att man upprepar testet med ett steriliserat prov av jorden. Om man fortfarande inte uppnår någon platå är det skäl att forska efter andra tänkbara faktorer. Detta kan göras med lämpliga ändringar av testbetingelserna (temperatur, omröringstider, jord-lösningsförhållande etc.). Testledaren får avgöra om det är värt att fortsätta testet även om jämvikt inte kan uppnås.

1.9.2.3 *Adsorption på testkärlets yta och testämnets stabilitet*

Vissa indikationer rörande testämnets adsorption på testkärlets yta och rörande testämnets stabilitet kan fås fram genom analys av kontrollproverna. Om en minskning som är större än analysmetodens standardfel konstateras kan detta bero på abiotiskt sönderfall och/eller adsorption på testkärlets yta. För att avgöra vilket fenomen som är aktuellt tvättas testkärlets grundligt med en känd volym av lämpligt lösningsmedel, varefter tvättlösningen analyseras med avseende på testämnet. Om analysen visar att ingen adsorption på testkärlets yta har skett, beror minskningen på att testämnet är abiotiskt instabilt. Om adsorption kan konstateras, är det nödvändigt att byta till testkärl av annat material. Dessa resultat gällande adsorption på testkärlets yta kan dock inte direkt extrapoleras till testet med jord och lösning, eftersom adsorptionen i det senare fallet påverkas av att jord ar närvarande.

Ytterligare uppgifter om testämnets stabilitet kan fas fram genom att man gör upp en massbalans som funktion av tiden. Detta görs genom att vattenfasen, extrakt av jord samt testkärlets väggar analyseras med avseende på testamnet. Skillnaden mellan massan av tillsatt ämne och summan av testämnesmassorna i vattenfasen, i jordextrakten och på testkärlets väggar är lika med den massa som brutits ned eller förflyktigats eller som inte har extraherats. En förutsättning för att massbalansen ska kunna bestämmas är att adsorptionsjämvikt uppnås inom den tid som går åt för testet.

Massbalansen bestäms för båda jordarna och för ett jord-lösningsförhällande för respektive jord som vid jämvikt ger en adsorption på över 20 %, och helst över 50 %. När proceduren för att få fram lämpliga jord-lösningsförhållanden har avslutats med analysen av det sista provet av vattenfas efter 48 timmar, separeras faserna genom centrifugering och, om så önskas, filtrering. Så mycket vattenfas som möjligt tas tillvara, och ett lämpligt extraktionslösningsmedel (med extraktionskoefficient på minst 95 %) tillsätts jorden för att testämnet ska extraheras. Minst två extraktioner i följd rekommenderas. Mängden av testämne i extrakten från jord och testkärl bestäms, och massbalansen beräknas (se ekvation 10, Data och rapportering). Om massbalansen är under 90 % anses testämnet vara instabilt inom testets tidsskala. Undersökningarna kan emellertid fortsättas om man tar testämnets instabilitet med i beräkningen, och i sådana fall är det tillrådligt att vid huvudundersökningen analysera båda faserna.

▼B

1.9.3 *Skede 2 – Adsorptionskinetik vid en given koncentration av testämnet*

Fem jordar väljs enligt tabell 1. Det är till fördel om dessa fem jordar inbegriper en del eller alla av de jordar som använts för den förberedande undersökningen. Då behöver skede 2 inte upprepas för den förberedande undersökningens jordar.

Jämviktstiden, jord-lösningsförhållandet, jordprovets vikt, volymen av vattenfasen i kontakt med jord samt testämnets koncentration i lösningen väljs på grundval av resultaten från den förberedande undersökningen. Analys ska helst utföras efter en kontakttid på 2, 4, 6, 8 (eventuellt även 10) och 24 timmar. Omröringstiden kan vid behov förlängas till högst 48 timmar om ämnet kräver längre jämviktstid. Vid behov kan analystidpunkterna anpassas.

Varje test (en jord och en lösning) görs minst två gånger för att man ska få en indikation på resultatens varians. För varje test görs också ett blindtest. Det görs på jord och 0,01 M $CaCl_2$-lösning utan testämne och med samma vikt och volym som vid det riktiga testet. Som kontroll görs samma testprocedur på ett kontrollprov med enbart testämnet i 0,01 M $CaCl_2$-lösning (utan jord) som ett sätt att skydda sig mot oförutsedda faktorer.

Den procentuella adsorptionen beräknas för varje tidpunkt A_{t_i} eller tidsintervall $A_{\Delta t_i}$ (efter behov) och avsätts mot tiden i ett diagram. Likaså beräknas fördelningskoefficienten K_d vid jämvikt samt den normaliserade adsorptionskoefficienten K_{oc} (för opolära organiska ämnen).

Resultat av adsorptionskinetiktest

Det linjära K_d-värdet duger i allmänhet till att med tillräcklig noggrannhet beskriva sorptionsbeteendet i jord (35) (78), och det representerar ett uttryck för ämnenas inherenta rörlighet i jord. Som exempel kan nämnas att allmänt förekommande kemiska ämnen med $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} i regel anses vara kvalitativt rörliga. Ett system för rörlighetsklassificering enligt K_{oc}-värden har konstruerats av MacCall et al. (16). Det finns också system för urlakningsklassificering som bygger på ett samband mellan K_{oc} och DT-50 ([1]) (32) (79).

Enligt felanalyser (61) kan K_d-värden under 0,3 cm^3 g^{-1} inte uppskattas med tillräcklig noggrannhet på grundval av en koncentrationsminskning i vattenfasen, inte ens när det (ur noggrannhetssynpunkt) gynnsammaste jordlösningsförhållandet används, dvs. 1:1. 1 detta fall rekommenderas analys av både jord- och lösningsfasen.

([1]) DT-50: nedbrytningstiden för 50 % av testämnet.

▼B

Med hänvisning till ovannämnda anmärkningar är det tillrådligt att undersökningen av ämnets adsorptionsbeteende i jord och dess potentiella rörlighet fortsätts genom bestämning av Freundlich-adsorptionsisotermer för sådana system där en tillräckligt noggrann bestämning av K_d är möjlig enligt schemat för den föreliggande testmetoden. En noggrann bestämning är möjlig om det värde som fås fram genom att multiplicera K_d med jordlösningsförhållandet är > 0,3 när mätningarna grundar sig på en koncentrationsminskning i vattenfasen (indirekt metod), eller > 0,1 när båda faserna analyseras (direkt metod) (61).

1.9.4 *Skede 3 – Adsorptionsisotermer, desorptionskinetik och desorptionsisotermer*

1.9.4.1 Adsorptionsisotermer

Fem testämneskoncentrationer används, helst så att de sträcker sig över två tiopotenser. Vid valet av koncentrationer ska vattenlösligheten och de resulterande jämviktskoncentrationerna i vattenlösning tas med i beräkningen, jordarnas respektive jord-lösningsförhållanden ska hållas konstanta genom hela undersökningen. Adsorptionstestet utförs enligt beskrivningen ovan, med enda skillnaden att vattenfasen bara analyseras en gång. efter den tid som enligt skede 2 går åt för att uppnå jämvikt. Jämviktskoncentrationerna i lösningen bestäms, och den adsorberade mängden beräknas på grundval av minskningen av testämne i lösningen, eller med hjälp av den direkta metoden. Den adsorberade massan per enhet jordmassa avsätts mot testämnets jämviktskoncentration i ett diagram (se Data och rapportering).

Resultat av adsorptionsisotermtest

Av alla hittills framlagda matematiska adsorptionsmodeller är Freundlich-isotermerna en av de mest använda när det gäller att beskriva adsorptionsprocesser. För närmare uppgifter om hur man tolkar adsorptionsmodeller och om deras betydelse hänvisas till arbetena (41) (45) (80) (81) (82).

Anmärkning: Det bör nämnas att jämförelse av K^-värden (Freundlich-adsorptionskocfficienter) för olika ämnen bara är möjlig om K, -värdena är uttryckta i samma måttenhet (83).

1.9.4.2 Desorptionskinetik

Syftet med detta test är att undersöka om ett ämne adsorberas reversibelt eller irreversibelt i en jord. Denna upplysning är betydelsefull eftersom desorptionsprocessen också spelar en viktig roll för hur ett ämne beter sig i fältjord. Dessutom är desorptionsdata värdefulla som indata när man vill skapa datormodeller för simulering av urlakning och avrinning av lösta ämnen. Om även desorptionen ska undersökas är det tillrådligt att den nedan beskrivna undersökningen utförs på varje system för vilket man kunnat göra en noggrann bestämning av K_d i det föregående adsorptionskinetiktestet.

Desorptionskinetiken kan, på samma sätt som adsorptionskinetiken, undersökas på två alternativa sätt: a) parallellmetoden och b) seriemetoden. Vilken metod som används får avgöras utifrån laboratoriets utrustning och resurser.

▼B

a) Parallellmetoden: För varje jord som har valts för desorptionsundersökning bereds ett antal prover med samma jord-lösningsförhållande. Antalet prover är samma som antalet tidpunkter vid vilka man önskar undersöka adsorptionskinetiken. Helst ska man använda samma tidsintervall som vid adsorptionskinetiktestet, även om totaltiden kan förlängas efter behov så att desorptionsjämvikt uppnås. För varje test (en jord och en lösning) körs ett blindprov. Detta består av jorden och 0,1 M $CaCl_2$-lösning, utan testämne, med samma vikt respektive volym som vid det riktiga testet. Som kontroll utförs samma testprocedur på enbart testämnet i 0,01 M $CaCl_2$-lösning (utan jord). Alla blandningar av jord med lösning rörs om tills adsorptionsjämvikt uppnås (enligt resultaten från skede 2). Därefter separeras faserna med centrifugering, och så mycket som möjligt av vattenfasen avlägsnas. Volymen avlägsnad lösning ersätts med en lika stor volym av 0,01 M $CaCl_2$ utan testämne, och den nya blandningen rörs om igen. Vattenfasen från det första röret tas till vara så fullständigt som möjligt och mäts efter t.ex. 2 timmar, vattenfasen från det andra röret efter 4 timmar, från det tredje efter 6 timmar osv., tills desorptionsjämvikt uppnås.

b) Seriemetoden: Efter adsorptionskinetiktestet centrifugeras blandningen, och så mycket som möjligt av vattenfasen avlägsnas. Den borttagna lösningens volym ersätts med lika stor volym av 0,01 M $CaCl_2$ utan testämne. Den nya blandningen rörs om tills desorptionsjämvikt uppnås. Under denna omröringstid centrifugeras blandningen med bestämda tidsintervall så att faserna separeras. Ett litet delprov av vattenfasen analyseras omedelbart med avseende på testämnet, och därefter fortsätts testet med den ursprungliga blandningen. Volymen för varje enskilt delprov ska vara mindre än 1 % av totalvolymen. Samma mängd av färsk 0,01 M $CaCl_2$-lösning tillsätts blandningen för att bibehålla förhållandet mellan jord och lösning, och omröringen fortsätts under nästa tidsintervall.

Den procentuella desorptionen beräknas för varje tidpunkt ((D_{t_i})) eller tidsintervall ($(D_{\Delta t_i})$) (beroende på vad som krävs för testet) och avsätts mot tiden i ett diagram. Likaså beräknas desorptionskoefficienten K_{des} vid jämvikt. De aktuella ekvationerna finns i avsnittet Data och rapportering och i tillägg 5.

Resultat från desorptionskinetiktest

Adsorptionsprocessens reversibilitet kan uppskattas med hjälp av ett diagram där den procentuella desorptionen D_{t_i} och adsorptionen A_{t_i} har avsatts mot tiden (i samma diagram). Om desorptionsjämvikt uppnås inom två gånger tiden för adsorptionsjämvikt, och den totala desorptionen ar mer än 75 % av den adsorberade mängden, anses adsorptionen vara reversibel.

1.9.4.3 Desorptionsisotermer

Freundlich-desorptionsisotermerna bestäms på de jordar som används i adsorptionsisotermtestet. Desorptionstestet utförs enligt beskrivningen i avsnittet Desorptionskinetik, med undantag av att vattenfasen bara analyseras en gång, vid desorptionsjämvikt. Mängden av desorberat testämne beräknas. Halten av kvarvarande adsorberat testämne i jorden vid desorptionsjämvikt avsätts i ett diagram mot testämnets jämviktskoncentration i lösningen (se Data och rapportering samt tillägg 5).

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

Data från analysen ska presenteras i tabellform (se bilaga 6). De enskilda mätningarna och beräknade medeltal ska anges. Adsorptionsisotermerna ska presenteras i diagramform. Beräkningarna ska göras på nedan beskrivet sätt.

Vid beräkningarna antas att vikten av 1 cm^3 vattenlösning är 1 g. Därför kan jord-lösningsförhållandet uttryckas med samma värde oberoende av om vikt/vikt eller vikt/volym valts som måttenhet.

2.1 ADSORPTION

Adsorptionen (A_{t_i}) uttrycks i procent och definieras såsom förhållandet mellan den mängd av ämne som under testbetingelserna har adsorberats i jorden och den mängd som fanns närvarande vid testets början. Om testämnet är stabilt och inte i någon signifikant grad adsorberas på kärlets väggar beräknas A_{t_i} vid varje tidpunkt t_i enligt följande ekvation:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

där:

A_{t_i} = den procentuella adsorptionen vid tidpunkten t_i (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = massan av testämne som adsorberats i jorden vid tidpunkten t_i (µg),

m_0 = massan av testämne i provröret, vid testets början (µg).

Närmare anvisningar för hur den procentuella adsorptionen A_{t_i} beräknas för parallell- respektive seriemetoden finns i tillägg 5.

Fördelningskoefficienten K_d är förhållandet mellan ämnets halt i jordfasen och ämnets masskoncentration i vattenlösningen när adsorptionsjämvikt har inträtt, under testbetingelserna.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

där:

$C_s^{ads}(eq)$ = halten av adsorberat ämne i jord vid adsorptionsjämvikt (µg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = ämnets masskoncentration i vattenfasen vid adsorptionsjämvikt (µg cm^{-3}). Koncentrationen bestäms på analytisk väg med beaktande av värdet från blindprovet.

$m_s^{ads}(eq)$ = massan av ämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt (µg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = ämnets massa i lösningen vid adsorptionsjämvikt (µg),

m_{jord} = mängd av jordfas, uttryckt som torr jordmassa (g),

v_0 = ursprunglig volym av vattenfas i kontakt med jord (cm^3).

Sambandet mellan A_{eq} och K_d ges av:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{jord}} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

där:

A_{eq} = procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt, %.

Den normaliserade adsorptionskoefficienten för organiskt kol K_{oc} bestämmer sambandet mellan fördelningskoefficienten K_d och halten av organiskt kol i jordprovet:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

där:

% oc = procentuell andel organiskt kol i jordprovet (g g^{-1}).

Koefficienten K_{oc} representerar ett värde som beskriver hur huvudsakligen opolära organiska ämnen fördelas mellan a ena sidan jordens eller sedimentets organiska kol och å andra sidan vattnet. Sådana ämnens adsorption är beroende av den sorberande fasta fasens organiska innehåll (7), och därför beror K_{oc}-värdet på de humösa fraktionernas specifika egenskaper, eftersom sorptionskapaciteten hos dessa fraktioner kan variera kraftigt beroende på deras olika ursprung, uppkomst osv.

2.1.1 **Adsorptionsisotermer**

Ekvationen för Freundlich-adsorptionsisotermer ger sambandet mellan mängden av adsorberat testämne och testämnets koncentration i lösningen vid jämvikt (ekvation 8).

Data behandlas på samma sätt som i punkten ”Adsorption” ovan, och halten av adsorberat testämne i jorden efter adsorptionstestet $C_s^{ads}(eq)$, på andra ställen betecknat som x/m) beräknas för varje provrör, under antagandet att jämvikt har inträtt och att$C_s^{ads}(eq)$representerar jämviktsvärdet:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{jord}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{jord}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlich-adsorptionsekvationen (8) ser ut så här:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

eller i linjär form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

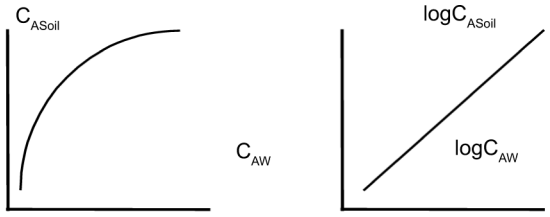
där:

K_F^{ads} = Freundlich-adsorptionskoefficienten, som anges i dimensionen $cm^3\ g^{-1}$ bara om exponenten l/n = 1. 1 alla andra fall införs l/n i dimensionen förK_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1})

n = regressionskoefficienten. l/n ligger i regel mellan 0,7 och 1,0 som indikation på att sorptionsdata ofta är något olinjära.

Ekvationerna (8) och (9) ritas upp i diagram, och värdena på K_F^{ads}och l/n beräknas med regressionsanalys med hjälp av ekvation 9. Likaså beräknas den logaritmiska ekvationens korrelationskoefficient r. Exempel på kurvor av detta slag finns i figur 2.

▼B



Figur 2 Freundlich-adsorptionskurva (normal respektive linjanserad)

2.1.2 **Massbalans**

Massbalansen (MB) anges i procent och definieras som förhållandet mellan den mängd av ämnet som analytiskt kan tas till vara efter adsorptionstestet och den nominella mängden av ämnet vid testets början.

Behandlingen av resultaten blir annorlunda om lösningsmedlet är fullständigt blandbart med vatten. Då kan man behandla resultaten på samma sätt som i punkten ”Desorption” för att bestämma den mängd av ämnet som tagits till vara genom extraktion av lösningsmedel. Om lösningsmedlet är mindre blandbart med vatten krävs en bestämning av den tillvaratagna mängden.

Massbalansen MB för adsorptionen beräknas enligt följande ekvation, under antagandet att termen (m_E) motsvarar summan av de testämnesmassor som extraherats ur jorden och från testkärlets yta med hjälp av ett organiskt lösningsmedel:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

där:

MB = massbalans (%)

m_E = total massa av testämne som extraherats ur jorden och från testkärlets väggar i två steg (μg),

C_0 = ursprunglig masskoncentration i testlösningen som är i kontakt med jord (μg cm^3),

V_{rec} = volymen supernatant som tagits till vara efter adsorptionsjämvikt (cm^{-3}).

2.2 DESORPTION

Desorptionen (D) uttrycks i procent och definieras som förhållandet mellan den desorberade mängden av testämnet och den tidigare adsorberade mängden av ämnet, under testbetingelserna:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

där:

D_{t_i} = procentuell desorption vid tidpunkten t_i (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massan av testämne som desorberats ur jorden vid tidpunkten t_i (µg),

$m_s^{ads}(eq)$ = massan av testämne som adsorberats i jorden vid adsorptionsjämvikt (µg).

Närmare anvisningar för sättet att beräkna den procentuella desorptionen D_{t^i} för parallell- och seriemetoden finns i bilaga 5.

Den skenbara desorptionskoefficienten (K_{des}) är, under de aktuella testbetingelserna, förhållandet mellan massan av ämne som finns kvar i jordfasen och massan av desorberat ämne i vattenlösningen, när desorptionsjämvikt har inträtt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (12)$$

där:

K_{des} = desorptionskoefficient ($cm^3\ g^{-1}$):

$m_{aq}^{des}(eq)$ = totala massan av testämne som desorberats ur jord vid desorptionsjämvikt (µg),

V_r = totala volymen av vattenfas i kontakt med jord under desorptionskinetiktestet (cm^3).

Anvisningar för beräkning av$m_{aq}^{des}(eq)$finns i tillagg 5 under rubriken ”Desorption”.

Anmärkning:

Om adsorptionstestet som föregår desorptionstestet utförts med parallellmetoden, kan volymen V_T i ekvation (12) sättas lika med V_o.

2.2.1 **Desorptionsisotermer**

Ekvationen för Frcundlich-desorptionsisotermer beskriver sambandet mellan mängden av testämne som förblir adsorberat i jorden och koncentrationen av testämne i lösningen vid desorptionsjämvikt (ekvation 16).

Halten av ämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt beräknas för varje provrör enligt följande:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \qquad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ definieras som:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A (\mu g) \qquad (14)$$

där:

$C_s^{des}(eq)$ = balten av testämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt (µg g^{-1}),

$m_m^{des}(eq)$ = massan av ämne som bestämts analytiskt i vattenfasen vid desorptionsjämvikt (µg),

▼B

m_{aq}^{A} = massan av testämne som blivit över (efter att adsorptionsjämvikt inträtt) på grund av ofullständig volymersättning (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massan av ämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volymen av lösning som tagits ur röret för uppmätning av testämnet vid desorptionsjämvikt (cm^3),

V_R = volymen av supernatant som avlägsnats ur röret efter att adsorptionsjämvikt inträtt och som ersatts med samma volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning (cm^3).

Freundlich-desorptionsekvationen (16) ser ut så här:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

eller i linjär form:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

där:

K_F^{des} = Freundlich-desorptionskoefficienten.

n = regressionskoefficienren,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = ämnets masskoncentration i vattenfasen vid desorptionsjämvikt (μg cm^{-3}).

Ekvationerna 16 och 17 kan ritas upp i diagram, och värdet på K_F^{des} och l/n beräknas med regressionsanalys med hjälp av ekvation 17.

Anmärkning:

Om Freundlichs adsorptions- eller desorptionsexponent l/n är lika med 1, blir Freundlichs adsorptions- eller desorptionskoefficient (K_F^{ads} respektive K_F^{des}) lika med adsorptionens respektive desorptionens jämviktskoefficient (K_d och K_{des}), och kurvorna över C_s som funktion av C_{aq} blir linjära. Om exponenten är skild från 1, blir kurvorna över C_s som funktion av C_{aq} olinjära, och adsorptions- och desorptionskoefficienterna kommer att variera längs isotermerna.

2.2.2 **Rapport**

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

— Fullständiga uppgifter om jordproverna, inbegripet följande:

— områdets geografiska läge (latitud och longitud),

— provtagningsdatum,

▼B

— bruksändamål (t.ex. jordbruk, skog osv.),

— provtagningsdjup,

— halt av sand, silt och clay,

— pH-värden (i 0,01 M $CaCl_2$),

— halt av organiskt kol,

— halt av organiskt material,

— kvävehalt,

— kol-kväveförhållande,

— katjonbyteskapacitet (mmol/kg),

— alla uppgifter av betydelse som ror provtagning och förvaring av jordproverna,

— i förekommande fall, alla uppgifter av betydelse för tolkning av testämnets adsorption och desorption,

— uppgift om vilka metoder som använts för bestämning av enskilda parametrar.

— Relevanta uppgifter om testämnet

— Testtemperaturen

— Centrifugeringsbetingelser

— Analysprocedurer som använts för analys av testämnet

— I förekommande fall motivering för användning av hjälplösningsmedel för beredning av testämnets stam lösning

— 1 förekommande fall förklaringar av korrigeringar som gjorts i beräkningarna

— Data enligt blanketten (bilaga 6) och diagram

— Alla uppgifter och observationer som kan vara till hjälp för att tolka testresultaten.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. Kukowski H. and Brummer C. (1987), Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 04 5, Part II.

2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L. (1987), Selection of Representative Soils in the LC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.), EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).

5. US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate. Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting. 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6. US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 71 2-C-96-048, April 1996.

7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995), Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988), Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12. Calvet R. (1989), ”Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils”, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13. Calvet R. (1980), ”Adsorption-Desorption Phenomena” in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, s. 83–122.

14. Hasset J. J. and Banwart W.L. (1989), ”The sorption of nonpolar organics by soils and sediments” in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, s. 31–44.

15. van Genuchten M. Th., Davidson J. M. and Wierenga P.J. (1974), ”An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media”. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), s. 29–35.

16. McCall P.]., Laskowski D. A., Swann R. L. and Dishburger H. J. (1981), ”Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis”, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17. Lambert S. M., Porter P. E. and Schieferrstein R. H. (1965), ”Movement and sorption of chemicals applied to the soil”, Weeds, 13, s. 185–190.

18. Rhodes R. C, Belasco I. J. and Pease H. L. (1970) ”Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils”. J.Agric.Food Chem., 18, s. 524–528.

19. Russell M. H. (1995), ”Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil” in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20. Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T. (1988), ”Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides”, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, s. 901–932.

▼B

21. Guth J. A., Burkhard N. and D. O. Eberle (1976), ”Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils”. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, s. 137–157, BCPC, Surrey, UK.

22. Furminge C. G. L. and Osgerby J. M. (1967), ”Persistence of herbicides in soil”. J. Sci. Fd Agric, 18, s. 269–273.

23. Burkhard N. and Guth J. A. (1981), ”Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption”. Pestic. Sci. 12, s. 45–52.

24. Guth J. A., Gerber H. R. and Schlaepfer T. (1977), ”Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides”. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, s. 961–971.

25. Osgerby J. M. (1973), ”Process affecting herbicide action in soil”. Pestic. Sci., 4, s. 247–258.

26. Guth J. A. (1972), ”Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden”. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, s. 143–154.

27. Hamaker J. W. (1975), ”The interpretation of soil leaching experiments”, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), s. 135–172, Plenum Press, NY.

28. Helling C. S. (1971). ”Pesticide mobility in soils”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, s. 732–210.

29. Hamaker J. W. (1972), ”Diffusion and volatilization” in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, s. 49–143.

30. Burkhard N. and Guth J. A. (1981), ”Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system”. Pestic. Sci. 12, s. 37–44.

31. Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F. and Enfield CG. (1984), ”Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, s. 297–325, Acs Symp. Ser. 2 59, American Chemical Society, Washington, DC.

32. Gustafson D. I. (1989), ”Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability”. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), s. 339–357.

33. Leistra M. and Dekkers W. A. (1976). ”Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils”. J. of Soil Sci., 28, s. 340–350.

34. Bromilov R. H. and Leistra M. (1980), ”Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils”. Pest. Sei., 11, s. 389–395.

35. Green R. E. and Karickoff S. W. (1990), ”Sorption estimates for modeling”, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, s. 80–101,

36. Lambert S. M. (1967), ”Functional relationship between sorption in soil and chemical structure”. J. Agri. Food Chem., 15, s. 572–576.

▼B

37. Hance R. J.(1969), ”An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”, Agri. Food Chem., 17, s. 667–668.

38. Briggs G. G. (1969), ”Molecular structure of herbicides and their sorption by soils”, Nature, 223, 1288.

39. Briggs G. G. (1981), ”Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”, J. Agric. Food Chem., 29, s. 1050–1059.

40. Sabljic A. (1984), ”Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology”. J. Agric. Food Chem., 32, s. 243–246.

41. Bailey G. W. and White J. L. (1970), ”Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil”. Residue Rev., 32, s. 29–92.

42. Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg (1968), ”Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate”, Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: s. 222–234.

43. Karickhoff S. W. (1981), ”Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”, Chemosphere 10, s. 833–846.

44. Paya-Perez A., Riaz M. and I.arsen B. (1989), ”Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. Environ. Toxicol. Safety 21, s. 1–17.

45. Hamaker). W. and Thompson J. M. (1972), ”Adsorption in organic chemicals' in Organic Chemicals in the Soil Environment” Goring C.A.I, and Hamaker J.W., eds., Vol I och II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, s. 49–143.

46. Deli)., and Warren G. F. (1971), ”Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. Weed Sci. 19: s. 67–69.

47. Chu-Huang Wu, Buchring N., Davinson J. M. and Santelmann (1975), ”Napropamide Adsorption, desorption and Movement m soils”. Weed Science, Vol. 23, s. 454–457.

48. Haues M. H. B., Stacey M. and Thompson J. M.. (1968), ”Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations” in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, s. 75, International. Atomic Energy Agency, Wien.

49. Pionke H. B. and Deangelis R. J. (1980), ”Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects: chemical and physical methods of analysis: biological methods of analysis. First Edition (1994).

51. Scheffer F. and Schachtschabel. Lehrbuch der Bodenkunde, F, Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

52. Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L.E. and Clark F. E., eds. ”Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, \VI, 1982.

▼B

53. ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59. Green R. E. and Yamane V. K. (1970), ”Precision in pesticide adsorption measurements”. Soil Sci. Am. Proc. 34, s. 353–354.

60. Grover R. and Hance R. J. (1970), ”Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine”, Soil Sci., s. 109–138.

61. Boesten, J. J. T. I, ”Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system”, Pest. Sci. 1990, 30, s. 31–41.

62. Boesten, J. J. T. I. ”Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106”, Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26–29 April 1994.

63. Bastide J., Cantier J. M., et Coste C (1980), ”Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique”, Weed Res. 21, s. 227–231.

64. Brown D. S. and Flagg E. W. (1981), ”Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments”, J. Environ.Qual., 10(3), s. 382–386.

65. Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W. (1983), ”Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water”. Environ. Sci. Technol., 17(4), s. 227–231.

66. Gerstl Z. and Mingelgrin U. (1984), ”Sorption of organic substances by soils and sediments”, J. Environm. Sci. Health, B19 (3), s. 297–312.

67. Vowles P. D. and Mantoura R. F. C (1987), ”Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons”, Chemosphere, 16(1), s. 109–116.

68. Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990), Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69. Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980), ”Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota” in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), s. 78–115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

70. Chiou C. T., Peters L. J. and Freed V. H. (1979), ”A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”, Science, Vol. 206, s. 831–832.

71. Hassett). J., Banwart W. I., Wood S. G. and Means J. C. (1981), ”Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”, Soil Sci. Soc. Am. J. 45, s. 38–42.

72. Karickhoff S. W. (1981), ”Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”, Chemosphere, Vol. 10(8), s. 833–846.

73. Moreale A., van Bladel R. (1981), ”Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité”. Revue de l'Agric, 34 (4), s. 319–322.

74. Müller M., Kordel W. (1996), ”Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), s. 2493–2504.

75. Kordel W., Kotthoff G. Muller M. (1995), ”HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. Chemosphere 30 (7), s. 1373–1384.

76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff C. (1993), ”HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases”. Chemosphere 27 (12), s. 2341–2352.

77. Hance. R. J. (1967), ”The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”, Weed Research, Vol. 7, s. 29–36.

78. Koskinen W. C and Harper S. S. (1990), ”The retention processes: mechanisms” in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79. Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F. and Enfield C. G. (1984), ”Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, s. 297–325, ACS Symp. Ser. 2 59, American Chemical Society, Washington, DC.

80. Giles C. H. (1970), ”Interpretation and use of sorption isotherms” in Sorption and Transport Processes in Soils, S.C.I. Monograph No. 37, s. 14–32.

81. Giles, C. H., McEwan J. H., Nakhwa, S.N. and Smith D. (1960), ”Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. J. Chem. Soo, s. 3973–3993.

82. Calvet R., Tercé M. and Arvien J. C (1980), ”Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption”, Ann. Agron. 31, s. 239–251.

83. Bedbur E. (1996), ”Anomalies in the Freundlich equation”, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13–15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

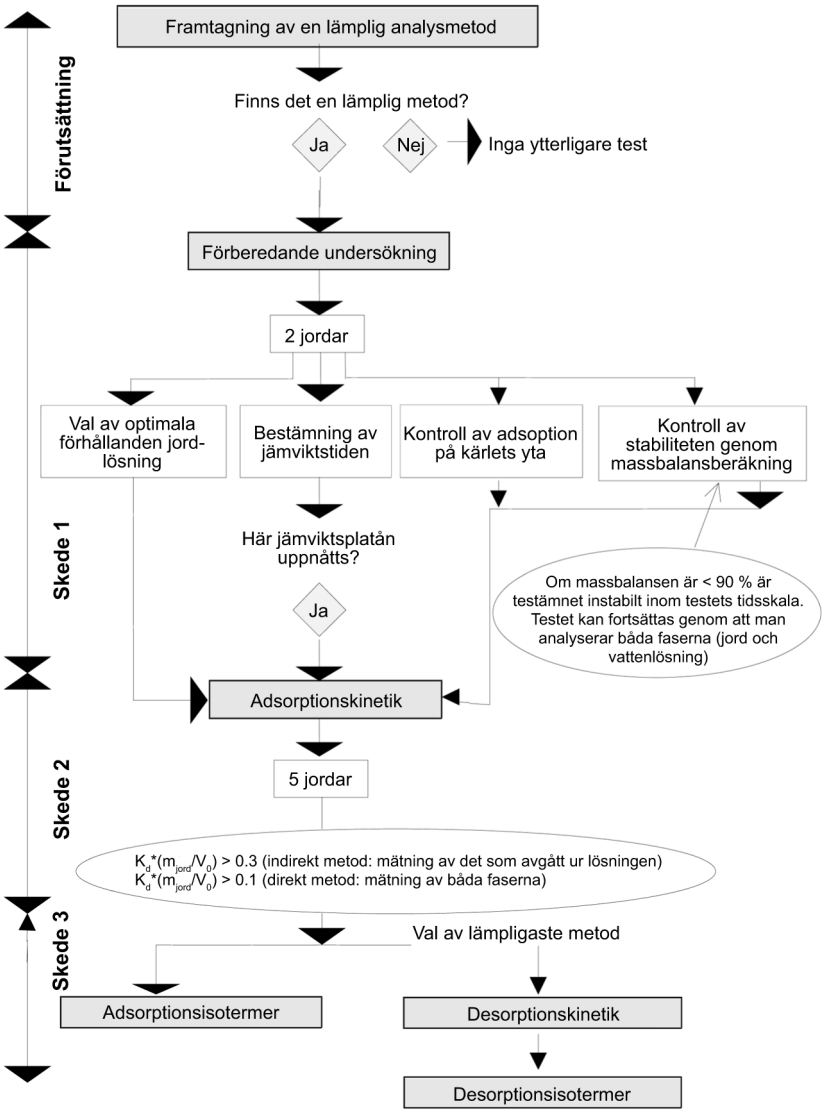
84. Guth, J. A. (1985), ”Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 3 3, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

Bilaga 1

Testschema



▼B

Bilaga 2

ADSORPTIONSRESULTATENS NOGGRANNHET SOM FUNKTION AV ANALYSMETODENS NOGGRANNHET OCH KONCENTRATIONSÄNDRINGEN

Av tabellen nedan (84) framgår klart att när skillnaden mellan massan vid testets början (m_0 = 110 µg) och testämnets massa $m_{aq}^{ads}(eq)$ i lösningen vid jämvikt (=100 µg)är mycket liten, så leder ett fel på 5 % vid mätning av jämviktskoncentrationen till ett fel på 50 % i beräkningen av massan av ämne som adsorberats i jorden ($m_s^{ads}(eq)$) och ett fel på 52,4 % i beräkningen av K_d.

Mängd jord m_{jord} 10 g

Lösningens volym V_0 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	FÖR A = 9 %							
m_0 = 110 µg eller C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	verkligt värde	10	1,00	verkligt värde	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	FÖR A = 55 %							
m_0 = 110 µg eller C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	verkligt värde	60,0	6,00	verkligt värde	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	FÖR A = 99 %							
m_0 = 110 µg eller C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	verkligt värde	108,9	10,89	verkligt värde	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = testämnets massa i jordfasen vid jämvikt, µg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = testämnets massa i vattenfasen vid jämvikt, µg;

$C_s^{ads}(eq)$ = testämnets halt i jordfasen vid jämvikt, µg g^{-1};

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = testämnets masskoncentration i vattenfasen vid jämvikt, µg cm^{-3};

R = analysfel vid bestämning av $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = beräkningsfel på grund av analysfelet R.

▼B

Bilaga 3

ESTIMERINGSMETODER FÖR K_d

1. Genom estimeringsmetoder kan K_d uppskattas på grundval av samband med t.ex. P_{ow}-värden (12) (39) (63–68), vattenlöslighetsdata (12) (19) (21) (39) (68–73) eller polaritetsdata som fåtts fram från HPLC-RP (omvänd fas) (74–76). K_{oc} och K_{om} beräknas med hjälp av ekvationerna i tabell 1 och 2, och sedan räknas K_d fram indirekt ur följande ekvationer:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Principen för dessa samband grundar sig på två antaganden: 1) det är främst jordens organiska material som påverkar hur ett ämne adsorberas, och 2) de växelverkansprocesser som förekommer är i huvudsak opolära. Det innebär att dessa samband 1) inte, eller bara delvis, kan tillämpas på polära ämnen, och 2) inte kan tillämpas i fall där jordens halt av organiskt material är mycket låg (12). Vidare gälier att samma sak inte kan konstateras angående sambandet mellan vattenlöslighet och adsorptionens omfattning (19) (21), även om man har funnit tillfredsställande korrelation mellan P_{ow} och adsorption (19). Hittills gjorda undersökningar har gett motsägelsefulla resultat.

3. 1 tabell 1 ges några exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och fördelningskoefficienten oktanol-vatten. I tabell 2 ges några exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och vattenlösligheten.

Tabell 1

Exempel på samband mellan adsorptionens fördelningsskoefficient och fördelningskoefficienten oktanol-vatten. Ytterligare exempel finns i (12) (68).

Ämne	Samband	Författare
Substituerad urea	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatiska klorerade ämnen	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou *et al.* (1983) (65)
Diverse bekämpningsmedel	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl och Mingelgrin (1984) (66)
Aromatiska kolväten	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles och Mantoura (1987) (67)

Tabell 2

Exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och vattenlösligheten. Ytterligare exempel finns i (68) (69).

Ämne	Samband	Författare
Diverse bekämpningsmedel	$\log K_{om} = 3,8 – 0,561 \log S_w$	Gerstl och Mingelgrin (1984) (66)
Alifatiska, aromatiska, klorerade ämnen	$\log K_{om} = (4,040 +/– 0,038) - (0,557 +/– 0,012) \log S_w$	Chiou *et al.* (1979) (70)
u-naphtol	$\log K_{oc} = 4,273 – 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cykliska, alifatiska aromatiska ämnen	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Diverse föreningar	$\log K_{om} = 2,75 – 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Bilaga 4

BERÄKNINGAR FÖR BESTÄMNING AV CENTRIFUGERINGS-BETINGELSER

1. Centrifugeringstiden fås fram genom följande formel, under antagande att partiklama är sfäriska:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Av praktiska skäl ges parametrarna i måttenheterna g, cm etc. i stället för de normala SI-enheterna.

där:

$\acute{\omega}$ = rotationshastighet (=2 Ti rpm/60), rad s^{-1}

rpm = varv per minut

η = lösningens viskositet, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = partikelradie, cm

p_s = jordens densitet, g cm^3

p_{aq} = lösningens densitet, g cm^{-3}

R_t = avstånd från centrifugrotorns centrum till lösningens övre yta i centrifugeringsröret, cm

R_b = avstånd från centrifugrotorns centrum till centrifugeringsrörets botten, cm

R_b-R_t = jord-lösningsblandningens höjd i centrifugeringsröret, cm.

För att säkerställa fullständig separation får centrifugen som regel gå två gånger den framräknade tiden.

2. Ekvation 1 kan förenklas ytterligare om lösningens viskositet (η) och densitet (p_{aq}) kan anses vara samma som viskositeten och densiteten för vatten vid 25 °C, dvs. $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} och $p_{aq} = 1{,}0$ g, cm^{-3}.

Då fås centrifugeringstiden genom ekvation 2:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Av ekvation 2 framgår tydligt att det är två faktorer som har stor betydelse när det gäller att bestämma de centrifugeringsbetingelser, dvs. tid (t) och varvtal (rpm), som behövs för att åstadkomma separation av partiklar av en viss storlek (i detta fall med radien 0,1 μm): 1) jordens densitet och 2) blandningens höjd i centrifugeringsröret (R_b-R_t), dvs. det avstånd som en jordpartikel färdas från lösningens övre yta till rörets botten. För en given volym bestäms blandningens höjd självfallet av rörets radie.

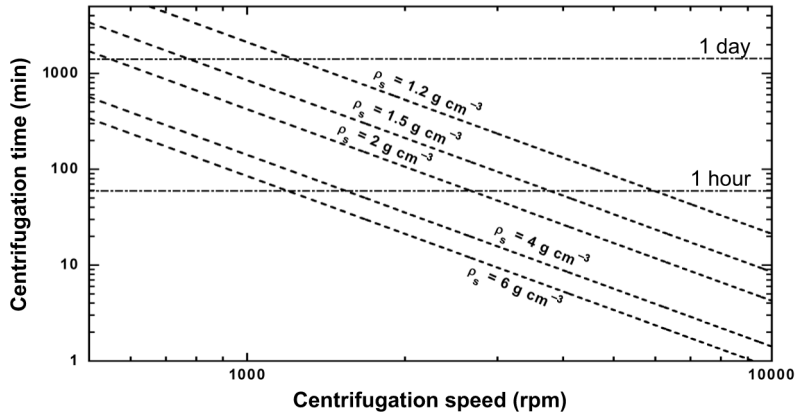
4. I figur 1 visas centrifugeringstiden (t) som funktion av varvtalet (rpm) för olika jorddensiteter (p_s) (figur 1 a) och för olika blandningshöjder i centrifugeringsröret (figur 2 a). Av figur 1 a framgår inverkan av jordens densitet tydligt – vid klassisk centrifugering med 3 000 rpm är centrifugeringstiden cirka 240 minuter när jordens densitet är 1,2 g cm^3, men bara 50 minuter när densiteten är 2,0 g cm^3. Likaså visar figur 1 b att centrifugeringstiden vid klassisk centrifugering med 3 000 rpm är cirka 50 minuter om blandningens höjd är 10 cm men bara 7 minuter om höjden är 1 cm. Det är dock viktigt att finna en optimal avvägning mellan å ena sidan så liten blandningshöjd som möjligt för centrifugeringen och å andra sidan enkel hantering när det gäller att separera faserna efter centrifugering.

▼B

5. När testbetingelserna för separering av jord- och lösningsfaserna ska bestämmas är det också viktigt att beakta eventuell förekomst av en tredje ”pseudofas”, dvs. kolloider. Dessa partiklar är mindre än 0,2 μm och kan ha viktig inverkan på hela adsorptionsmekanismen för ett ämne i en jordsuspension. När centrifugeringen utförs på ovan beskrivet sätt blir kolloiderna kvar i vattenfasen och analyseras då tillsammans med den. Då går informationen om deras inverkan förlorad.

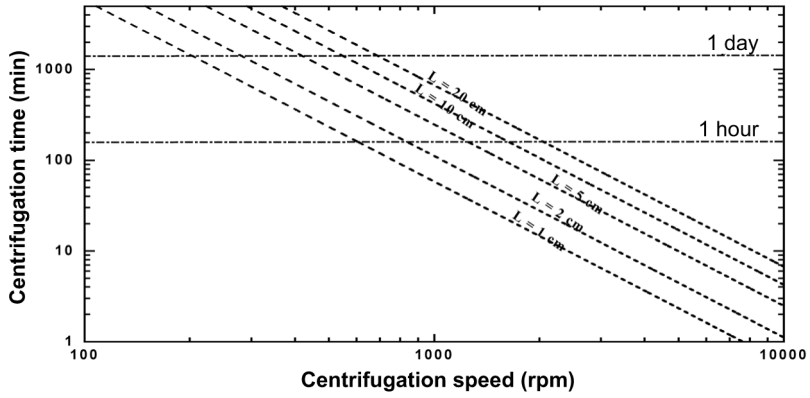
   Om laboratoriet har möjligheter till ultracentrifugering eller ultrafiltrering kan adsorptionen och desorptionen av ett ämne i jord studeras mer ingående, även beträffande ämnets adsorption på kolloiderna. Då ska ultracentrifugering med 60 000 rpm/min eller ultrafiltrering med filterporositeten 100 000 dalton användas för att separera de tre faserna jord, kolloider och lösning. Då ska också testschemat ändras så att alla tre faserna tas med i ämnesanalysen.

Figur 1a.



Samband mellan centrifugeringstid (t) och centrifugeringsvarvtal (rpm) för olika jorddensiteter (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, q = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} och ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} vid 25 °C.

Figur 1b.



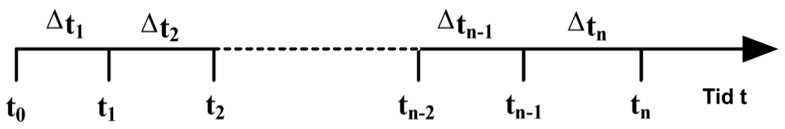
Samband mellan centrifugeringstid (t) och ccntrifugeringsvarvtal (rpm) för olika höjder på blandningen i centrifugeringsröret (R_b – R_1) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} vid 25 °C och ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Bilaga 5

BERÄKNING AV ADSORPTION A (%) OCH DESORPTION D (%)

Procedurens tidsschema är följande:



För samtliga beräkningar gäller antagandet att testämnet är stabilt och att det inte i någon signifikant grad adsorberas på kärlets väggar.

ADSORPTION A (A %)

a) *Parallellmetoden*

Den procentuella adsorptionen beräknas för varje provrör (i) vid varje tidpunkt (t_i), enligt följande ekvation:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Ekvationens termer beräknas enligt följande:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

där:

A_{t_i} den procentuella adsorptionen (%) vid tidpunkten t_1,

$m_s^{ads}(t_i)$ testämnets massa i jorden vid tidpunkten t_i då analysen utförs (µg),

m_0 testämnets massa i provröret vid testets början (µg),

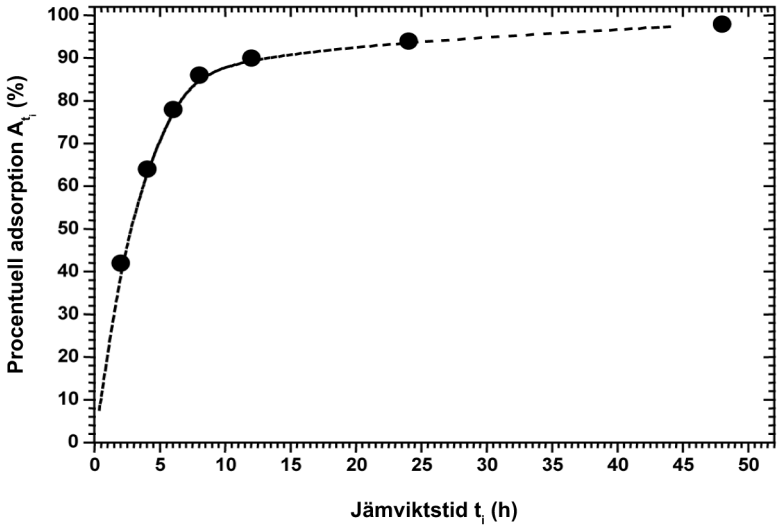
C_0 ursprunglig masskoncentration i testlösningen som är i kontakt med jorden (µg cm^{-3}).

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ ämnets masskoncentration i vattenfasen vid tidpunkten t_i då analysen utförs (µg cm^{-3}), denna koncentration bestäms analytiskt med beaktande av värdena från blindproven.

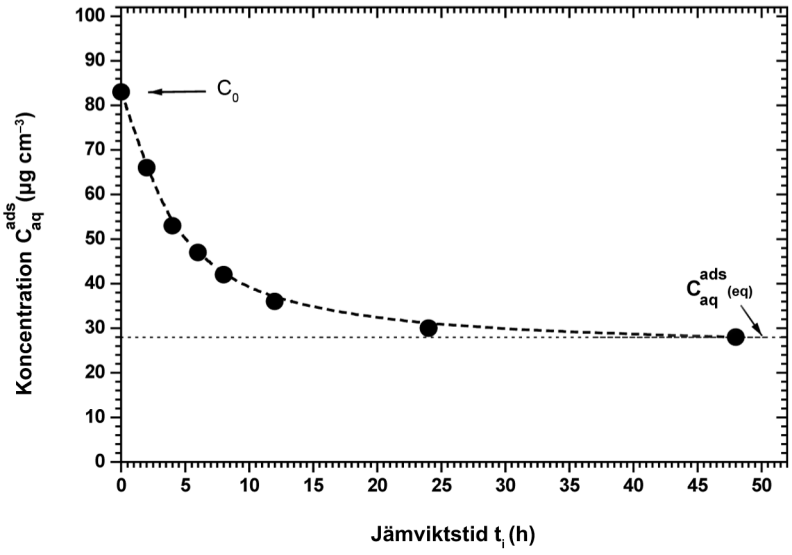
V_0 ursprunglig volym för den testlösning som är i kontakt med jorden (cm^3).

Värdet på den procentuella adsorptionen A_{t_i} eller $C_{aq}^{ads}(t_i)$ avsätts mot tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma tiden för när sorptionsjämvikt inträder. Exempel på sådana kurvor finns i figur 1 och figur 2.



Figur 1

Kurva för bestämning av adsorptionsjämvikt



Figur 2

Testämnets masskoncentration i vattenfasen (C_{aq}) som funktion av tiden.

▼B

b) *Seriemetoden*

I ekvationerna som följer är utgångspunkten att adsorptionen undersöks genom mätning av testämnet i små delprover av vattenfasen med bestämda tidsintervall.

— Den mängd ämne som adsorberats i jorden under varje tidsintervall beräknas på följande sätt:

— för det första tidsintervallet $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— för det andra tidsintervallet $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— för det tredje tidsintervallet $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— för det n:te tidsintervallet $\Delta t_n = t_n - t_n\text{-}1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Den procentuella adsorptionen under varje tidsintervall $A_{\Delta t_i}$ beräknas genom ekvationen

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

och den procentuella adsorptionen vid tidpunkten t_i ((A_{t_i})) fås genom ekvationen

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorptionsvärdena A_{t_i} eller $A_{\Delta t_i}$ (beroende på vad som krävs i undersökningen) ritas upp som funktion av tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma tidpunkten för när sorptionsjämvikt inträder.

— Vid jämviktstiden t_{eq} gäller följande:

— massan av testämne som adsorberats i jorden:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— och den procentuella adsorptionen vid jämvikt:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— massan av testämne i lösningen:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

De ovan använda parametrarna definieras enligt följande:

$m_s^{ads}(\Delta t_1),\ m_s^{ads}(\Delta t_2),\ ...,\ m_s^{ads}(\Delta t_n)$	massan av ämne som adsorberats i jorden under tidsintervallen Δ_{t1}, $\Delta_{t2,...},\Delta_{tn}$ (µg),
$m_m^{ads}(t_1),\ m_m^{ads}(t_2),\ ...,\ m_n^{ads}(t_n)$	massan av ämne som uppmätts i ett delprov v_a^A vid tidpunkterna t_1 Δt_2 ..., t_n (µg),
$m_s^{ads}(eq)$	massan av ämne som adsorberats i jorden vid adsorptionsjämvikt (µg),
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massan av ämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (µg),
$v_a{}^A$	volymen av det delprov i vilket testämnet uppmäts (cm^3),
$A_{\Delta t_i}$	procentuell adsorption under tidsintervallet Δt_i (%),
A_{eq}	procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt (%).

DESORPTION D (A %)

Som starttid t_0 för desorptionskinetiktestet räknas den tidpunkt då den maximala tillvaratagna volymen av testämneslösning (efter att adsorptionsjämvikt har inträtt) ersätts med en lika stor volym 0,01 M $CaCl_2$-lösning.

a) *Parallellmetoden*

Vid tidpunkten t_i uppmäts massan av testämnet i volymen av den vattenfas som tagits ur rör i ($\left(V_r^i\right)$), och den desorberade massan beräknas enligt följande ekvation:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Vid desorptionsjämvikt är $t_i = t_{eq}$ och därför är $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Massan av testämne som har desorberats under ett tidsintervall (Δt_i) ges av ekvationen:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Den procentuella desorptionen

beräknas för tidpunkten t_i enligt ekvationen

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

och för tidsintervallet (Δt_i) enligt ekvationen

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

där:

D_{t_i} = procentuell desorption vid tidpunkten t_i (%),

$D_{\Delta t_i}$ = procentuell desorption under tidsintervallet Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massan av testämne som desorberats vid tidpunkten t_i (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massan av testämne som desorberats under tidsintervallet Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = massan av testämne som uppmätts analytiskt vid tidpunkten t_i i den lösningsvolym V_r^i som har tagits för analysen (μg),

m_{aq}^{A} = massan av testämne som blivit över från adsorptionsjämvikten på grund av ofullständig volymersättning (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massan av testämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

V_R = volymen av supernatant som tagits ur röret efter uppnådd adsorptionsjämvikt och som ersatts med samma volym 0,01 M $CaCl_2$-lösning (cm^3),

V_r^i = volymen av lösning som tagits ur rör nummer i för uppmätning av testämnet i desorptionskinetiktestet (cm^3).

Desorptionsvärdena D_{t_i} eller $D_{\Delta t_i}$(beroende på vad som krävs i undersökningen) ritas upp som funktion av tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma när desorptionsjämvikt inträder.

b) *Seriemetoden*

I ekvationerna som följer är utgångspunkten att den föregående adsorptionsundersökningen utförts genom att mäta testämnet i små delprovsvolymer $\left(v_a^A\right)$ av vattenfasen (seriemetoden, se avsnitt 1.9 ”Mätförfarande”). Härvid antas a) att volymen av den supernatant som avlägsnats ur röret efter adsorptionskinetiktestet har ersatts med en lika stor volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning (V_R) och b) att den totala volymen av vattenfasen som är i kontakt med jord (V_T) under desorptionskinetiktestet förblir konstant och ges av följande ekvation:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

▼B

Vid tidpunkten t_i, gäller följande:

— Massan av testämne mäts i ett litet delprov ($\left(v_a^D\right)$) och den desorberade massan beräknas enligt följande ekvation:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Vid desorptionsjämvikt är $t_i = t_{eq}$, och därför är $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— Den procentuella desorptionen D_{t_i} beräknas enligt följande ekvation:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

För tidsintervallet (Δt_i) gäller följande:

Mängden desorberat ämne beräknas för varje tidsintervall, enligt följande:

— för det första tidsintervallet $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ och } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— för det andra $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

$$\text{och } m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— för det n:te tidsintervallet $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

$$\text{och } m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Till slut beräknas den procentuella desorptionen under varje tidsintervall $D_{\Delta t_i}$ med hjälp av ekvationen

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

och den procentuella desorptionen D_{t_i} vid tidpunkten t_i ges av ekvationen

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

där de ovan använda parametrarna definieras på följande sätt:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massan av testämne som desorberas under tidsintervallen Δt_1, $\Delta\ t_2$,… Δt_n (µg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = massan av testämne som desorberas under tidsintervallen Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (µg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = = massan av ämne som uppmätts i ett delprov $\left(v_a^D\right)$ vid tidpunkterna t_1,t_2,..., t_n (Hg).

V_T = totala volymen av vattenfas som är i kontakt med jorden under desorptionskinetiktestet enligt seriemetoden (cm^3),

m_{aq}^A = massan av testämne som blivit över efter uppnådd adsorptionsjämvikt på grund av ofullständig volymersättning (µg),

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = volymen av supernatant som avlägsnats ur röret efter att adsorptionsjämvikt inträtt och som ersatts med samma volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning (cm^3)

v_a^D = volymen av det delprov som tagits för analys ur rör nummer i under desorptionskinetiktestet enligt seriemetoden (cm^3).

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Bilaga 6

TEST AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORDAR – RAPPORTBLANKETTER

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysmetodens lämplighet

Uppvägt jordprov	g	
Jordens torrmassa	g	
$CaCl_2$-lösningens volym	cm^3	
Slutlösningens nominella koncentration	µg cm^{-3}	
Slutlösningens analyserade koncentration	µg cm^{-3}	

Princip för den använda analysmetoden:

Kalibrering av analysmetoden:

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysmetod: Indirekt metod ☐ Parallellmetod ☐ Seriemetod ☐

Direkt metod ☐

Adsorptionstest: testprover

	Beteckning	Måttenhet	Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid	
Rör nr										
Uppvägt jordprov	—	g								
Jordens torrmassa	m_{jord}	g								
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{WS}	cm^3								
Volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning för att få jorden i jämvikt		cm^3								
Stamlösningens volym		cm^3								
Totalvolym av vattenfas i kontakt med jord	V_0	cm^{-3}								
Testlösningens ursprungliga koncentration	C_0	µg cm^{-3}								
Testämnets massa vid testets början	m_0	µg								

▼B

	Beteckning	Måttenhet	Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid	
Efter omröring och centrifugering										
INDIREKT METOD										
Parallellmetod										
Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigering)	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Seriemetod										
Massan av testämne som uppmätts i delprovet V^{A}_{a}	$m_{m}^{ads}(t_i)$	µg								
DIREKT METOD										
Massan av testämne som adsorberats i jord	$m_{s}^{ads}(t_i)$	µg								
Beräkning av adsorptionen										
Adsorption	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Medelvärde										
Adsorptionskoefficient	K_d	cm^{3}g^{-1}								
Medelvärde										
Adsorptionskoefficient	K_{OC}	cm^3 g^{-1}								
Medelvärde										

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionstest: blind- och kontrollprov

	Beteckning	Måttenhet	Blindprov		Blindprov		Kontrollprov	
Rör nr								
Uppvägt jordprov		g					0	0
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)		cm^3					—	—
Tillsatt volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning		cm^3						
Tillsatt volym av testämnets stamlösning		cm^3	0	0				
Vattenfasens totalvolym (beräknat värde)		cm^3					—	—

▼B

	Beteckning	Måttenhet	Blindprov		Blindprov		Kontrollprov	
Testämnets ursprungliga koncentration i vattenfasen		µg cm^{-3}						
Efter omröring och centrifugering								
Koncentration i vattenfasen		µg cm^{-3}						

Anm.: Lägg till kolumner efter behov.

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Massbalans

	Beteckning	Måttenhet				
Rör nr						
Uppvägt jordprov	—	g				
Jordens torrmassa	m_{soil}	g				
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{WS}	ml				
Volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning för att få jorden i jämvikt		ml				
Stamlösningens volym		cm^3				
Total volym av vattenfas i kontakt med jord	V_0	cm^3				
Testlösningens ursprungliga koncentration	C_0	µg cm^{-3}				
Jämviktstid	—	h				
Efter omröring och centrifugering						
Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigering)	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Jämviktstid	t_{eq}	h				
l:a utspädning med lösningsmedel						
Avlägsnad volym av vattenfas	V_{rec}	cm^3				
Tillsatt volym av lösningsmedel	ΔV	cm^3				
l:a extraktion med lösningsmedel						
Signalutslag vid analys av lösningsmedlet	S_{E1}	varierande				
Testämnets koncentration i lösningsmedlet	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Beteckning	Måttenhet				
Massan av ämne som extraherats från jord och kärlets väggar	m_{E1}	µg				
2:a utspädning med lösningsmedel						
Avlägsnad volym av lösningsmedel	ΔV_s	cm^3				
Tillsatt volym av lösningsmedel	AV	cm^3				
2:a extraktion med lösningsmedel						
Signalutslag vid analys av lösningsmedlet	S_{E2}	varierande				
Testämnets koncentration i lösningsmedlet	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massan av testämne som extraherats från jord och kärlets väggar	m_{E2}	µg				
Total massa av testämne som extraherats i två steg	M_E	Mg				
Massbalans	MB	%				

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionsisotermer

	Beteckning	Måttenhet								
Rör nr										
Uppvägt jordprov	—	g								
Jordens torrmassa	E	g								
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{WS}	cm^3								
Volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning för att få jorden i jämvikt		cm^3								
Volym av tillsatt stamlösning		cm^3								
Total volym av vattenfas i kontakt med jord (beräknat värde	V_0	cm^3								
Lösningens koncentration	C_0	µg cm^{-3}								
Jämviktstid	—	h								

▼B

	Beteckning	Måttenhet								
Efter omröring och centrifiigering										
Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigering)	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatur		°C								
Adsorberad massa per enhet ord	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressionsanalys:

värdet på K_F^{ads}:

värdet på l/n:

regressionskoefficient r^2:

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysmetod: Indirekt metod ☐ Parallellmetod ☐ Seriemetod ☐

Desorptionstest

		Beteckning	Måttenhet	Tidsintervall	Tidsintervall	Tidsintervall	Tidsintervall
Numret på röret som kommer från adsorptionssteget							
Massan av testämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Avlägsnad volym av vattenfas, ersatt med 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Total volym av vattenfas i kontakt med jord	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Massan av testämne som blivit över efter uppnådd adsorptionsjämvikt på grund av ofullständig volymersättning		m_{aq}^A	µg				

Desorptionskinetik

Uppmätt massa av testämne som desorberats ur jorden vid tidpunkten t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volym av lösning som tagits ur rör nummer i för uppmätning av testämnet	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Massan av testämne som desorberats ur jorden vid tiden t_i (beräknat värde)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massan av testämne som desorberats ur jorden under tidsintervallet Δt_i (beräknat värde)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Beteckning	Måttenhet	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall
Procentuell desorption						
Desorption vid tidpunkten t_i	D_{ti}	%				
Desorption under tidsintervallet Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Skenbar desorptionskoefficient	K_{des}					

PM: Parallellmetod

SM: Seriemetod

▼B

C.19 UPPSKATTNING AV ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN (K_{OC}) I JORD OCH AVLOPPSSLAM MED ANVÄNDNING AV HÖGTRYCKSVÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG121 (2001).

1.1 INLEDNING

Sorptionsbeteendet hos ämnen i jord eller avloppsslam kan beskrivas med hjälp av parametrar som bestämts på experimentell väg med testmetod C.18. En viktig parameter är adsorptionskoefficienten. Den definieras som förhållandet mellan ämnets koncentration i jorden/slammet och ämnets koncentration i vattenfasen vid adsorptionsjämvikt. En adsorptionskoefficient som är normaliserad till jordens halt av organiskt bundet kol (K_{OC}) är en värdefull indikator på en kemikalies bindningsförmåga till det organiska materialet i jord och avloppsslam och ger möjlighet att jämföra olika kemikalier. Denna parameter kan uppskattas genom korrelationer med vattenlösligheten och fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Vid den försöksmetod som beskrivs här används HPLC för uppskattning av adsorptionskoefficienten K_{OC} i jord och avloppsslam (8). Dessa uppskattningar är tillförlitligare än resultaten från QSAR-beräkningar (9). En uppskattningsmetod kan aldrig helt ersätta mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (testmetod C.18). Det uppskattade värdet på K_{OC} kan dock användas som stöd vid valet av lämpliga testparametrar för adsorptions-/desorptionsundersökningar enligt testmetod C.l8, genom beräkning av K_d (distributionskoefficient) eller K_f (Freundlich-adsorptionskoefficient) enligt ekvation 3 (se avsnitt 1.2).

1.2 DEFINITIONER

K_d: Distributionskoefficienten definieras som förhållandet mellan jämviktkoncentrationerna C för ett upplöst testämne i ett tvåfassystem som består av sorbent (jord eller avloppsslam) och en vattenfas. Förhållandet har ingen måttenhet när koncentrationerna i båda faserna uttrycks som vikt per vikt. Om koncentrationen i vattenfasen ges som vikt per volym blir måttenheten ml-g^{-1}. K_d kan variera beroende på sorbentens egenskaper och kan vara koncentrationsberoende.

$$K_d = \frac{C_{jord}}{C_{vatten}} or \frac{C_{slam}}{C_{vatten}} \quad (1)$$

där:

C_{jord} = testämnets koncentration i jord vid jämvikt (µg· g^{-1})

C_{slam} = testämnets koncentration i slam vid jämvikt (µg· g^{-1})

C_{vatten} = testämnets koncentration i vattenfasen vid jämvikt (ug· g^{-1}, µg· ml^{-1})

▼B

K_f: Freundlich-adsorptionskoefficienten definieras som testämnets koncentration i jord eller avloppsslam (x/m) när jämviktskoncentrationen C_{vatten} i vattenfasen har värdet ett. Måttenheten är μg· g^{-1} sorbent. Värdet kan variera beroende på sorbentens egenskaper.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{vatten} \quad (2)$$

där:

x/m = mängden testämne x (μg) som adsorberats på mängden sorbent m (g) vid jämvikt

l/n = lutningen hos Freundlich-adsorptionsisotermen

C_{vatten} = testämnets koncentration i vattenfasen vid jämvikt (μg· ml^{-1})

$$\text{At}C_{vatten} = 1;\ \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}: Distributionskoefficienten (K_d) eller Freundlich-adsorptionskoefficienten (K_f) normaliserad till sorbentens halt av organiskt kol (f_{oc}). Särskilt för icke-joniserade kemikalier utgör den en ungefärlig indikator på omfattningen av adsorption mellan ett ämne och sorbenten och ger möjlighet att göra jämförelser mellan olika kemikalier. Beroende på måttenheterna för K_d och K_f kan K_{oc} sakna måttenhet eller ha måttenheten ml g^{-1} eller μg· g^{-1} organiskt material.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}}\left(\text{utan måttenhet eller ml}\cdot g^{-1}\right)\text{eller}\frac{\text{Kf}}{\text{foc}}\left(\mu g\cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Förhållandet mellan K_{OC} och K_d är inte alltid linjärt och därför kan K_{oc}-värdena variera mellan olika typer av jord men värdenas variabilitet är betydligt mindre jämfört med K_d- eller K_f-värden.

Adsorptionskoefficienten (K_{oc}) härleds från kapacitetsfaktorn (k') med användning av en kalibreringskurva log k' mot log K_{oc} för valda referensföreningar.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

där:

t_R = HPLC retentionstiden för test- och referensämne (minuter)

t_0 = HPLC dödtid (minuter) (se avsnitt 1.8.2)

P_{ow}: Fördelningskoefficienten oktanol-vatten definieras som förhållandet mellan koncentrationerna för upplösta ämnen i n-oktanol och vatten. Värdet har ingen måttenhet.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coktanol}}{\text{Cvatten}}(= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3 REFERENSÄMNEN

Strukturformeln, renheten och dissociationskonstanten (i tillämpliga fall) bör vara kända innan metoden används. Helst ska man också ha tillgång till information om lösligheten i vatten och organiska lösningsmedel, fördelningskoefficienten oktanol-vatten och hydrolysegenskaperna.

▼B

För att korrelera uppmätta HPLC-retentionsdata för ett testämne med ämnets adsorptionskoefficient K_{oc} behövs en kalibreringskurva för log K_{oc}. mot log k'. För kurvan krävs minst sex referenspunkter, av vilka minst en ligger ovanför och en under det förväntade värdet för testämnet. Metodens resultat blir betydligt mer exakt om man använder referensämnen som är strukturellt besläktade med testämnet. Om sådana data inte finns tillgängliga ligger valet av lämpliga kalibreringsämnen hos användaren. Då bör en mer allmän uppsättning av strukturellt heterogena ämnen väljas. I tabell 1 i bilagan görs en uppräkning av ämnen och K_{oc}-värden som kan användas för avloppsslam och i tabell 3 ges motsvarande uppgifter för jord. Om andra kalibreringsämnen används måste detta motiveras.

1.4 PRINCIP FOR TESTMETODEN

HPLC utförs med analytiska kolonner som är packade med kommersiellt tillgänglig stationär fas av cyanopropyl med lipofila och polära grupper. Den stationära fasen är måttligt polär och baserad på en silikamatris, enligt följande:

–O – Si	$–CH_2 – CH_2 – CH_2$	–CN
silika	icke-polär bulk	polär grupp

Principen för testmetoden är densamma som för testmetod A.8 (Fördelningskoefficient, HPLC-metod). När testämnet passerar genom kolonnen tillsammans med den rörliga fasen växelverkar testämnet med den stationära fasen. Testämnet fördelas mellan den rörliga och stationära fasen och bromsas därför upp. I och med den stationära fasens sammansättning med både polära och icke-polära bindningsställen kan en molekyls polära och icke-polära grupper växelverka på liknande sätt som när det gäller organiskt material i jord eller i avloppsslam. Det betyder att man kan bestämma förhållandet mellan retentionstiden i kolonnen och adsorptionskoefficienten i organiskt material.

pH-värdet har stor inverkan på sorptionsbeteendet, särskilt när det gäller polära ämnen. I jordbruksjord eller tankar i avloppsreningsverk varierar pH-värdet i regel mellan 5,5 och 7,5. För joniserbara ämnen bör man utföra två test i lämpliga buffertlösningar där det ena testet utförs med joniserad form och det andra med ickejoniserad form, men endast i fall där minst 10 % av testämnet dissocieras inom pH-intervallet 5,5–7,5.

Eftersom endast förhållandet mellan retentionen i HPLC-kolonnen och adsorptionskoefficient används för utvärderingen behövs ingen kvantitativ analytisk metod och endast retentionstiden behöver bestämmas. Om en lämplig uppsättning referensämnen och standardbetingelser kan användas för testet ger denna metod tillgång till ett snabbt och effektivt sätt för bestämning av adsorptionskoefficienten K_{oc}.

1.5 TESTETS TILLÄMPBARHET

HPLC-metoden kan användas på kemiska ämnen (märkta eller omärkta) för vilka det finns tillgång till ett lämpligt detektionssystem (t.ex. spektrofotometer, radioaktivitetsdetektor) och som är tillräckligt stabila under den tid testet varar. Testet kan vara särskilt användbart för kemikalier som är svåra att undersöka i andra försökssystem (t.ex. flyktiga ämnen, ämnen som inte är lösliga i vatten vid koncentrationer som kan mätas analytiskt, ämnen med en hög affinitet till ytan i inkubationssystem). Metoden kan användas för blandningar som ger olösta elutionsband. I sådana fall bör man ange log K_{oc}-värdenas övre och undre gränser för testblandningens föreningar.

▼B

Orenheter kan i bland leda till problem vid tolkningen av HPLC-resultaten, men orenheterna har inte så stor betydelse så länge som testämnet klart kan identifieras analytiskt och separeras från orenheterna.

Metoden är validerad för de ämnen som räknas upp i tabell 1 i bilagan och metoden har också tillämpats på ett antal andra kemikalier i följande kemikalieklasser:

— Aromatiska aminer (t.ex. trifluralin, 4-kloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metylanilin, N-metylanilin, 1-naftylamin).

— Estrar av aromatiska karboxylsyror (t.ex. bensoesyrametylester, 3,5-dinitrobensoesyraetylester).

— Aromatiska kolväten (t.ex. toluen, xylen, etylbensen, nitrobensen).

— Aryloxifenoxipropionsyraestrar (t.ex. diklofop-metyl, fenoxaprop-etyl, fenoxaprop-P-etyl).

— Bensimidazol- och imidazol-fungicider (t.ex. karbendazim, fuberidazol, triazoxid).

— Karboxylsyraamider (t.ex. 2-klorbensamid, N,N-dimetylbcnsamid, 3,5-dinitrobensamid, N-metylbensamid, 2-nitrobensamid, 3-nitrobensamid).

— Klorerade kolväten (t.ex. endosulfan, DDT, hexaklorbensen, quintozen, 1,2,3-triklorbensen).

— Bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar (t.ex. azinfos-metyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos).

— Fenoler (t.ex. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklorofenol, 2,4,6-triklorfenol, 1-naftol).

— Fenylurcaderivat (t.e.x. isoproturon, monolmuron, pencycuron).

— Pigmentfärgämnen (t.ex. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81).

— Polyaromatiska kolväten (t.ex. acenaften, naftalen).

— 1,3,5-triazin-herbicider (t.ex. prometryn, propazin, simazin, terbutryn).

— Triazolderivat (t.ex. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Metoden kan inte tillämpas på ämnen som reagerar med eluenten eller den stationära fasen. Metoden är heller inte tillämplig på ämnen som har specifik växelverkan med oorganiska komponenter (t.ex. genom bildning av klusterkomplex med lermineraler). Metoden fungerar eventuellt inte för ytaktiva ämnen, oorganiska föreningar och måttliga eller starka organiska syror och baser. Log K_{oc}-värden från 1,5 till 5,0 kan bestämmas. Joniserbara ämnen måste mätas med hjälp av en buffrad rörlig fas, men stor vikt måste fästas vid att undvika utfällning av buffertkomponenter eller testämne.

▼B

1.6 KVALITETSKRITERIER

1.6.1 **Noggrannhet**

I regel kan adsorptionskoefficient för ett testämne bestämmas inom ± 0,5 logaritmiska enheter av det värde som kan bestämmas med mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (se tabell 1 i bilagan). Noggrannheten förbättras om det finns tillgång till referensämnen som är strukturellt besläktade med testämnet.

1.6.2 **Repeterbarhet**

Bestämningarna bör köras minst två gånger. De log K_{oc}-värden som härletts från individuella mätningar bör ligga inom ett område på 0,25 logaritmiska enheter.

1.6.3 **Reproducerbarhet**

De erfarenheter man hittills har från metoden ger belägg för metodens validitet. En undersökning av HPLC-metoden med 48 ämnen (i huvudsak bekämpningsämnen) för vilka det fanns tillgång till tillförlitliga data om K_{oc} i jord gav en korrelationskoefficient på R = 0,95 (10) (11).

Ett jämförelsetest utfördes av elva deltagande laboratorier för att förbättra och validera metoden (12). Resultaten anges i tabell 2 i bilagan.

1.7 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.7.1 **Preliminär uppskattning av adsorptionskoefficienten**

Fördelningskoefficienten oktanol-vatten P_{ow} (= K_{ow}) och, i viss utsträckning, vattenlösligheten kan användas som indikatorer för adsorptionens omfattning, särskilt för icke-joniserande ämnen. Det betyder att dessa indikatorer kan användas för preliminära orienterande test. Korrelationer för flera grupper av kemikalier finns angivna i ett antal publikationer (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2 **Apparatur**

För testet krävs en vätskekromatograf försedd med en pulsfri pump och lämplig detekteringsutrustning. Det är tillrådligt att använda en injektionsventil med en injektionsslinga. Kolonnen ska vara packad med kommersiellt tillgängligt kemiskt bundet cyanopropylharts på silikabas (t.ex. Hypersil och Zorbax CN). En guardkolonn av samma material kan placeras mellan injektionssystemet och analyskolonnen. Kolonner från olika tillverkare kan vara mycket olika när det gäller separationseffektivitet. Som riktvärden för den kapacitetsfaktor k' som bör uppnås gäller följande: log k' > 0,0 för log K_{oc} = 3,0 och log k' > 0,4 för log K_{oc} = 2,0 när man använder metanol/vatten 55/45 % som rörlig fas.

1.7.3 **Rörlig fas**

Flera olika rörliga faser har testats och följande två rekommenderas:

— metanol/vatten (55/45 % v/v)

— methanol/0,01 M citratbuffert pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

För beredning av det eluerande lösningsmedlet används HPLC-klassificerad metanol och destillerat vatten eller citratbuffert. Blandningen avgasas före användningen. Isokratisk eluering bör användas. Om blandningar av metanol och vatten inte är lämpliga kan man försöka med andra blandningar av organiskt lösningsmedel och vatten, t.ex. etanol och vatten eller acetonitril och vatten. För joniserbara blandningar rekommenderas användning av buffertlösningar för stabilisering av pH. Stor vikt måste fästas vid att undvika saltutfällning och kolonnförsämring, vilket kan inträffa med vissa blandningar av organisk fas/buffert.

Inga tillsatser av typen jonparsreagenser bör användas, eftersom de kan påverka den stationära fasens sorptionsegenskaper. Sådana ändringar i den stationära fasen kan i vissa fall vara irreversibla. Därför måste alla försök där tillsatser används utföras med separata kolonner.

1.7.4 **Upplösta ämnen**

Test- och referensämnen upplöses i den rörliga fasen.

1.8 TESTETS UTFÖRANDE

1.8.1 **Testbetingelser**

Temperaturen under matningarna bör registreras. Det är högst tillrådligt att hålla kolonnen i temperaturkontrollerad miljö för att garantera konstanta betingelser under kalibrerings- och bestämningskörningarna och vid mätning av testämnet.

1.8.2 **Bestämning av dödtiden t_0**

För bestämning av dödtiden t_0 kan två olika metoder användas (se även avsnitt 1.2).

1.8.2.1 *Bestämning av dödtiden t_0 med användning av en homolog serie*

Detta förfarande har visat sig ge tillförlitliga och standardiserade värden på t_0. Närmare uppgifter finns i testmetod A.8 (Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten), HPLC-metoden).

1.8.2.2 *Bestämning av dödtiden t_0 med användning av inerta ämnen som inte bromsas upp i kolonnen*

Denna teknik baserar sig på injicering av lösningar av formamid, urea eller natriumnitrat. Mätningarna bör utföras minst två gånger.

1.8.3 **Bestämning av retentionstiderna t_R**

Referensämnena bör väljas enligt beskrivningen i avsnitt 1.3. Vid bestämning av retentionstiderna kan de injiceras som en blandad standard, förutsatt att det finns belägg för att retentionstiden för varje referensstandard inte påverkas av närvaron av de andra referensstandarderna. Kalibreringen bör utföras med regelbundna intervall minst två gånger dagligen så att man kan beakta inverkan av oväntade förändringar i kolonnens prestanda. Det bästa förfarandet är att göra injektionerna före och efter injektionerna av testämnet, för att bekräfta att retentionstiderna inte har förskjutits. Testämnena injiceras i så små mängder som möjligt (för att undvika överbelastning på kolonnen) och deras retentionstider bestäms.

▼B

Bestämningarna bör göras minst dubbelt för att öka mätningarnas tillförlitlighet. De värden på log K_{oc} som härletts från individuella mätningar bör falla inom ett område på 0,25 logaritmiska enheter.

1.8.4 **Utvärdering**

Kapacitetsfaktorerna k' beräknas utifrån dödtiden t_0 och retentionstiderna t_R hos de valda referensämnena enligt ekvation 4 (se avsnitt 1.2). Referensämnenas värden på log k' plottas sedan mot deras värden på log K_{oc} från mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (se tabellerna 1 och 3 i bilagan). Med hjälp av den erhållna kurvan kan log k'-värdet för ett testämne därefter användas för att bestämma ämnets log K_{oc}-värde. Om de aktuella resultaten visar att log K_{oc} för testämnet ligger utanför kalibreringsområdet måste testet upprepas med användning av andra, lämpligare referensämnen.

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

Rapporten måste innehålla följande uppgifter:

— Identifiering av test- och referensämnen och deras renhet samt, om det är relevant, pK_a-värden.

— Beskrivning av utrustningen och testbetingelserna, t.ex. analyskolonnens (och guardkolonnens) typ och mått, detekteringsmetoden, den rörliga fasen (komponenternas förhållande, pH), temperaturområdet under matningarna.

— Dödtid och den metod som har använts för att bestämma den.

— Mängderna test- och referensämnen som har tillförts kolonnen.

— Retentionstiderna för de referensämnen som har använts för kalibrering.

— Närmare uppgifter om den anpassade regressionslinjen (log k' mot log K_{oc}) och en grafisk framställning av regressionslinjen.

— Medelvärden för retentionsdata och uppskattat log K_{oc}-värde för testämnet.

— Kromatogram.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990), Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

2. J. Hodson, N. A. Williams (1988), The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

3. G. G. Briggs (1981), Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, s. 1050–1059.

4. C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983), Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, s. 227–231.

5. Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984), Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, s. 297–312.

▼B

6. C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979), A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, s. 831–832.

7. S. W. Karickhoff (1981), Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, s. 833–846.

8. W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997), Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), s. 121–128.

9. M. Mueller, W. Kördel (1996), Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), s. 2493–2504.

10. W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993), HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), s. 2341–2352.

11. B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991), Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, s. 285–304.

12. W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995), HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373–1384.

▼B

Bilaga

Tabell 1

Jämförelse av K_{oc}-värden för jord och avloppsslam och beräknade värden från HPLC-screeningmetoden ([1]), ([2])

Ämne	CAS-nr	log K_{oc} avloppsslam	log K_{oc} HPLC	A	log K_{oc} jord	HPLC	A
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bensoesyrafenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bensamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobensamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dikloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 — 128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 — 119.

Tabell 2

Resultat av jämförelsetest mellan laboratorier (11 deltagande laboratorier) som har utförts för att förbättra och validera HPLC-metoden ([1])

Ämne	CAS-nr	log K_{oc}	K_{oc}	Log K_{oc}
		(OECD 106)	(HPLC-metodcn)	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

▼B

Tabell 3

Rekommenderade referensämnen för HPLC-screeningmetoden på grundval av jordadsorptionsdata

Referensamne	CAS-nr	Log K_{oc}-medelvärden från matningar vid jamvikt i uppslammat prov	antal K_{oc}-data	Log S.D.	Källa
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-nitrobensamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-dimetylbensamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-metylbensamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metylbensoat	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-nitrobensamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-dinitrobensamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfandiol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-triklorbensen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
a-endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofop-metyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
benantren	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (blandning)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63		—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994), Bestimmung des Adsorplionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC, UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
[b] B.V. Oepen, \V. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, s. 285–304.
[c] (C) Data från industrin.

▼B

C.20 REPRODUKTIONSTEST PA *DAPHNIA MAGNA*

1. METOD

Denna testmetod för reproduktionstoxicitet motsvarar OECD TG 211 (1998).

1.1 INLEDNING

Det primära syftet med detta test är att bedöma kemikaliers verkningar på reproduktionskapaciteten hos *Daphnia magna*.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Föräldrageneration: de *Daphnia*-honor som finns närvarande vid testets början och vars reproduktionskapacitet testas.

Avkomma: de unga *Daphnia* som produceras av föräldragenerationen under testets gång.

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest observed effect concentration, LOEC): den lägsta testkoncentrationen vid vilken ämnet inom en fastställd exponeringsperiod framkallar statistiskt signifikanta verkningar på reproduktion och på föräldragenerationens mortalitet (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte uppfylls måste en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och NOEC).

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No observed effect concentration, NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar några statistiskt signifikanta verkningar ($p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen.

EC_X: den koncentration av testämnet upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % av reproduktionskapaciteten hos *Daphnia magna*.

Inneboende tillväxthastighet: ett mått på populationens tillväxt vilket omfattar reproduktionskapacitet och åldersspecifik mortalitet (20) (21) (22). I steady state-populationer är värdet på detta mått noll. För växande populationer är värdet positivt och för minskande populationer är värdet negativt. Det senare är inte hållbart och leder i slutändan till utrotning.

Detektionsgräns: den lägsta koncentration som kan detekteras men inte kvantifieras.

Bestämningsgräns: den lägsta koncentration som kan mätas kvantitativt.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är orörligt, dvs. när det inte kan simma eller om man inte kan observera rörelser hos bihang eller bakkropp inom 15 sekunder efter en försiktig omrörning i testkärlet. (Eventuell annan definition som används måste rapporteras tillsammans med motsvarande hänvisning.)

▼B

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Unga honor av *Daphnia* (föräldragenerationen) som är yngre än 24 timmar vid testets början exponeras för testämnet som tillsätts vatten i en serie koncentrationer. Testperiodens längd är 21 dagar. Vid testets slut görs en bedömning av mängden levande avkomma per föräldrageneration. Sådan avkomma som producerats under testet men som dör under testets gång räknas inte med. Föräldragenerationens reproduktionskapacitet kan uttryckas på andra sätt (t.ex. mängden avkomma som producerats per djur per dag från och med första dagen då avkomma observerades). Sådana andra sätt måste i förekommande fall rapporteras separat, utöver varje föräldragenerations totala mängd levande avkomma vid testets slut. Reproduktionskapaciteten hos djur som exponeras för testämnet jämförs med kontrollgruppens (kontrollgruppernas) reproduktionskapacitet i syfte att fastställa den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC). Dessutom bör data i så stor utsträckning det är möjligt analyseras med en regressionsmodell i syfte att uppskatta den koncentration som skulle leda till en minskning på x % av reproduktionskapaciteten (t.ex. EC_{50}, EC_{20} eller EC_{10}).

Föräldragenerationens överlevnad och tiden fram till produktion av den första satsen avkomma måste också rapporteras. Övriga testämnesrelaterade verkningar på parametrar såsom tillväxt (t.ex. längd) och eventuellt inneboende tillväxthastighet kan också undersökas.

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Resultat från test avseende akut toxicitet (se metod C.2, del I) som utförts på *Daphnia magna* bör finnas tillgängliga. Resultaten kan vara användbara vid valet av lämpliga testkoncentrationer för reproduktionstest. Data om testämnets vattenlöslighet och ångtryck bör vara kända och man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningarna med rapporterad återhämtningsgrad och bestämningsgräns.

För definition av testförhållandena bör man ange bl.a. testämnets strukturformel, renhet, stabilitet i ljus, stabilitet vid testförhållandena, pKa, P_{ow} och resultaten från test för biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C.4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att ett test ska vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för kontrollgruppen (kontrollgrupperna):

— Föräldragenerationens mortalitet (honor av *Daphnia)* får inte överskrida 20 % vid testets slut.

— Det genomsnittliga antalet avkommor som har producerats per föräldradjur och som lever vid testets slut måste vara > 60.

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Utrustning**

Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testämnet bör vara tillverkade av glas eller annat kemiskt inert material. I regel används glasbägare.

Dessutom behövs åtminstone en del av följande utrustning:

— Syrgasmätare (med mikroelektrod eller annan lämplig anordning för mätning av löst syrgas i lågvolymsprover).

▼B

— Utrustning för temperaturreglering.

— pH-meter.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad.

— Utrustning för bestämning av totalt organiskt kol (TOC) i vattnet eller utrustning för bestämning av kemisk syreförbrukning (COD).

— Apparatur för reglering av belysningen och mätning av ljusets intensitet.

1.6.2 **Testorganism**

Testet utförs på *Daphnia magna* Straus. Andra *Daphnia-arter* kan användas förutsatt att de uppfyller tillämpliga giltighetskriterier (ett relevant giltighetskriterium är reproduktionskapaciteten i kontrollgrupperna). Om andra arter av *Daphnia* används måste de identifieras ordentligt och det ska motiveras varför de används.

Klonen ska helst identifieras med hjälp av genotypen. Forskningsresultat (1) har visat att reproduktionskapaciteten hos klon A (som härrör från IRCHA i Frankrike) (3) genomgående uppfyller giltighetskriteriet som gäller ett genomsnitt på > 60 överlevande avkommor per föräldradjur vid odling i de betingelser som beskrivs i denna metod. Andra kloner kan godtas förutsatt att *Daphnia*-odlingen kan påvisas uppfylla giltighetskriterierna för ett test.

Vid testets början måste djuren vara yngre än 24 timmar och får inte tillhöra den första satsen avkomma. Djuren måste komma från en frisk stam (dvs. de får inte uppvisa tecken på stress, t.ex. hög mortalitet, förekomst av hanar och ephippia. fördröjd produktion av första satsen avkomma, missfärgade djur osv.). Stamdjuren måste hållas vid samma odlingsbetingelser (ljus, temperatur, medium, utfodring och djur per volymenhet) som används vid testet. Om annat än normalt odlingsmedium för *Daphnia* används vid testet är det tillrådligt med en acklimatiseringsperiod på i regel cirka tre veckor (dvs. en generation) innan testets inleds, för att undvika stress på föräldragenerationen.

1.6.3 **Testmedium**

För testet rekommenderas ett fullständigt definierat medium. Avsaknaden av tillsatser (t.ex. alger, jordextrakt osv.) som är svåra att karakterisera möjliggör bättre standardisering mellan laboratorier. Elendt M4- (4) och M7-medier (se bilaga 1) har konstaterats vara lämpliga för ändamålet. Andra medier (se t.ex. (5) och (6)) kan godtas förutsatt att det kan visas att *Daphnia*-odlingen uppfyller giltighetskriterierna för testet.

Vid användning av medier som innehåller icke definierade tillsatser ska dessa tillsatser klart specificeras och uppgifter om deras sammansättning lämnas i testrapporten. Det är särskilt viktigt att ange kolhalten, eftersom kol kan utgöra ett fodertillskott. Det rekommenderas att totalt organiskt kol (TOC) och/eller kemisk syreförbrukning (COD) bestäms i en stamberedning av den organiska tillsatsen och att en uppskattning görs av hur denna påverkar TOC/COD i testmediet. TOC-nivån i mediet (dvs. före tillsats av algerna) bör vara lägre än 2 mg/l (7).

▼B

Vid testning av ämnen som innehåller metaller är det viktigt att beakta det faktum att testmediets egenskaper (t.ex. hårdhet och kelateringsförmåga) kan ha inverkan på testämnets toxicitet. Därför rekommenderas ett fullständigt definierat medium. För närvarande är Elendt M4 och M7 de enda medier som veterligen är lämpliga för långtidsodling av *Daphnia magna.* Båda medierna innehåller kelatbildaren EDTA. Det finns resultat (2) som tyder på att toxiciteten hos kadmium i regel förefaller vara lägre när reproduktionstestet genomförs i M4- och M7-medier än i när det genomförs i medier som inte innehåller EDTA. M4 och M7 rekommenderas därför inte för testning av ämnen som innehåller metaller. Likaså bör andra medier som innehåller kända kelatbildare undvikas. I fråga om metallhaltiga ämnen kan det vara tillrådligt att använda ett alternativt medium såsom ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten (7) som inte innehåller EDTA, med tillsats av algextrakt (8). Kombinationen av ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten och algextrakt är också lämplig för långtidsodling och testning av *Daphnia magna* (2), även om det fortfarande förekommer en svag keleringseffekt på grund av den organiska komponenten i det tillförda algextraktet.

Vid testets början och under testets gång bör halten upplöst syrgas ligga över 3 mg/l. pH-värdet bör ligga inom området 6–9 och bör i regel inte variera med mer än 1,5 enheter inom ett test. En vattenhårdhet över 140 mg/l (som $CaCO_3$) rekommenderas. Vid test med denna nivå och över har man kunnat observera en reproduktionskapacitet som uppfyller giltighetskriterierna (9) (10).

1.6.4 **Testlösningar**

Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna bör helst beredas genom upplösning av ämnet i testmediet.

I vissa fall behövs organiska lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att få en stamlösning av lämplig koncentration, men användningen av sådana hjälpämnen bör undvikas med alla medel. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol. Exempel på lämpliga dispergeringsmedel är Cremophor RH40, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Testämnets halt i testlösningarna bör under inga omständigheter överskrida lösligheten i testmediet.

Lösningsmedel används för att producera en stamlösning som kan doseras exakt i vatten. Vid den rekommenderade lösningsmedelskoncentrationen i det slutliga testmediet (< 0,1 ml/l) är de ovan uppräknade lösningsmedlen inte toxiska och ökar inte ämnets vattenlöslighet.

Dispergeringsmedel kan underlätta dispergering och exakt dosering. Vid den rekommenderade koncentrationen i det slutliga testmediet (≤ 0,1 ml/l) är de ovan uppräknade dispergeringsmedlen inte toxiska och ökar inte ämnets vattenlöslighet.

▼B

1.7 TESTETS UTFORMNING

Fördelningen av behandlingar och den efterföljande hanteringen av testkärlen bör vara slumpmässig. I annat fall kan man få missvisande resultat som kan tolkas som en koncentrationsrelaterad verkan. Särskilt om testenheterna hanteras i koncentrationsordning kan vissa tidsrelaterade faktorer, såsom trötthet hos personalen eller andra felfaktorer, leda till större verkningar vid de högre koncentrationerna. Om testresultaten sannolikt kommer att påverkas av omständigheter i början av testet eller av miljöbetingelser, såsom placering i laboratoriet, bor man överväga blockuppdelning.

1.8 FÖRFARANDE

1.8.1 **Exponeringsförhållanden**

1.8.1.1 *Testperiodens längd*

Testperiodens längd är 21 dagar.

1.8.1.2 *Djurtäthet*

Föräldradjuren hålls individuellt, ett djur per testkärl, med 50–100 ml medium per kärl.

I vissa fall behövs större volymer med tanke på de krav som gäller för den analytiska procedur som används för bestämning av testämnets koncentration, även om det för den kemiska analysen är tillåtet med pooling av replikat. Om volymer över 100 ml används måste eventuellt den dos som ges till *Daphnia* ökas för att garantera tillräcklig tillgång på foder och förenlighet med giltighetskriterierna. Vid genomflödestest kan alternativ testutformning övervägas av tekniska skäl (t.ex. fyra grupper med 10 djur per grupp i en större volym), men varje ändring av testutformningen måste rapporteras.

1.8.1.3 *Antalet djur*

För halvstatiskt test behövs minst 10 djur per testkoncentration och minst 10 individuellt hållna djur i kontrollserierna.

För genomflödestest har en uppdelning med 40 djur i fyra grupper om 10 djur per testkoncentration visat sig vara lämplig (1). Ett mindre antal testorganismer kan användas och man rekommenderar ett minimum på 20 djur per koncentration uppdelade i två eller flera replikat med samma antal djur (t.ex. fyra replikat med fem *Daphnia* per replikat). I fråga om test där djuren hålls i grupper bör man dock beakta att reproduktionskapaciteten inte kan uttryckas som totalantalet överlevande avkommor per föräldradjur om föräldradjur dör. I sådana fall måste reproduktionskapaciteten uttryckas som ”totalantalet överlevande avkommor som har producerats per föräldradjur som fanns närvarande vid testets början”.

1.8.1.4 *Utfodring*

Vid halvstatiskt test ges foder helst dagligen men minst tre gånger per vecka (vid byte av medium). Avvikelser från detta (t.ex. vid genomflödestest) måste rapporteras.

▼B

Under testet bör föräldradjuren helst utfodras med levande algceller. En eller flera av följande arter kan användas: *Chlorella* sp. *Selenaslrum capricornutum* (numera *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) och *Scenedesmus subspicatus*. Utfodringen bör grunda sig på mängden organiskt kol (C) som ges till varje föräldradjur. Forskningsresultat (12) för *Daphnia magna* har visat att det är tillräckligt med dosnivåer mellan 0,1 och 0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag för att nå upp till den mängd avkomma som behövs med tanke på giltighetskriterierna för testet. Dosen kan ges med konstant dosering under hela testet eller, om så önskas, med lägre dosering i början och därefter ökande dosering i takt med föräldradjurens tillväxt. I det senare fallet bör dosen ändå alltid hållas inom det rekommenderade området 0,1–0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag.

Om andra matningssätt (t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans) används för att kontrollera utfodringens dosnivå (av bekvämlighetsskäl, eftersom mätning av kolhalten är tidskrävande) måste varje laboratorium upprätta egna nomogram för mätningarna av algodlingens kolhalt (i bilaga 2 finns anvisningar för hur man upprättar nomogram). Nomogrammen måste ses över minst årligen, och oftare om algodlingsbetingelserna har förändrats. Ljusabsorbans har konstaterats vara en bättre metod än cellräkning när det gäller bestämning av kolhalten (13).

Algsuspensionen som används för utfodring av *Daphnia* bör vara koncentrerad, så att minimal volym algodlingsmedium överförs till testkärlen. För att höja algkoncentrationen kan man använda centrifugering med påföljande återsuspension i destillerat vatten, avjoniserat vatten eller *Daphnia*-odlingsmedium.

1.8.1.5 *Ljus*

Ljuset hålls på i 16 timmar med en intensitet som inte överskrider 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6 *Temperatur*

Temperaturen i testmediet bör hållas inom området 18–22 °C. Inom ett och samma försök får temperaturen i mån av möjlighet inte variera med mer än 2 °C inom de angivna gränserna (t.ex. 18–20, 19–21 eller 20–22 °C). Temperaturövervakningen kan gärna ordnas med hjälp av ett extra testkärl.

1.8.1.7 *Luftning*

Testkärlen får inte luftas under testet.

1.8.2 **Testkoncentrationer**

I regel används minst fem testkoncentrationer. Koncentrationerna bör ligga i en geometrisk serie med en separationsfaktor som helst inte bör överskrida 3,2. Dessutom bör ett lämpligt antal replikat användas för varje testkoncentration (se avsnitt 1.8.1.3). Om mindre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Ämnen får inte testas i koncentrationer som överskrider löslighetsgränsen i testmediet.

▼B

Vid valet av koncentrationsområde bör man beakta följande:

i) Om syftet är att få värden på LOEC eller NOEC måste den lägsta testkoncentrationen vara tillräckligt låg för att fertiliteten vid den koncentrationen inte ska vara signifikant lägre än i kontrollgruppen. I annat fall måste testet upprepas med en lägre lägsta koncentration.

ii) Om syftet är att få värden på LOEC eller NOEC måste den högsta testkoncentrationen vara tillräckligt hög för att fertiliteten vid den koncentrationen ska vara signifikant lägre än i kontrollgruppen. I annat fall måste testet upprepas med en högre högsta koncentration.

iii) Om man bestämmer EC_X för verkningar på reproduktionskapaciteten är det tillrådligt att använda tillräckligt antal koncentrationer för att möjliggöra bestämning av EC_x med tillräcklig konfidensnivå. Om man bestämmer $EC_{5()}$ för verkningar på reproduktionskapaciteten är det tillrådligt att den högsta testkoncentrationen är högre än detta värde på EC_{50}. I annat fall blir konfidensintervallet för EC_{50} mycket brett, även om det fortfarande är möjligt att bestämma värdet på EC_{50}, och då blir det kanske inte möjligt att få en tillfredsställande bedömning av den anpassade modellens lämplighet.

iv) Testkoncentrationsområdet bör helst inte innehålla koncentrationer som framkallar en statistiskt signifikant verkan på vuxna exemplars överlevnad. I ett sådant fall övergår nämligen testets natur från ett enkelt reproduktionstest till ett kombinerat reproduktions- och mortalitetstest, för vilket det krävs en mycket mer komplex statistisk analys.

Tidigare kunskap om testämnets toxicitet (t.ex. från test avseende akut toxicitet eller preliminära test) är till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används för att underlätta beredningen av testlösningar (se avsnitt 1.6.4) får slutkoncentrationen i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör användas i alla testkärl.

1.8.3 **Kontrollserier**

En kontrollserie för testmediet och i förekommande fall en kontrollserie med lösnings- eller dispergeringsmedlet bör köras utöver testserierna. Kontrollseriernas lösningsmedel eller dispergeringsmedel bör ha samma koncentration som i testserierna. Lämpligt antal replikat bör användas (se avsnitt 1.8.1.3).

I ett väl utfört test bör variationskoefficienten kring det genomsnittliga antalet levande avkommor som i kontrollgrupperna produceras per föräldradjur i regel vara 25 %. Värdet måste rapporteras i testutformningar där djuren hålls individuellt.

1.8.4 **Förnyelse av testmediet**

Frekvensen för förnyelse av testmediet beror på testämnets stabilitet, men får inte underskrida tre gånger i veckan. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte hålls stabilt (dvs. utanför området 80–120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under det maximala förnyelseintervallet (dvs. tre dagar) bör man överväga förnyelse med kortare intervall eller användning av genomflödestest.

▼B

Vid halvstatiskt test görs förnyelse av mediet genom att en ny serie testkärl ställs i ordning och föräldradjuren överförs till de nya kärlen t.ex. med en glaspipett av lämplig diameter. Volymen medium som överförs med *Daphnia* bör vara så liten som möjligt.

1.8.5 **Observationer**

Resultaten av de observationer som görs under testet registreras på blanketter (se exempel i bilagorna 3 och 4). Om andra mätningar krävs (se 1.3 och 1.8.8) behövs eventuellt tilläggsobservationer.

1.8.6 **Avkomma**

Det rekommenderas att avkommorna från varje föräldradjur tas bort och räknas dagligen efter det att produktionen av avkomma har satt i gäng, för att hindra avkommorna från att konsumera foder som är avsett för vuxna exemplar. I test enligt denna metod behöver bara levande avkommor räknas, men förekomsten av aborterade ägg eller döda avkommor bör registreras.

1.8.7 **Mortalitet**

Mortaliteten bland föräldradjuren bör registreras, helst dagligen och minst varje gång avkommorna räknas.

1.8.8 **Övriga parametrar**

Även om denna metod främst är avsedd för bedömning av verkningarna på reproduktionskapaciteten är det möjligt att övriga verkningar kan kvantifieras i tillräcklig grad med tanke på statistisk analys. Tillväxtmätningar är mycket önskvärda eftersom de ger information om eventuella subletala verkningar. Sådan information kan vara mer användbar än informationen från rena reproduktionsmätningar. Mätning av föräldradjurens längd (t.ex. kroppslängd exklusive analfenan) vid testets slut rekommenderas. Övriga parametrar som kan mätas eller beräknas är tiden fram till att den första satsen avkomma (och efterföljande satser) produceras, satsernas antal och storlek per djur, antalet aborterade satser, förekomsten av hanar eller *ephippia* och den inneboende tillväxthastigheten.

1.8.9 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Syrgashalten, temperaturen, hårdheten och pH bör mätas minst en gång i veckan i färska och gamla medier, i kontrollsatserna och i den högsta testämneskoncentrationen.

Under testets gång bor testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall.

Vid halvstatiskt test, där testämnets koncentration bör hållas inom 20 % av den nominella koncentrationen (dvs. inom området 80–120 %, se avsnitten 1.4 och 1.8.4), rekommenderas att de högsta och lägsta testkoncentrationerna analyseras minst en gång under testets första vecka, strax efter beredningen och vid förnyelse (analyserna görs alltså på ett prov av samma lösning – när den är nyberedd och när den förnyas). Dessa bestämningar upprepas därefter minst varje vecka.

▼B

Vid test där testämnets koncentration inte förväntas hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen är det nödvändigt att analysera alla testkoncentrationer, när de är nyberedda och när de förnyas. Vid test där testämnets uppmätta startkoncentration inte ligger inom ± 20 % av den nominella koncentrationen men det finns tillräckliga bevis på att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom området 80–120 % av startkoncentrationerna), kan de kemiska bestämningarna under testets vecka 2 och 3 begränsas till de högsta och lägsta testkoncentrationerna. Under alla omständigheter behöver bestämning av testämnets koncentration före förnyandet bara göras för ett enda replikatkärl per testämneskoncentration.

Vid genomflödestest kan man lämpligen använda samma provtagningsschema som vid halvstatiska test (även om mätningen av ”gammal” lösning då inte är tillämplig). Det kan dock vara tillrådligt att utöka antalet provtagningstillfallen under den första veckan (t.ex. tre mätningar) som kontroll på att testkoncentrationerna hålls stabila. Vid dessa typer av försök bör strömningshastigheten för spädningsmedel och testämne kontrolleras dagligen.

Om det däremot finns bevis på att testämnets koncentration i lösningen har hållits tillfredsställande inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan nominella eller uppmätta startvärden användas som grund för resultaten. Om avvikelsen från nominell eller uppmätt startkoncentration är större än 20 % bör resultaten uttryckas i form av tidsvägda medelvärden (se bilaga 5).

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Syftet med testet är att bestämma hur testämnet påverkar antalet levande avkommor som produceras av varje föräldradjur som har överlevt testet. Totalantalet avkommor per föräldradjur beräknas för varje testkärl (varje replikat). Om föräldradjuret i något av replikaten dör under testet eller visar sig vara en hane, tas replikatet i fråga inte med i analysen. I ett sådant fall baserar sig analysen på ett reducerat antal replikat.

För uppskattning av LOEC och NOEC med avseende på kemikaliens verkan på reproduktionskapaciteten är det nödvändigt att beräkna den genomsnittliga reproduktionskapaciteten för replikaten per koncentration och den resterande standardavvikelsen. Detta kan göras med variansanalys (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration bör därefter jämföras med kontrollsatsen med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse. Dunnetts eller Williams test kan användas för ändamålet (14) (15) (16) (17). Det är nödvändigt att kontrollera hållbarheten hos ANOVA:s antagande om variansens homogenitet. Det är tillrådligt att detta görs grafiskt, hellre än genom ett test avseende formell signifikans (18). Ett lämpligt alternativ är att köra ett Bartlett-test. Om antagandet inte är hållbart måste man överväga att transformera data för att homogenisera varianserna innan ANOVA utförs, eller att utföra viktad ANOVA. Storleken på den verkan som kan detekteras med ANOVA (dvs. den minst signifikanta skillnaden) beräknas och rapporteras.

▼B

För uppskattningen av den koncentration som skulle orsaka en minskning på 50 % av reproduktionskapaciteten (dvs. EC_{50}) bör en lämplig kurva, t.ex. den logistiska kurvan, anpassas till data med hjälp av en statistisk metod. t.ex. minsta kvadrat-metoden. Kurvan bör parametriseras så att EC_{50} och standardfelet kan uppskattas direkt. Därigenom underlättas beräkningen av konfidensintervallen kring EC_{50}. Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % bör tillämpas, utom om det finns goda skäl för att välja andra konfidensnivåer. Anpassningsproceduren bör helst ge tillgång till ett medel för bedömning av signifikansen eller bristen på signifikans. Detta kan göras grafiskt eller genom att dela kvadraternas restsumma i ”brist på passning” och ”rena felkomponenter” och utföra ett signifikanstest avseende brist på passning. När man jämför behandlingar som ger låg fertilitet med behandlingar som ger hög fertilitet är det mer sannolikt att de senare leder till en högre varians avseende antalet avkommor som produceras. Därför bör man överväga viktning av de observerade värdena så att de återspeglar de olika varianserna i de olika behandlingsgrupperna (bakgrundsinformation finns i hänvisning 18).

Vid analysen av data från det slutliga ringtestet (2) anpassades en logistisk kurva med hjälp av följande modell (även andra lämpliga modeller kan användas):

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

där:

Y = det totala antalet avkommor per föräldradjur som är vid liv vid testets slut (beräknat för varje testkärl).

x = ämnets koncentration.

c = det förväntade antalet avkommor när x = 0.

x_0 = EC_{50} i populationen.

b = lutningsparametern.

Denna modell kan tillämpas i många situationer, även om den inte är lämplig för alla test. En kontroll av modellens giltighet bör göras på det sätt som föreslås ovan. I vissa fall kan det vara lämpligt med en hormesis-modell där låga koncentrationer ger ökade verkningar (19).

Man kan även uppskatta koncentrationerna för övriga verkningar, t.ex. EC_{10} eller EC_{20}. Det kan dock vara bättre att använda en annan parametrisering än den som används för uppskattning av EC_{50}.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne:**

— Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

▼B

— Kemiska identifieringsdata, inbegripet renhet.

2.2.2 **Försöksdjur:**

— Klonen (om den har identifierats med genotypen eller inte), leverantör eller ursprung (om uppgiften är känd) och de odlingsbetingelser som har använts. Om annan art än *Daphnia magna* har använts måste detta rapporteras och motiveras.

2.2.3 **Testförhållanden:**

— Använt testförfarande (t.ex. halvstatiskt test eller genomflödestest, volym, antal *Daphnia* per liter).

— Ljusperiod och ljusintensitet.

— Testets utformning (t.ex. antalet replikat, antalet föräldradjur per replikat).

— Detaljuppgifter om det odlingsmedium som har använts.

— I förekommande fall uppgifter om tillsatser av organiskt material och information om sammansättning, ursprung, beredningsmetod, TOC och COD för stamberedningar, uppskattning av resulterande TOC och COD i testmediet.

— Detaljerad information om utfodringen, inbegripet mängd (uttryckt som mg kol per *Daphnia* per dag) och schema (t.ex. typen av foder, och i fråga om alger specifikt namn (arter) och i den mån uppgifter finns, stam och odlingsbetingelser).

— Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall måste även lösnings- eller dispergeringsmedlet och dess koncentration anges).

2.2.4 **Resultat:**

— Resultaten från eventuella preliminära test gällande testämnets stabilitet.

— De nominella testkoncentrationerna och resultaten av alla analyser för att fastställa koncentrationen av testämnet i testkärlen (exempel på blanketter finns i bilaga 4). Metodens återhämtningsgrad och bestämningsgränsen måste även rapporteras.

— Vattenkvaliteten i testkärlen (pH, temperatur och halten upplöst syrgas, i förekommande fall TOC eller COD och hårdhet) (exempel på blanketter finns i bilaga 3).

— Fullständig registrering av levande avkommor från varje föräldradjur (exempel på blankett finns i bilaga 3).

— Antalet föräldradjur som dött och den dag de dött (exempel på blankett finns i bilaga 3).

— Variationskoefficienten för kontrollgruppens fertilitet (baserad på det totala antalet levande avkommor per föräldradjur som är vid liv vid testets slut).

— Kurva som visar det totala antalet levande avkommor per föräldradjur (för varje replikat) som är vid liv vid testets slut som funktion av testämneskoncentrationen.

— Den lägsta koncentrationen vid vilken verkan observeras på reproduktionskapaciteten (LOEC), inklusive en beskrivning av de statistiska metoder som har använts, en indikation om de observerade verkningarnas styrka och koncentrationen vid vilken ingen verkan på reproduktionen observeras (NOEC). I tillämpliga fall bör även LOEC och NOEC för föräldradjurens mortalitet rapporteras.

▼B

— I tillämpliga fall EC_X för reproduktion, konfidensintervall och en kurva för den anpassade modell som har använts för beräkningen, lutningen hos dos-responskurvan och dess standardavvikelse.

— Övriga observerade biologiska verkningar eller mätningar: Varje observerad eller uppmätt biologisk verkan (t.ex. föräldradjurens tillväxt) tillsammans med alla tillbörliga motiveringar.

— Motiveringar for varje avvikelse från testmetoden.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20 March 1993–21 March 1993.

2. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

3. Baird D. J., Barber J., Bradley M. C, Soares A.M.V.M. och Calow P. (1991), A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, s. 257–265.

4. Elendt B. P., (1990), Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, s. 25–33.

5. EPA (1993), Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

6. Vigano L., (1991), Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, s. 775–782.

7. ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

8. Baird D. J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. och Calow P. (1989), The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the lst European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H. Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), s. 144–148.

9. Parkhurst B. R., Forte J. L. och Wright G. P. (1981), Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, s. 1–8.

10. Cowgill U. M. och Milazzo D. P. (1990), The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2). s. 185–196.

11. Korshikov (1990), *Pseudokirchneriella subcapilala* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

12. Sims I. R., Watson S. och Holmes D. (1993), Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, sp. 2053–2058.

▼B

13. Sims 1. (1993), Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, s. 459–466.

14. Dunnett C. W., (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096–1121.

15. Dunnett C. W., (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 482–491.

16. Williams D. A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, s. 103–117.

17. Williams D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, s. 510–531.

18. Draper N. R. och Smith H. (1981), Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

19. Brain P. och Cousens R. (1989), An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, s. 93–96.

20. Wilson E. O. och Bossert, W. H. (1971), A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

21. Poole R. W. (1974), An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw-Hill Series in Population Biology, New York, s. 532.

22. Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. och Boyce M. S. (1986), Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, s. 1156–1166.

▼B

Bilaga 1

BEREDNING AV FULLSTÄNDIGT DEFINIERADE ELENDT M7- OCH M4-MEDIER

Acklimatisering till Elendt M7- och M4-medier

I vissa laboratorier har man stött på svårigheter vid direkt överföring av *Daphnia* till M4- (1) och M7-medier. Man har haft vissa framgångar med stegvis acklimatisering, dvs. först en överflyttning till 30 % Elendt, sedan till 60 % Elendt och därefter till 100 % Elendt. I vissa fall måste acklimatiseringsperioden utsträckas till en månad.

BEREDNING

Spårelement

Separata stamlösningar (1) av enskilda spårelement bereds först i vatten av lämplig renhet (renat t.ex. genom avjonisering, destillering eller omvänd osmos). Utifrån dessa stamlösningar (I) bereds en andra stamlösning (II) som innehåller alla spårelement (kombinerad lösning), enligt tabellen nedan.

Stamlösningar I (enskilt ämne)	Mängd som sätts till vallen (mg/l)	Koncentration (i förhållande till medium M4) (faktor)	För beredning av kombinerad stamlösning II tillsätts följande mängd stamlösning I till vatten (ml/1)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ * 4 H_2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ * 6 H_20	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ * 2 H_2O	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ * 6 H_2O	200	20 000	1,0	1,0
Kl	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2EDTA * 2 H_20	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ * 7 H_2O	1 991	2 000	—	—

Na_2EDTA- och $FeSO_4$-lösningarna bereds separat, hälls samman och sätts omedelbart i autoklav. Det ger följande:

21 Fe-EDTA-lösning		1 000	20,0	5,0

▼B

M4- och M7-medier

M4- och M7-medier bereds med användning av stamlösning II, makronäringsämnen och vitaminer, enligt tabellen nedan.

	Mängd som sätts till vatten mg/l	Koncentration (i förhållande till medium M4) (faktor)	Mängd stamlösning som tillsätts för beredning av medium (m1/l)	
			M 4	M 7
Stamlösning II med kombination av spårelement		20	50	50
Stamlösningar med makronäringsämnen				
$CaCl_2$ * 2 H_20	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KC1	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_20	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombinerad vitaminstamlösning	—	10 000	0,1	0,1
Den kombinerade vitaminstamlösningen bereds genom att sätta till de tre vitaminerna till en liter vatten enligt nedan.				
Tiaminhydroklorid	750	10 000		
Cyanocobalamin (B_{12})	10	10 000		
Biotin	7,5	10 000		

Den kombinerade vitaminstamlösningen lagras nedfryst i små alikvoter. Vitaminerna sätts till medierna strax före användningen.

Anm. För att undvika utfällning av salter vid beredning av det kombinerade mediet ska man tillsätta stamlösningsalikvoterna till cirka 500–800 ml avjoniserat vatten och därefter fylla upp till en liter.

Anm. Den första offentliggjorda informationen om M4-medium finns i Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, s. 25–33.

▼B

Bilaga 2

ANALYS AV TOTALT ORGANISKT KOL (TOC) OCH UPPRÄTTANDE AV NOMOGRAM FÖR TOC I ALGFODER

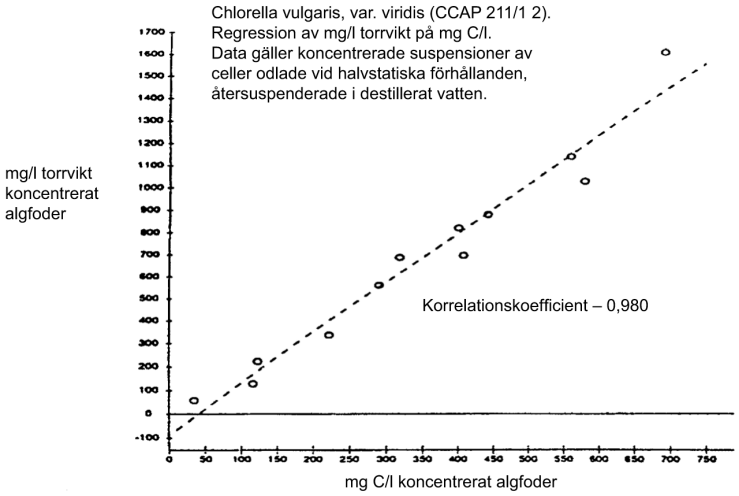
Det är allmänt känt att kolhalten i algfodret i regel inte mäts direkt utan fås genom korrelationer (nomogram) med surrogatmätningar av t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans.

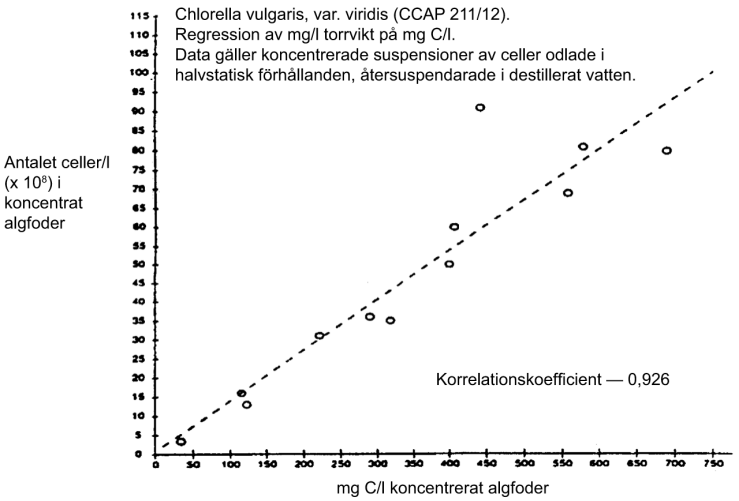
För mätning av TOC är högtemperaturoxidation att föredra framför UV- eller persulfatmetoder. (Se *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon. Total Oxygen Demand and Related Determinands,* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Före mätningarna för nomogrammet separeras algerna från tillväxtmediet genom centrifugering med påföljande återsuspension i destillerat vatten. För varje prov mäts surrogatparametern och TOC tre gånger. Blindprov med destillerat vatten bör analyseras och TOC-värdet härledas från det TOC-värde som erhållits för algprovet.

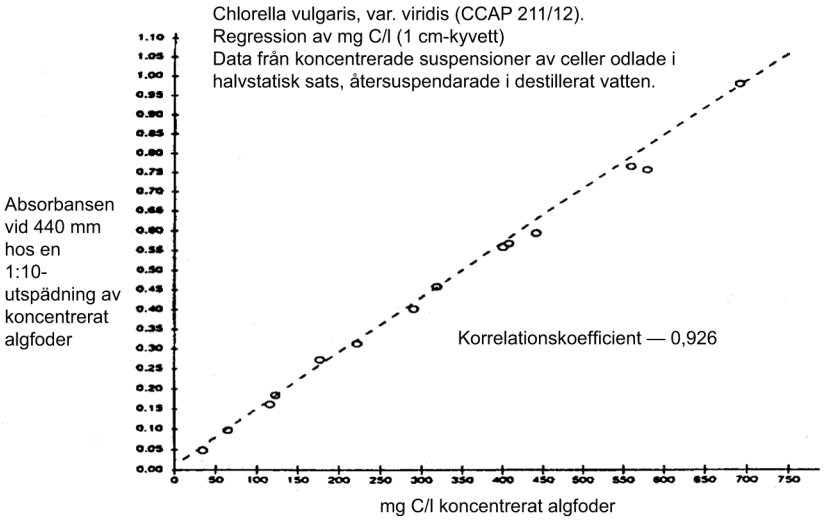
Nomogrammet bör vara linjärt över det avsedda kolhaltområdet. Nedan visas några exempel.

Anm.: Dessa exempel bör inte användas för konversioner. Det är väsentligt att laboratorierna upprättar egna nomogram.





▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 211/12).
Regression av mg C/l (1 cm-kyvett)
Data från koncentrerade suspensioner av celler odlade i halvstatisk sats, återsuspendarade i destillerat vatten.
Absorbansen vid 440 mm hos en 1:10-utspädning av koncentrerat algfoder
Korrelationskoefficient — 0,926
mg C/l koncentrerat algfoder

Bilaga 3

EXEMPEL PÅ BLANKETT FÖR REGISTRERING AV MEDIUMFÖRNYELSE, FYSIKALISK-KEMISKA UPPFÖLJNINGSDATA, UTFODRING, DAPHNIA-REPRODUKTION OCH VUXENMORTALITET

Försök nr:	Data fr.o.m.:	Klon:	Medium:	Typ av foder:	Testämne:	Nominell konc.:

Dag	0	]	2	!	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Mediumförnyelse bocka för)																								
PH (1)																							färsk	
																							gammal	
0_2 mg/l (1)																							färsk	
																							gammal	
Temperatur (°C) (1)																							färsk	
																							gammal	
Utfordring (bocka för)																								
Antal levande (2)																								Total
Kärl 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼B

Försök nr:		Data fr.o.m.:			Klon:				Medium:				Typ av foder:				Testämne:				Nominell konc.:			
Dag	0	]	2	!	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Kumulativ vuxenmortalitet ([3])																								

([1]) Ange vilket kärl som användes för försöket.
([2]) Markera varje dött provexemplar med ”M” i relevant ruta.
([3]) Markera aborterade satser med ”AB” i relevant ruta.

▼B

Bilaga 4

EXEMPEL PÅ BLANKETT FÖR REGISTRERING AV RESULTAT FRÅN KEMISK ANALYS

(a) **Uppmätta koncentrationer**

Nominell konc.	Prov från vecka 1		Prov från vecka 2		Prov från vecka 3	
	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal

(b) **Uppmätta koncentrationer uttryckta som procent av nominella koncentrationer**

Nominell konc.	Prov från vecka 1		Prov från vecka 2		Prov från vecka 3	
	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal

▼B

Bilaga 5

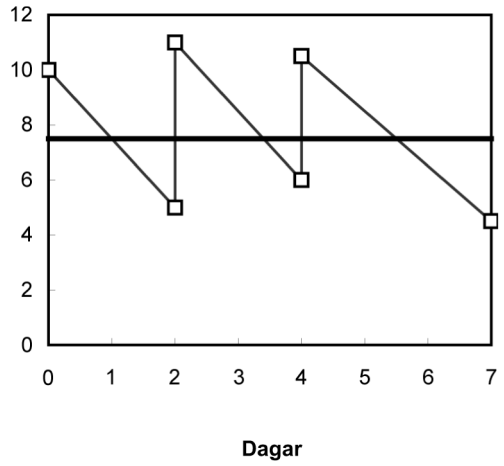
BERÄKNING AV TIDSVÄGT MEDEL VÄRDE

Tidsvägt medelvärde

Utifrån det faktum att testämnets koncentration kan sjunka under perioderna mellan mediumförnyelse är det nödvändigt att överväga vilken koncentration man ska anse utgöra representativ koncentration för det koncentrationsområde som föräldragenerationen av *Daphnia* exponeras för. Valet ska basera sig på både biologiska och statistiska faktorer. Om man t.ex. tror att fortplantningen mest påverkas av den högsta koncentrationen som förekommer ska den koncentrationen användas som representativ koncentration. Om däremot ackumulerade verkningar eller långtidsverkningar av det toxiska ämnet anses vara viktigare ska medelkoncentrationen användas. I det fallet är det lämpligt att använda tidsvägd medelkoncentration eftersom den beräknas med beaktande av de variationer som den momentana koncentrationen genomgår över tiden.

Figur 1:

Exempel på tidsvägt medelvärde



I figur 1 visas ett exempel på ett (förenklat) test som omfattar 7 dagar och där mediumförnyelse görs dag 0, 2 och 4.

Den tunna linjen som går upp och ned representerar momentana koncentrationer. Koncentrationssänkningen antas följa en exponentiell sönderfallsprocess.

De sex punkterna representerar observerade koncentrationer som har uppmätts vid början och slutet av varje förnyelseperiod.

Den tjocka horisontella linjen indikerar nivån för det tidsvägda medelvärdet.

Det tidsvägda medelvärdet beräknas så, att ytan under det tidsvägda medelvärdet är lika stor som ytan under koncentrationskurvan. Beräkningen för exemplet i figuren ovan illustreras i tabell 1.

▼B

Tabell 1:

Beräkning av tidsvägt medelvärde

Förnyelse nr	Dagar	Konc0	Konc1	Ln(KoncO)	Ln(Konc1)	Yta
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Jagar totalt: 7					Totalyta	50,091
					Tidsvägt medeltal	7,156

Dagar avser antalet dagar i förnyelseperioden.

Konc0 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods början.

Konc1 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods slut.

Ln(konc0) är den naturliga logaritmen av Konc0

Ln(Konc1) ar den naturliga logaritmen av Konc1

Yta år ytan under den exponentiella kurvan för varje förnyelseperiod. Den beräknas enligt följande:

$$Area = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times dagar$$

Det tidsvägda medelvärdet är värdet för Totalyta dividerat med värdet för Dagar totalt.

För *Daphnia*-reproduktionstest måste tabellen självfallet utökas så att den sträcker sig över 21 dagar.

När observationer görs endast i början och slutet av varje förnyelseperiod är det uppenbart att det inte ar möjligt att bekräfta att sönderfallsprocessen verkligen är exponentiell. En annorlunda kurva skulle resultera i en annorlunda beräkning av värdet för Yta. Det är dock inte osannolikt att sönderfallsprocessen är exponentiell och därför är en sådan kurva troligen det bästa alternativet, i brist på annan information.

Däremot finns det anledning att se upp om man genom den kemiska analysen vid förnyelseperiodens slut inte lyckas få fram någon halt av ämnet. Om det inte är möjligt att uppskatta hur snabbt ämnet har försvunnit ur lösningen är det inte möjligt att få en realistisk yta under kurvan, och följaktligen inte heller möjligt att få ett meningsfullt tidsvägt medelvärde.

▼B

C.21 JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KVÄVE

1. METOD

Denna testmetod är i stort sett identisk med OECD TG 216 (2000).

1.1 INLEDNING

Den testmetod som beskrivs här är en laboratoriemetod för undersökning av vilka långtidseffekter en engångsexponering av en kemikalie kan ha på jordlevande mikroorganismers omvandling av kväve. Testmetoden grundar sig i huvudsak på rekommendationerna från Växtskyddsorganisationen för Europa och Medelhavsområdet (EPPO) (1). Även övriga riktlinjer har beaktats, till exempel riktlinjerna från Biologische Bundesanstalt i Tyskland (2), Environmental Protection Agency i USA (3) SETAC (4) och Internationella standardiseringsorganisationen (5). Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment i Belgirate, Italien, 1995 (6), kom man överens om hur många och vilka jordtyper som ska användas i detta test. Rekommendationerna för insamling, hantering och lagring av jordprover grundar sig på ISO-riktlinjer (7) och rekommendationer från workshopen i Belgirate. Vid bedömning och utvärdering av olika ämnens toxiska egenskaper kan det vara nödvändigt att bestämma effekterna på den mikrobiella aktiviteten i jorden, till exempel när det behövs upplysningar om potentiella bieffekter som växtskyddsprodukter kan ha på mikrofloran i jorden, eller när det kan förväntas att de jordlevande mikroorganismerna exponeras för andra kemikalier än växtskyddsprodukter. Testet rörande omvandling av kväve görs för att bestämma sådana kemikaliers effekter på mikrofloran i jorden. Vid testning av jordbrukskemikalier (till exempel växtskyddsprodukter, gödselmedel, skogskemikalier) bör testet omfatta både omvandling av kväve och omvandling av kol. För övriga kemikalier är det tillräckligt med test rörande omvandling av kväve. När sådana kemikalier testas rörande omvandling av kväve och man får EC_{50}-värden som faller inom samma område som gäller för kommersiellt tillgängliga nitrifikationshämmande medel (till exempel nitrapyrin), kan man även göra test rörande omvandling av kol i syfte att få ytterligare upplysningar.

Jord består av levande och icke-levande komponenter som förekommer i komplexa och heterogena sammansättningar. Mikroorganismerna spelar en viktig roll för nedbrytning och omvandling av organiskt material i fertila jordar. Det finns många olika arter av mikroorganismer som inverkar på olika aspekter av jordens fertilitet. Långvariga störningar av dessa biokemiska processer kan även störa kretsloppet av näringsämnen, vilket i sin tur kan leda till förändringar av jordens fertilitet. Omvandling av kol och kväve sker i alla fertila jordar. Även om de mikrobsamhällen som utför dessa processer varierar från jord till jord, följer omvandlingen i huvudsak samma mönster.

Syftet med den testmetod som beskrivs här är att upptäcka de skadliga långtidseffekter som ett ämne kan ha på omvandlingen av kväve i aerob ytjord. Testmetoden kan också användas för att uppskatta olika ämnens effekter på den omvandling av kol som utförs av mikrofloran i jorden. Nitratbildning sker efter att kol-kvävebindningarna har brutits. Om nitratproduktionen sker med samma hastighet i behandlad jord och kontrolljord, är det därför mycket sannolikt att de viktigaste kolnedbrytningsfunktionerna är intakta och välfungerande. Det substrat som har valts för testet (lusernmjöl) har en gynnsam kol/kväve-kvot (i regel mellan 12/1 och 16/1). Därigenom reduceras kolbristen under testets gång, och om ett mikrobsamhälle skadas av en kemikalie är det möjligt att det återhämtar sig inom 100 dagar.

▼B

De test som har använts som grund för denna testmetod är primärt utformade för situationer där den mängd ämne som når jorden kan förutses. Så är fallet till exempel för växtskyddsprodukter där man känner till den mängd som har applicerats på en åker. För jordbrukskemikalier räcker det med att testa två sådana doser som är relevanta med tanke på den förväntade dosen. Jordbrukskemikalier kan testas med avseende på aktiva ämnen eller produktsammansättningar. Testet är dock inte begränsat till jordbrukskemikalier. Genom att ändra både mängderna testämne som tillförs jorden och metoderna för utvärdering av data, kan testet även användas för situationer där mängden kemikalie som förväntas nå jorden inte är känd. På så sätt kan man i fråga om andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestämma effekterna av en serie koncentrationer på omvandlingen av kväve. Erhållna testdata används för att rita upp en dos-responskurva och beräkna EC_x-värden, där x är den procentuella effekten.

1.2 DEFINITIONER

Omvandling av kväve: Den slutliga nedbrytningen av kvävehaltigt material genom inverkan av mikroorganismer. Nedbrytningen sker via ammonifiering och nitrifiering, och utmynnar i den oorganiska slutprodukten nitrat.

EC_x (effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kväve till nitrat hämmas till x procent.

EC_{50} (median effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kväve till nitrat hämmas till 50 procent.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Siktad jord förbättras med växtmjöl och behandlas med testämnet eller lämnas obehandlad (kontrollprov). Vid testning av jordbrukskemikalier rekommenderas minst två testkoncentrationer, och dessa bör väljas med beaktande av den högsta koncentration som kan förväntas nå jorden. Efter 0, 7, 14 och 28 dagars inkubation behandlas jordproverna (behandlad jord och kontrolljord) med ett lämpligt lösningsmedel och extrakten analyseras med avseende på nitratmängd. Nitratbildningshastigheten i behandlade prover jämförs med den i kontrollproverna, och den procentuella avvikelsen mellan behandlade prover och kontrollprover beräknas. Alla test bör omfatta minst 28 dagar. Om skillnaderna mellan behandlade och obehandlade prover är minst 25 % dag 28, görs fortsatta bestämningar under en period som maximalt sträcker sig till dag 100. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier tillförs en serie koncentrationer av testämnet till jordproverna och mängderna bildat nitrat i behandlade och obehandlade prover bestäms efter inkubation i 28 dagar. Resultaten från test med flera koncentrationer analyseras med hjälp av en regressionsmodell och relevanta EC_X-värden beräknas (till exempel EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}). Se definitionerna.

1.5 TESTETS GILTIGHET

Utvärderingen av testresultat rörande jordbrukskemikalier baserar sig på relativt små skillnader (till exempel medelvärde ± 25 %) mellan nitratkoncentrationerna i obehandlade och behandlade jordprover. Därför kan stora variationer i de obehandlade proverna leda till falska resultat. Variationen mellan obehandlade replikatprover bör därför vara mindre än ± 15 %.

▼B

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Utrustning**

Provbehållarna bör vara tillverkade av kemiskt inert material. Deras volym bör anpassas till det förfarande som används för inkubation av jorden, till exempel inkubation som bulk eller som en serie individuella jordprover (se avsnitt 1.7.1.2). Det är viktigt att minimera vattenförlusterna och sörja för gasväxling under testets förlopp (provbehållarna kan till exempel täckas med perforerad polyetylenfilm). Vid testning av flyktiga ämnen bör förseglingsbara och gastäta behållare användas. Behållarnas storlek bör anpassas så att jordprovet upptar cirka en fjärdedel av behållarens volym.

Därutöver behövs normal laboratorieutrustning, enligt följande:

— Omrörare: en mekanisk skakapparat eller motsvarande.

— Centrifug (3 000 g) eller filtreringsutrustning (med nitratfritt filterpapper).

— Instrument för nitratanalys, med adekvat känslighet och reproducerbarhet.

1.6.2 **Valet av jord och antal jordtyper**

Endast en typ av jord används. Följande rekommendationer gäller för jorden:

— Sandhalt: minst 50 % och högst 75 %.

— pH: 5,5–7,5.

— Halten organiskt kol: 0,5–1,5 %.

— Den mikrobiella biomassan bör bestämmas (8), (9) och dess kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala organiska kol.

I de flesta fall är jord med dessa egenskaper ett exempel på sämsta möjliga situation – adsorptionen av testämnet är minimal, medan mikrofloran har maximal tillgång till testämnet. Det betyder att det i regel inte behövs test med andra typer av jord. I vissa fall, till exempel där testämnet mestadels förväntas hamna i speciella jordar såsom sura skogsjordar eller om testämnet består av elektrostatiskt laddade kemikalier, kan det vara nödvändigt att använda en extra jordtyp.

▼B

1.6.3 **Insamling och lagring av jordprover**

1.6.3.1 *Insamling*

Man bör ha tillgång till detaljerade upplysningar om historian för den plats där testjorden tas. Upplysningarna bör omfatta exakt läge, växtlighetstäcke, datum för behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med organiska och oorganiska gödselmedel, tillförsel av biologiska material eller oavsiktlig förorening. Den plats som väljs för provtagningen bör vara lämpad för långtidsanvändning. Lämpliga platser är fleråriga ängsmark, åkrar med ettåriga spannmålsgrödor (utom majs) och tättsådda grönbeten. Vid provtagningstidpunkten måste det ha gått minst ett år från en eventuell behandling av provtagningsplatsen med växtskyddsprodukter. Det bör även ha gått minst sex månader från tillförsel av organiska gödselmedel. Användning av mineralgödselmedel är godtagbar endast när detta sker med utgångspunkt från grödans behov. Jordprover får inte tas förrän det har gått minst tre månader från gödslingen. Jord som har behandlats med gödselmedel med kända biocideffekter (till exempel kalciumcyanid) bör undvikas.

Provtagning bör undvikas under eller strax efter långa perioder (längre än 30 dagar) av torka eller vattenmättnad. På plöjd mark ska jordproverna tas på ett djup mellan 0 och 20 cm. På gräsmark (ängar) eller annan mark som plöjs sällan (minst en växtsäsong mellan varje plöjning) kan maximidjupet för provtagningen vara lite mer än 20 cm (till exempel 25 cm).

Jordproverna ska transporteras i behållare, och temperaturbetingelserna bör vara sådana att det inte finns risk för signifikanta förändringar av jordens ursprungliga egenskaper.

1.6.3.2 *Lagring*

De jordprover som används ska helst vara nytagna. Om lagring i laboratoriet inte kan undvikas kan jordproverna hållas i mörker vid 4 ±2 °C under högst tre månader. Det är viktigt att lagringsbetingelserna är aeroba. Om jordprover tas från områden där marken är frusen under minst tre månader per år kan proverna lagras vid - 18 °C till - 22 °C under högst sex månader. Den mikrobiella biomassan hos lagrade jordprover bestäms före varje försök. Biomassans kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala kolhalt (se avsnitt 1.6.2).

1.6.4 **Hantering och beredning av jordprover som testas**

1.6.4.1 *Förinkubation*

För jordprover som har lagrats (se avsnitt 1.6.3.2) rekommenderas en förinkubation under 2–28 dagar. Under förinkubationen bör jordprovet ha samma temperatur och fukthalt som under själva testet (se avsnitten 1.6.4.2 och 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Fysikalisk-kemiska egenskaper*

Stora föremål (till exempel stenar och växtdelar) avlägsnas manuellt ur jorden, som därefter siktas fuktig, utan att torkas alltför mycket, till en partikelstorlek som är högst 2 mm. Jordprovets fukthalt justeras med destillerat eller avjoniserat vatten till ett värde mellan 40 % och 60 % av den maximala vattenkapaciteten.

1.6.4.3 *Förbättring med organiskt substrat*

Jorden ska förbättras med ett lämpligt organiskt substrat, till exempel lusern- och gräsmjöl (huvudbeståndsdel: *Medicago sativa* (blålusern) som har en kol/kväve-kvot mellan 12/1 och 16/1. Den rekommenderade kvoten mellan lusern och jord är 5 g lusern per kilogram jord (torrvikt).

1.6.5 **Beredning av testämnet för applicering i jorden**

Testämnet appliceras i regel med hjälp av en vehikel. Som vehikel kan vatten användas (för vattenlösliga ämnen) eller ett inert fast material såsom fin kvartssand (partikelstorlek: 0,1–0,5 mm). Vätskeformiga vehiklar andra än vatten (till exempel organiska lösningsmedel såsom aceton och kloroform) bör undvikas eftersom de kan skada mikrofloran. Om sand används som vehikel kan den beläggas med testämnet upplöst eller suspenderat i ett lämpligt lösningsmedel. Lösningsmedlet avlägsnas därefter genom avdunstning innan den belagda sanden blandas i jorden. För en optimal fördelning av testämnet i jorden rekommenderas 10 g sand per kilogram jord (torrvikt). Kontrollproverna behandlas med lika stor mängd rent vatten eller ren kvartssand.

Vid testning av flyktiga kemikalier bör förluster under behandlingen minimeras. Likaså bör en homogen fördelning i jorden säkerställas (testämnet bör exempelvis injiceras på flera ställen i jorden).

1.6.6 **Testkoncentrationer**

Vid testning av jordbrukskemikalier bör minst två koncentrationer användas. Den lägre koncentrationen bör minst motsvara den maximimängd som i praktiken förväntas nå jorden, och den högre koncentrationen bör vara en multipel av den lägre koncentrationen. Vid beräkning av koncentrationerna för det testämne som tillförs jorden antas att upptaget är enhetligt ned till jorddjupet 5 cm och att bulkdensiteten är 1,5. Vid testning av jordbrukskemikalier som appliceras direkt i jorden eller kemikalier där den mängd som når jorden kan förutses, rekommenderas dels den maximala PEC-koncentrationen (Predicted Environmental Concentration), dels en femfaldig koncentration av denna. Ämnen som förväntas bli applicerade i jorden flera gånger under en säsong bör testas vid koncentrationer som fås genom att multiplicera PEC-koncentrationen med det maximala antalet förväntade appliceringar. Den högsta testkoncentrationen bör dock inte överskrida mer än tio gånger den maximala koncentrationen vid en enskild applicering. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används en geometrisk serie med minst fem koncentrationer. Testkoncentrationerna bör täcka det område som behövs för att bestämma EC_x-värden.

▼B

1.7 TESTETS UTFÖRANDE

1.7.1 **Exponeringsbetingelser**

1.7.1.1 *Behandlade prover och kontrollprover*

Vid testning av jordbrukskemikalier delas jorden i tre delar med lika vikt. Två delar blandas med vehikel plus produkt och den tredje blandas med ren vehikel (kontrollprov). Minst tre replikat rekommenderas för behandlade respektive obehandlade jordprover. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier delas jorden i sex delar med lika vikt. Fem prover blandas med vehikel plus testämne och det sjätte provet blandas med ren vehikel. Tre replikat rekommenderas för behandlade prover respektive kontrollprov. Det är viktigt att säkerställa en homogen fördelning av testämnet i de behandlade jordproverna. Vid inblandningen bör kompaktering eller klumpbildning av jorden undvikas.

1.7.1.2 *Inkubation av jordprover*

Inkubationen av jordprover kan utföras på två olika sätt. Den kan göras med bulkprover av varje behandlat och obehandlat jordprov eller som en serie individuella och lika stora delprover av varje behandlat och obehandlat jordprov. Vid testning av flyktiga ämnen bör man dock alltid använda en serie individuella delprover. Vid inkubation i form av bulk bereds stora mängder av behandlade och obehandlade jordprover. Under testets gång tas behövligt antal delprover för analys. De mängder som bereds för behandlade och obehandlade jordprover beror på storleken hos de delprover som ingår, antalet replikat som används för analys och det förväntade antalet provtagningsgånger. Jordprover som inkuberas i form av bulk bör blandas grundligt innan delprover tas. När jordprover inkuberas i form av en serie individuella prover, delas varje behandlat och obehandlat prov upp i det antal delprover som behövs och används därefter på planerat sätt. Om det är sannolikt med fler än två provtagningstillfällen bör tillräckligt antal delprover beredas med tanke på alla replikat och alla provtagningstillfällen. Minst tre replikatprover av testjorden bör inkuberas under aeroba betingelser (se avsnitt 1.7.1.1). Alla testbehållare som används bör ha ett tillräckligt utrymme ovanför vätskeytan för att anaeroba betingelser inte ska uppstå. Vid testning av flyktiga ämnen bör testet alltid göras med en serie individuella delprover.

1.7.1.3 *Testbetingelser och testperiodens längd*

Testet genomförs i mörker vid en rumstemperatur på 20 ±2 °C. Under testets gång bör jordprovernas fukthalt hållas vid 40–60 % av jordens maximala vattenkapacitet (se avsnitt 1.6.4.2). Tillåten variation är ±5 %. Destillerat eller avjoniserat vatten kan tillföras vid behov.

Testet bör omfatta en period på minst 28 dagar. Vid testning av jordbrukskemikalier jämförs nitratbildningshastigheten i behandlade prover och kontrollprover. Om avvikelsen är högre än 25 % dag 28, förlängs testet tills skillnaden är högst 25 % eller tills testet har varat 100 dagar, beroende på vilken gräns som nås först. För andra kemikalier än jordbrukskemikalier avslutas testet efter 28 dagar. På dag 28 bestäms nitratmängderna i behandlade jordprover och kontrollprover, och EC_x-värden beräknas.

▼B

1.7.2 **Provtagning och analys av jordprover**

1.7.2.1 *Provtagningsschema*

Vid testning av jordbrukskemikalier analyseras jordproverna med avseende på nitrat, dag 0, 7, 14 och 28. Om testperioden måste förlängas görs tilläggsbestämningarna med 14 dagars intervall efter dag 28.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används minst fem testkoncentrationer, och nitratanalys görs på jordproverna i början (dag 0) och i slutet av exponeringsperioden (dag 28). En delbestämning kan göras till exempel dag 7 om det bedöms vara nödvändigt. De resultat som erhålls dag 28 används för att bestämma EC_x-värdet för kemikalien. Om så önskas kan kontrollprovernas data från dag 0 användas för att rapportera jordens ursprungliga nitrathalt.

1.7.2.2 *Analys av jordprover*

Mängden nitrat som har bildats i vart och ett av de behandlade proverna och kontrollreplikat bestäms för varje provtagningstidpunkt. Nitratet extraheras ur jorden genom att proverna skakas med ett lämpligt lösningsmedel, till exempel 0,1 M kaliumkloridlösning. 5 ml KCl-lösning per gram jord (torrvikt) rekommenderas. För optimal extraktion bör behållarna med jord och extraktionslösning inte vara fyllda mer än till hälften. Blandningarna skakas vid 150 rpm under 60 minuter. Blandningarna centrifugeras eller filtreras och vätskefasens analyseras med avseende på nitrat. Partikelfria vätskeextrakt kan lagras före analys vid - 20 ±5 °C i högst sex månader.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Vid testning av jordbrukskemikalier registreras mängden nitrat som har bildats i varje replikatprov, och medelvärdena för alla replikat ges i tabellform. Kväveomvandlingshastigheterna utvärderas med lämpliga och allmänt accepterade statistiska metoder (till exempel F-test, 5 % signifikansnivå). Mängderna bildat nitrat uttrycks som mg nitrat/kg torrvikt jord/dag. Nitratbildningshastigheten i varje behandlat prov jämförs med hastigheten i kontrollprovet, och den procentuella avvikelsen från kontrollprovet beräknas.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestäms mängden nitrat som har bildats i varje replikat, och en dos-responskurva ritas upp för uppskattningen av EC_x-värden. Mängderna nitrat i de behandlade proverna (mg nitrat/kg torrvikt jord) dag 28 jämförs med mängderna i kontrollproverna. Resultatet används för beräkning av den procentuella hämningen för varje testkoncentration. Dessa procentvärden ritas upp mot koncentrationen, och EC_x-värden beräknas med hjälp av statistiska metoder. Konfidensgränserna ($p = 0,95$) för de beräknade EC_x-värdena bestäms med standardmetoder (10) (11) (12).

Om kvävehalterna i de ämnen som testas är höga kan detta påverka mängden nitrat som bildas under testet. Om sådana ämnen testas vid en hög koncentration (till exempel kemikalier som sannolikt kommer att appliceras vid upprepade tillfällen) måste testet omfatta tillbörliga kontrollprover (jord med testämne men utan växtmjöl). De värden som fås för dessa kontrollprover måste beaktas vid beräkning av EC_x.

▼B

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Om resultaten från test rörande jordbrukskemikalier tyder på att nitratbildningshastigheten vid den lägre behandlingsnivån (den maximala förväntade koncentrationen) avviker från hastigheten vid kontrollnivån med högst 25 % vid alla provtagningstidpunkter efter dag 28, kan man anse att produkten inte har någon långtidseffekt på kväveomvandling i jord. Vid utvärdering av test rörande andra ämnen än jordbrukskemikalier används värden för EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Fullständig identifiering av jorden, inbegripet

— platsens geografiska data (latitud, longitud),

— upplysningar om platsens historia (växtlighetstäcke, behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med gödselmedel, oavsiktlig förorening och dylikt),

— användningsmönster (till exempel jordbruksmark eller skog),

— provtagningsdjup (cm),

— halten sand/slam/lera (% torrvikt),

— pH (i vatten),

— halten organiskt kol (% torrvikt),

— halten kväve (% torrvikt),

— ursprunglig nitrathalt (mg nitrat/kg torrvikt),

— katjonbyteskapacitet (mmol/kg),

— mikrobiell biomassa angiven som procentandel av totalt organiskt kol,

— vilka metoder som har använts för bestämning av varje parameter,

— alla upplysningar som hör samman med insamling och lagring av jordproverna,

— detaljupplysningar om eventuell förinkubation av jorden.

Testämne:

— fysikalisk natur och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska identifieringsdata med angivelse av, där det är relevant, strukturformel, renhetsgrad (för växtskyddsprodukter procentandelen aktivt ämne), kvävehalt.

Substrat:

— källa,

— sammansättning (till exempel lusernmjöl eller lusern- och gräsmjöl),

— halten kol, kväve (% torrvikt),

— siktstorlek (mm).

▼B

Testbetingelser:

— detaljupplysningar om förbättring av jorden med organiskt substrat,

— antalet koncentrationer av testkemikalien och, där det är relevant, motivering för de valda koncentrationerna,

— detaljupplysningar om hur testämnet har tillförts jorden,

— inkubationstemperatur,

— jordens fukthalt vid testets början och under testets gång,

— inkubationsmetod (som bulk eller som en serie individuella delprover),

— antalet replikat,

— provtagningstidpunkter,

— metod för extraktion av nitrat ur jorden.

Resultat:

— analysförfarande och apparatur som har använts för analys av nitrat,

— data i tabellform inbegripet individuella och genomsnittliga värden för nitratbestämningarna,

— variationen mellan replikaten för behandlade prover och kontrollprover,

— redogörelse för justeringar som har gjorts vid beräkningarna (om relevant),

— den procentuella variationen för nitratbildningshastigheterna vid varje provtagningstidpunkt eller, där det är relevant, EC_{50}-värde med 95 procents konfidensgräns, övriga EC_x-värden (till exempel EC_{25} eller EC_{10}) med konfidensintervall och en dos-responskurva,

— statisk behandling av resultaten,

— alla upplysningar och observationer som kan vara till nytta vid tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. EPPO (1994), Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora, EPPO Bulletin, 24: 1–16, 1994.

2. BBA (1990), Effects on the Activity of the Soil Microflora, BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (andra utgåvan, 1990).

3. EPA (1987), Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule, den 28 september 1987.

4. SETAC-Europe (1995), Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, red. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bryssel.

5. ISO/DIS 14238 (1995), Markundersökningar – Bestämning av kvävemineralisering och nitrifiering i jord och kemikaliers inverkan på dessa processer, Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: ”Soil Quality – Biological Methods”.

▼B

6. OECD (1995), Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italien, den 18–20 januari 1995.

7. ISO 10381-6 (1993), Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8. ISO 14240-1 (1997), ”Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 1: Sustratinducerad respirationsmetod”.

9. ISO 14240-2 (1997), Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 2: Fumigering – extraheringsmetod.

10. J. T. Litchfield, och F. Wilcoxon (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments, Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

11. D. J. Finney, (1971), Probit Analysis, tredje utgåvan, Cambridge, London och New York.

12. D. J. Finney, (1978), Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, Förenade kungariket.

▼B

C.22 JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KOL

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 217 (2000).

1.1 INLEDNING

Den testmetod som beskrivs här är en laboratoriemetod för undersökning av de potentiella långtidseffekter som en engångsexponering av jordbruksprodukter, och eventuellt även andra kemikalier, kan ha på jordlevande mikroorganismers omvandling av kol. Testmetoden grundar sig i huvudsak på rekommendationerna från Växtskyddsorganisationen för Europa och Medelhavsområdet (EPPO) (1). Även övriga riktlinjer har beaktats, till exempel riktlinjerna från Biologische Bundesanstalt i Tyskland (2), Environmental Protection Agency i USA (3) och SETAC (4). Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment i Belgirate, Italien, 1995 (5), kom man överens om hur många och vilka typer av jord som ska användas i detta test. Rekommendationerna för insamling, hantering och lagring av jordprover grundar sig på ISO-riktlinjer (6) och rekommendationer från workshopen i Belgirate.

Vid bedömning och utvärdering av olika ämnens toxiska egenskaper kan det vara nödvändigt att bestämma effekterna på den mikrobiella aktiviteten i jorden, till exempel när det behövs upplysningar om de potentiella bieffekter som växtskyddsprodukter kan ha på mikrofloran i jorden, eller när det är sannolikt att de jordlevande mikroorganismerna exponeras för andra kemikalier än växtskyddsprodukter. Testet rörande omvandling av kol görs för att bestämma sådana kemikaliers effekter på mikrofloran i jorden. Vid testning av jordbrukskemikalier (till exempel växtskyddsprodukter, gödselmedel och skogskemikalier) bör testet omfatta både omvandling av kol och omvandling av kväve. I fråga om övriga kemikalier räcker det att testa omvandling av kväve. När sådana kemikalier testas rörande omvandling av kväve och man får EC_{50}-värden som faller inom samma område som gäller för kommersiellt tillgängliga nitrifikationshämmande medel (till exempel nitrapyrin), kan man även göra test rörande omvandling av kol i syfte att få ytterligare upplysningar.

Jord består av levande och icke-levande komponenter som förekommer i komplexa och heterogena sammansättningar. Mikroorganismerna spelar en viktig roll för nedbrytning och omvandling av organiskt material i fertila jordar. Det finns många olika arter och dessa bidrar till de olika aspekter som gäller för jordens fertilitet. Långvariga störningar av dessa biokemikaliska processer kan även störa kretsloppet av näringsämnen, vilket i sin tur kan leda till förändringar av jordens fertilitet. Omvandling av kol och kväve sker i alla fertila jordar. Även om de mikrobsamhällen som utför dessa processer varierar från jord till jord, följer omvandlingen i huvudsak samma mönster.

▼B

Syftet med den testmetod som beskrivs här är att upptäcka skadliga långtidseffekter som ett ämne kan ha på omvandlingen av kol i aerob ytjord. Testet är känsligt för förändringar i storlek och aktivitet hos de mikrobsamhällen som svarar för omvandlingen av kol, eftersom de genom testet utsätts för både kemisk stress och kolsvält. För testet används sandhaltig jord med låg halt organiskt material. Jorden behandlas med testämnet och inkuberas under betingelser som möjliggör snabb mikrobiell metabolism. Under sådana betingelser sker en snabb utarmning av jordens innehåll av lättillgängligt kol. Detta leder till kolbrist som dödar mikrobcellerna och inducerar en viloperiod och/eller sporbildning. Om testet körs under en längre tid än 28 dagar kan summan av dessa reaktioner mätas i de obehandlade jordprovema som en progressiv minskning av metaboliskt aktiv mikrobiell biomassa (7). Om biomassan i en kolstressad jord påverkas av en kemikalie under de betingelser som råder under testet, återställs den eventuellt inte till samma nivå som i ett obehandlat jordprov. Störningar som testämnet har orsakat vid någon försökstidpunkt varar då ofta till slutet av testet.

De test som har använts som grund för denna testmetod är primärt utformade för situationer där den mängd ämne som når jorden kan förutses. Så är fallet till exempel för växtskyddsprodukter där man känner till den mängd som har applicerats på en åker. För jordbrukskemikalier räcker det med att testa två sådana doser som är relevanta med tanke på den förväntade applicerade mängden. Jordbrukskemikalier kan testas med avseende på aktiva ämnen eller produktsammansättningar. Testet är dock inte begränsat till kemikalier med förutsägbara halter i miljön. Genom att ändra både mängderna testämne som tillförs jorden och metoderna för utvärdering av data, kan testet även användas för situationer där mängden kemikalie som förväntas nå jorden inte är känd. På så sätt kan man i fråga om andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestämma effekterna av en serie koncentrationer på omvandlingen av kol. Erhållna testdata används för att rita upp en dos-responskurva och beräkna EC_x-värden, där x är den procentuella effekten.

1.2 DEFINITIONER

Omvandling av kol: Nedbrytning av organiskt material genom inverkan av mikroorganismer under bildning av slutprodukten koldioxid.

EC_X (effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kol till koldioxid hämmas till x procent.

EC_{50} (median effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kol till koldioxid hämmas till 50 procent.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

▼B

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Siktad jord behandlas med testämnet eller lämnas obehandlad (kontrollprov). Vid testning av jordbrukskemikalier rekommenderas minst två testkoncentrationer, och dessa bör väljas med beaktande av den högsta koncentration som kan förväntas nå jorden. Efter inkubation under 0, 7, 14 och 28 dagar blandas de behandlade och obehandlade proverna med glukos, och den glukosinducerade respirationen i varje prov mäts under 12 på varandra följande timmar. Respirationen uttrycks som mängden frigjord koldioxid (mg koldioxid/kg torrvikt jord/h) eller mängden förbrukat syre (mg syre/kg jord/h). Den genomsnittliga respirationen i de behandlade jordproverna jämförs med situationen i kontrollproverna, och den procentuella avvikelsen från kontrollprovet beräknas. Alla test bör omfatta minst 28 dagar. Om skillnaderna mellan behandlade och obehandlade prover är minst 25 % dag 28 görs fortsatta bestämningar med 14 dagars intervall under en period som maximalt sträcker sig till dag 100. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier appliceras en serie koncentrationer av testämnet i jordprover, och efter 28 dagar bestäms den glukosinducerade respirationen (de genomsnittliga mängderna bildad koldioxid eller förbrukat syre). Resultaten från test med en serie koncentrationer analyseras med hjälp av en regressionsmodell och relevanta EC_x-värden beräknas (till exempel EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}). Se definitionerna.

1.5 TESTETS GILTIGHET

Utvärderingen av testresultat rörande jordbrukskemikalier baserar sig på relativt små skillnader (till exempel medelvärde ±25 %) mellan frigjord koldioxid eller förbrukat syre i (eller av) obehandlade och behandlade jordprover. Därför kan stora variationer i de obehandlade proverna leda till falska resultat. Variationen mellan obehandlade replikatprover bör därför vara mindre än ± 15 %.

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Utrustning**

Provbehållarna bör vara tillverkade av kemiskt inert material. Deras volym bör anpassas till det förfarande som används för inkubation av jorden, till exempel inkubation som bulk eller som en serie individuella jordprover (se avsnitt 1.7.1.2). Det är viktigt att minimera vattenförlusterna och sörja för gasväxling under testets förlopp (provbehållarna kan till exempel täckas med perforerad polyetylenfilm). Vid testning av flyktiga ämnen bör förseglingsbara och gastäta behållare användas. Behållarnas storlek bör anpassas så att jordprovet upptar cirka en fjärdedel av behållarens volym.

För bestämning av glukosinducerad respiration krävs inkubationssystem och instrument för mätning av producerad koldioxid eller förbrukat syre. Exempel på sådana system och instruments finns i litteraturen (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Valet av jord och antal jordtyper**

Endast en typ av jord används. Följande rekommendationer gäller för jorden:

— Sandhalt: minst 50 % och högst 75 %.

▼B

— pH: 5,5–7,5.

— Halten organiskt kol: 0,5–1,5 %.

— Den mikrobiella biomassan bör bestämmas (12) (13) och dess kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala organiska kol.

I de flesta fall utgör jord med dessa egenskaper ett exempel på sämsta möjliga situation – adsorptionen av testämnet är minimal, medan mikrofloran har maximal tillgång till testämnet. Det betyder att det i regel inte behövs test med andra typer av jord. I vissa fall, till exempel där testämnet mestadels förväntas hamna i särskilda jordar såsom sura skogsjordar eller om testämnet består av elektrostatiskt laddade kemikalier, kan det vara nödvändigt att använda en extra jordtyp.

1.6.3 **Insamling och lagring av jordprover**

1.6.3.1 *Insamling*

Man bör ha tillgång till detaljerade upplysningar om historian för den plats där testjorden tas. Upplysningarna bör omfatta exakt läge, växtlighetstäcke, datum för behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med organiska och oorganiska gödselmedel, tillförsel av biologiska material eller oavsiktlig förorening. Den plats som väljs för provtagningen bör vara lämpad för långtidsanvändning. Lämpliga platser är flerårig ängsmark, åkrar med ettåriga spannmålsgrödor (utom majs) och tättsådda grönbeten. Vid provtagningstidpunkten måste det ha gått minst ett år från en eventuell behandling av provtagningsplatsen med växtskyddsprodukter. Det bör även ha gått minst sex månader från tillförsel av organiska gödselmedel. Användning av mineralgödselmedel är godtagbar endast när detta sker med utgångspunkt från grödans behov. Jordprover får inte tas förrän det har gått minst tre månader från gödslingen. Jord som har behandlats med gödselmedel med kända biocideffekter (till exempel kalciumcyanid) bör undvikas.

Provtagning bör undvikas under eller strax efter långa perioder (längre än 30 dagar) av torka eller vattenmättnad. På plöjd mark ska jordproverna tas på ett djup mellan 0 och 20 cm. På gräsmark (ängar) eller annan mark som plöjs sällan (minst en växtsäsong mellan varje plöjning) kan maximidjupet för provtagningen vara lite mer än 20 cm (till exempel 25 cm). Jordproverna ska transporteras i behållare, och temperaturbetingelser bör vara sådana att det inte finns risk för signifikanta förändringar av jordens ursprungliga egenskaper.

1.6.3.2 *Lagring*

De jordprover som används ska helst vara nytagna. Om lagring i laboratoriet inte kan undvikas kan jordproverna hållas i mörker vid 4 ± 2 °C under högst tre månader. Det är viktigt att lagringsbetingelserna är aeroba. Om jordprover tas från områden där marken är frusen under minst tre månader per år kan proverna lagras under högst sex månader vid –18 °C. Den mikrobiella biomassan hos lagrade jordprover bestäms före varje försök. Biomassans kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala kolhalt (se avsnitt 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Hantering och beredning av jordprover som testas**

1.6.4.1 *Förinkubation*

För jordprover som har lagrats (se avsnitten 1.6.4.2 och 1.7.1.3) rekommenderas en förinkubation under 2–28 dagar. Under förinkubationen bör jordprovet ha samma temperatur och fukthalt som under själva testet (se avsnitten 1.6.4.2 och 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Fysikalisk-kemiska egenskaper*

Stora föremål (till exempel stenar och växtdelar) avlägsnas manuellt ur jorden, som därefter siktas fuktig, utan att torkas alltför mycket, till en partikelstorlek som är högst 2 mm. Jordprovets fukthalt justeras med destillerat eller avjoniserat vatten till ett värde mellan 40 % och 60 % av den maximala vattenkapaciteten.

1.6.5 **Beredning av testämnet för applicering i jorden**

Testämnet appliceras i regel med hjälp av en vehikel. Som vehikel kan vatten användas (för vattenlösliga ämnen) eller ett inert fast material såsom fin kvartssand (partikelstorlek: 0,1–0,5 mm). Vätskeformiga vehiklar andra än vatten (till exempel organiska lösningsmedel såsom aceton och kloroform) bör undvikas eftersom de kan skada mikrofloran. Om sand används som vehikel kan den beläggas med testämnet upplöst eller suspenderat i ett lämpligt lösningsmedel. Lösningsmedlet avlägsnas därefter genom avdunstning innan den belagda sanden blandas i jorden. För en optimal fördelning av testämnet i jorden rekommenderas 10 g sand per kilogram jord (torrvikt). Kontrollproverna behandlas med lika stor mängd rent vatten eller ren kvartssand.

Vid testning av flyktiga kemikalier bör förluster under behandlingen minimeras. Likaså bör en homogen fördelning i jorden säkerställas (testämnet bör exempelvis injiceras på flera ställen i jorden).

1.6.6 **Testkoncentrationer**

Om testet gäller växtskyddsprodukter eller andra kemikalier med förutsägbara koncentrationer i miljön, bör minst två koncentrationer användas. Den lägre koncentrationen bör minst motsvara den maximimängd som i praktiken förväntas nå jorden, och den högre koncentrationen bör vara en multipel av den lägre koncentrationen. Vid beräkning av koncentrationerna för det testämne som tillförs jorden antas att upptaget är enhetligt ned till jorddjupet 5 cm och att bulkdensiteten är 1,5. Vid testning av jordbrukskemikalier som appliceras direkt på jorden eller kemikalier där den mängd som når jorden kan förutses, rekommenderas PEC-koncentrationen (Predicted Environmental Concentration) och en femfaldig koncentration av denna. Ämnen som förväntas bli applicerade i jorden flera gånger under en säsong bör testas vid koncentrationer som fås genom att multiplicera PEC-koncentrationen med det maximala antalet förväntade appliceringar. Den högsta testkoncentrationen bör dock inte överskrida mer än tiofaldigt den maximala koncentrationen vid en enskild applicering.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används en geometrisk serie med minst fem koncentrationer. Testkoncentrationerna bör täcka det område som behövs för att bestämma EC_x-värden.

▼B

1.7 TESTETS UTFÖRANDE

1.7.1 **Exponeringsbetingelser**

1.7.1.1 *Behandlade prover och kontrollprover*

Vid testning av jordbrukskemikalier delas jorden i tre delar med lika vikt. Två delar blandas med vehikel plus produkt och den tredje blandas med ren vehikel (kontrollprov). Minst tre replikat rekommenderas för behandlade respektive obehandlade jordprover. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier delas jorden i sex delar med lika vikt. Fem prover blandas med vehikel plus testämne och det sjätte provet blandas med ren vehikel. Tre replikat rekommenderas för behandlade prover respektive kontrollprov. Det är viktigt att säkerställa en homogen fördelning av testämnet i de behandlade jordproverna. Vid inblandningen bör kompaktering eller klumpbildning av jorden undvikas.

1.7.1.2 *Inkubation av jordprover*

Inkubationen av jordprover kan utföras på två olika sätt. Den kan göras med bulkprover av varje behandlat och obehandlat jordprov eller som en serie individuella och lika stora delprover av varje behandlat och obehandlat jordprov. Vid testning av flyktiga ämnen bör man dock alltid använda en serie individuella delprover. Vid inkubation i form av bulk bereds stora mängder av behandlade och obehandlade jordprover. Under testets gång tas behövligt antal delprover för analys. De mängder som bereds för behandlade och obehandlade jordprover beror på storleken hos de delprover som ingår, antalet replikat som används för analys och det förväntade antalet provtagningstillfällen. Jordprover som inkuberas i form av bulk bör blandas grundligt innan delprover tas. När jordprover inkuberas i form av en serie individuella prover, delas varje behandlat och obehandlat prov upp i behövligt antal delprover som därefter används på planerat sätt. Om det är sannolikt med fler än två provtagningstillfällen bör tillräckligt antal delprover beredas med tanke på alla replikat och alla provtagningsgånger. Minst tre replikatprover av testjorden bör inkuberas under aeroba betingelser (se avsnitt 1.7.1.1). Alla testbehållare som används bör ha ett tillräckligt utrymme ovanför vätskeytan för att det inte ska uppstå anaeroba betingelser. Vid testning av flyktiga ämnen bör testet alltid göras med en serie individuella delprover.

1.7.1.3 *Testbetingelser och testperiodens längd*

Testet genomförs i mörker vid en rumstemperatur på 20 ± 2 °C. Under testets gång bör jordprovernas fukthalt upprätthållas vid 40–60 % av jordens maximala vattenkapacitet (se avsnitt 1.6.4.2). Tillåten variation är ± 5 %. Destillerat eller avjoniserat vatten kan tillföras vid behov.

Testet bör omfatta en period på minst 28 dagar. Vid testning av jordbrukskemikalier jämförs mängderna koldioxid som frigörs eller syre som förbrukas i behandlade och obehandlade prover. Om avvikelsen är högre än 25 % dag 28, förlängs testet tills skillnaden är högst 25 % eller tills testet har varat 100 dagar, beroende på vilken gräns som nås först. För andra kemikalier än jordbrukskemikalier avslutas testet efter 28 dagar. Dag 28 bestäms mängderna frigjord koldioxid eller förbrukat syre i behandlade jordprover och kontrollprover och EC_X-värden beräknas.

▼B

1.7.2 **Provtagning och analys av jordprover**

1.7.2.1 *Provtagningsschema*

Vid testning av jordbrukskemikalier analyseras jordproverna med avseende på glukosinducerad respiration dag 0, 7, 14 och 28. Om testperioden måste förlängas görs tilläggsbestämningarna med 14 dagars intervall efter dag 28.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används minst fem testkoncentrationer, och jordproverna analyseras med avseende på glukosinducerad respiration i början (dag 0) och i slutet av exponeringsperioden (dag 28). En delbestämning kan göras till exempel dag 7 om det bedöms vara nödvändigt. De resultat som erhålls dag 28 används för att bestämma EC_x-värdet för kemikalien. Enligt val kan data rörande kontrollproverna från dag 0 användas för att uppskatta de ursprungliga mängderna metaboliskt aktiv mikrobiell massa i jorden (12).

1.7.2.2 *Bestämning av glukosinducerad respiration*

Den glukosinducerade respirationen bestäms för varje behandlat och obehandlat replikat och för varje provtagningstidpunkt. Jordproverna blandas med en glukosmängd som är tillräcklig för att framkalla en omedelbar och maximal respirationsrespons. Den mängd glukos som behövs för att framkalla en maximal respirationsrepons i en given jordtyp kan bestämmas genom ett preliminärt test som utförs med en serie glukoskoncentrationer (14). För sandhaltig jord med 0,5–1,5 % organiskt kol är det i regel tillräckligt med 2–4 g glukos per kg jord (torrvikt). Glukosen kan malas till pulver med ren kvartssand (10 g sand/kg torrvikt jord) och blandas sedan homogent in i jorden.

Jordproverna med glukos inkuberas vid 20 ± 2 ºC i ett system som är lämpligt för bestämning av respirationen. Bestämningen kan göras kontinuerligt, varje timme eller var annan timme (se avsnitt 1.6.1). Den koldioxid som frigörs eller det syre som förbrukas mäts under 12 på varandra följande timmar och mätningarna bör inledas så snart som möjligt (1–2 timmar) efter glukostillförseln. De totala mängderna frigjord koldioxid eller förbrukat syre under de 12 timmarna uppmäts och den genomsnittliga respirationen bestäms.

2 **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Vid testning av jordbrukskemikalier registreras mängden frigjord koldioxid eller förbrukat syre i varje replikatprov, och medelvärdena för alla replikat ges i tabellform. De värden som erhålls utvärderas med lämpliga och allmänt godtagna statistiska metoder (till exempel F-test, 5 % signifikansnivå). De värden som erhålls för den glukosinducerade respirationen uttrycks som mg koldioxid/kg torrvikt jord/h eller mg syre/torrvikt jord/h. Den genomsnittliga koldioxidbildningen eller genomsnittliga syreförbrukningen jämförs med situationen i kontrollprovet och den procentuella avvikelsen från kontrollprovet beräknas.

▼B

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestäms mängderna frigjord koldioxid eller förbrukat syre i varje replikat, och en dos-responskurva ritas upp för uppskattningen av EC_x-värden. De värden som efter 28 dagar registreras för den glukosinducerade respirationen (mg koldioxid/kg torrvikt jord/h eller mg syre/torrvikt jord/h) i de behandlade proverna jämförs med motsvarande värden för kontrollprovet. Resultatet används för beräkning av den procentuella hämningen för varje testkoncentration. Dessa procentvärden ritas upp mot koncentrationen, och EC_x-värden beräknas därefter med hjälp av statistiska metoder. Konfidensgränserna (p = 0,95) för de beräknade EC_X-värdena bestäms med standardmetoder (15), (16), (17).

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Om utvärderingen av testresultaten rörande jordbrukskemikalier visar att respirationen vid den lägre behandlingsnivån (den maximala förväntade koncentrationen) avviker från värdet vid kontrollnivån med högst 25 % vid alla provtagningstidpunkter efter dag 28, kan man anse att produkten inte har någon långtidseffekt på omvandlingen av kol i jord. Vid utvärdering av test rörande andra ämnen än jordbrukskemikalier används värden för EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Fullständig identifiering av jorden, inbegripet

— platsens geografiska data (latitud, longitud),

— upplysningar om platsens historia (växtlighetstäcke, behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med gödselmedel, oavsiktlig förorening och dylikt),

— användningsmönster (till exempel jordbruksmark eller skog),

— provtagningsdjup (cm),

— halten sand/slam/lera (% torrvikt),

— pH (i vatten),

— halten organiskt kol (% torrvikt),

— halten kväve (% torrvikt),

— katjonbyteskapacitet (mmol/kg),

— mikrobiell biomassa angiven som procentandel av totalt organiskt kol,

— vilka metoder som har använts för bestämning av varje parameter,

— alla upplysningar som hör samman med insamling och lagring av jordproverna,

— detaljupplysningar om eventuell förinkubation av jorden.

▼B

Testämne:

— fysikalisk natur och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska identifieringsdata med angivelse av, där det är relevant, strukturformel, renhetsgrad (för växtskyddsprodukter procentandelen aktivt ämne), kvävehalt.

Testbetingelser:

— detaljupplysningar om förbättring av jorden med organiskt substrat,

— antalet koncentrationer av testkemikalien och, där det är relevant, motivering för de valda koncentrationerna,

— detaljupplysningar om hur testämnet har tillförts jorden,

— inkubationstemperatur,

— jordens fukthalt vid testets början och under testets gång,

— inkubationsmetod (som bulk eller som en serie individuella delprover),

— antalet replikat,

— provtagningstidpunkter.

Resultat:

— metod och utrustning som har använts för respirationsbestämningar,

— data i tabellform, inbegripet enskilda och genomsnittliga värden för mängderna koldioxid eller syre,

— variationen mellan replikaten i behandlade prover och kontrollprover,

— redogörelse för justeringar som har gjorts vid beräkningarna (om relevant),

— den procentuella variationen för glukosinducerad respiration vid varje provtagningstidpunkt eller, där det är relevant, EC_{50}-värde med 95 procents konfidensgräns, övriga EC_x-värden (till exempel EC_{25} eller EC_{10}) med konfidensintervall och en dos-responskurva,

— statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall,

— alla upplysningar och observationer som kan vara till nytta vid tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. EPPO (1994), ”Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora”, *EPPO Bulletin, 24,* 1–16, 1994.

2. BBA (1990), ”Effects on the Activity of the Soil Microflora”, *BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products,* VI, 1-1 (andra utgåvan, 1990).

3. EPA (1987), ”Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule”, den 28 september 1987.

▼B

4. SETAC-Europe (1995), ”Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides”, red. M. R. Lynch, *Pub. SETAC-Europe,* Bryssel.

5. OECD (1995), ”Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments”, Belgirate, Italien, den 18–20 januari 1995.

6. ISO 10381-6 (1993), ”Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory”.

7. Anderson, J.P.E. (1987), ”Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments”, i ”Pesticide Effects on Soil Microflora”, red. L. Somerville och M.P. Greaves, kap 3, 45–60.

8. Anderson, J.P.E. (1982), ”Soil Respiration”, i ”Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties”, *Agronomy Monograph, 9,* red. A. L. Page, R. H. Miller och D. R. Keeney. 41, 831–871.

9. ISO 11266-1 (1993), ”Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions”.

10. ISO 14239 (1997E), ”Markundersökningar – Inkubationssystem för bestämning av mineraliseringen av organiska kemikalier i jord under aeroba förhållanden”.

11. O. Heinemeyer, H. Insam, E.A. Kaiser, och G. Walenzik (1989), ”Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses”, *Plant and Soil,* 116, 77–81.

12. ISO 14240-1 (1997), ”Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 1: Sustratinducerad respirationsmetod”.

13. ISO 14240-2 (1997), ”Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 2: Fumigering – extraheringsmetod”.

14. H. P. Malkomes, (1986), ”Einfluβ von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide”, *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig,* 38, 113–120.

15. J.T. Litchfield, och F. Wilcoxon (1949), ”A simplified method of evaluating dose-effect – experiments”, *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.,* 96, 99–113.

(16) D.J. Finney, (1971), ”Probit Analysis”, tredje utgåvan, Cambridge, London och New York.

(17) D.J. Finney (1978), ”Statistical Methods in biological Assay”, Griffin, Weycombe, Förenade kungariket.

▼B

C.23 AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I JORD

1. METOD

Denna testmetod är i stort sett identisk med OECD TG 307 (2002).

1.1 INLEDNING

Testmetoden baserar sig på befintliga riktlinjer (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9). Den testmetod som beskrivs här är avsedd för utvärdering av aerob och anaerob omvandling av kemikalier i jord. Bestämningar görs av i) testämnets omvandlingshastighet och ii) karaktären och hastigheterna för bildning och minskning av de omvandlingsprodukter som växter och jordlevande organismer kan exponeras för. Sådana undersökningar behövs för kemikalier som appliceras direkt i jorden eller sannolikt kommer att nå jorden. Resultaten kan också användas för att utarbeta provtagnings- och analysprotokoll för relaterade fältstudier.

För bedömning av omvandlingsmönstren är det i regel tillräckligt med aeroba och anaeroba undersökningar av endast en jordtyp (8), (10), (11). Omvandlingshastigheterna bör bestämmas i minst tre ytterligare jordtyper (8), (10).

Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment som hölls i Belgirate, Italien, 1995 (10), kom man särskilt överens om hur många och vilka typer av jord som ska användas i detta test. De jordtyper som testas bör vara representativa för de miljöbetingelser där användning eller utsläpp förväntas ske. Exempelvis kemikalier som sannolikt kommer att släppas ut i subtropiska till tropiska klimat bör testas med jordmåner i klasserna Ferrasoler eller Nitosoler (FAO-systemet). Workshopen i Belgirate gav också rekommendationer rörande insamling, hantering och lagring av jordprover, baserade på ISO-riktlinjer (15). Även användningen av jord för risodling behandlas i denna metod.

1.2 DEFINITIONER

Testämne: Alla ämnen, oavsett det gäller den ursprungliga föroreningen eller relevanta omvandlingsprodukter.

Omvandlingsprodukter: Alla ämnen som uppstår till följd av biotiska eller abiotiska omvandlingsreaktioner av testämnet, inbegripet CO_2 och produkter i bundna rester.

Bundna rester: Dessa är sådana föreningar i jorden, i växter eller i djur som blir kvar i matrisen i form av ursprungligt ämne eller dess metaboliter eller omvandlingsprodukter efter extraktion. Extraktionsmetoden får inte i avsevärd grad leda till ändringar i själva föreningarna eller matrisens struktur. Bindningens karaktär kan delvis klarläggas genom matrisstörande extraktionsmetoder och sofistikerade analysmetoder. Hittills har man på detta sätt kunnat identifiera till exempel kovalenta bindningar, jonbindningar och sorptiva bindningar samt inneslutning. Generellt sett innebär bildningen av bundna rester att biotillgängligheten blir signifikant mindre (12) (modifierat ur IUPAC 1984 (13)).

Aerob omvandling: Reaktioner som sker i närvaro av molekylärt syre (14).

▼B

Anaerob omvandling: Reaktioner som sker utan närvaro av molekylärt syre (14).

Jord: En blandning av mineraliska och organisk-kemiska beståndsdelar. De senare består av föreningar med hög kol- och kvävehalt samt hög molekylvikt. Dessa föreningar påverkas av små organismer (nästintill mikroorganismer). Jord kan hanteras i två olika tillstånd:

a) Ostörd, såsom den har uppstått under tidens gång i karakteristiska skikt av ett flertal olika jordtyper.

b) Störd, vilket normalt gäller för odlad mark eller fall där jordprover tas genom grävning och därefter undersöks med denna testmetod (14).

Mineralisering: Det fullständiga sönderfallet av organiska föreningar till CO_2 och H_2O under aeroba betingelser samt till CH_4, CO_2 och H_2O under anaeroba betingelser. Med mineralisering avses här ett omfattande sönderfall som sker när en ^{14}C-märkt förening används och en märkt kolatom oxideras under frigörande av motsvarande mängd $^{14}CO_2$ (14).

Halveringstid: Betecknas med $t_{0,5}$ – den tid det tar för ett testämne att omvandlas till 50 % när omvandlingen kan beskrivas med kinetik av första ordningen. Denna tid är oberoende av koncentrationen.

DT_{50} (tid för försvinnande 50): Den tid inom vilken testämnets koncentration går ned med 50 %. Denna tid är inte samma som halveringstiden $t_{0,5}$ i fall där omvandlingen inte följer kinetik av första ordningen.

DT_{75} (tid för försvinnande 75): Den tid inom vilken testämnets koncentration går ned med 75 %.

DT_{90} (tid för försvinnande 90): Den tid inom vilken testämnets koncentration går ned med 90 %.

1.3 REFERENSÄMNEN

Referensämnen bör användas för karakterisering och/eller identifiering av omvandlingsprodukterna genom spektroskopiska och kromatografiska metoder.

1.4 TESTETS TILLÄMPBARHET

Metoden kan tillämpas på alla kemiska ämnen (omärkta eller radioaktivt märkta) för vilka det finns tillgång till en analysmetod som är tillräckligt exakt och känslig. Metoden kan tillämpas på föreningar som är i viss mån flyktiga, ickeflyktiga, vattenlösliga eller vattenolösliga. Testet bör inte tillämpas på kemikalier som är mycket flyktiga från jord (till exempel desinfektionsmedel, organiska lösningsmedel) och som därför inte hålls kvar i jorden under de försöksbetingelser som gäller för detta test.

▼B

1.5 UPPLYSNINGAR OM TESTÄMNET

Omärkta eller märkta testämnen kan användas för bestämning av omvandlingshastigheten. Märkt material behövs för undersökning av omvandlingsmönstret och för bestämning av en massbalans. C-märkning rekommenderas, även om andra isotoper, såsom ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H och ^{32}P kan användas. Märkningen bör om möjligt finnas i molekylens mest stabila del(ar) ([1]). Testämnets renhetsgrad bör vara minst 95 %.

Innan test rörande aerob och anaerob omvandling i jord utförs bör följande upplysningar om testämnet finnas tillgängliga:

a) löslighet i vatten (metod A.6),

b) löslighet i organiska lösningsmedel,

c) ångtryck (metod A.4) och Henrys lag-konstant,

d) fördelningskoefficient n-oktanol/vatten (metod A.8),

e) kemisk stabilitet i mörker (hydrolys) (metod C.7),

f) pK_a om en molekyl är benägen till protonering eller deprotonering (OECD-riktlinje 112) (16).

Det kan även vara till nytta att känna till exempelvis testämnets toxicitet för jordlevande mikroorganismer (testmetoderna C.21 och C.22)(16).

Det bör finnas tillgång till analysmetoder (inbegripet extraktions- och reningsmetoder) för kvantifiering och identifiering av testämnet och dess omvandlingsprodukter.

1.6 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Jordproverna behandlas med testämnet och inkuberas i mörker i flaskor av biometertyp eller i genomflödessystem under kontrollerade laboratoriebetingelser (konstant temperatur och jordfuktighet). Efter lämpliga tidsintervall extraheras jordproverna och analyseras med avseende på det ursprungliga ämnet och dess omvandlingsprodukter. Flyktiga produkter samlas upp med hjälp av lämplig absorptionsutrustning. Med hjälp av C-märkt material kan de olika mineraliseringshastigheterna av testämnet bestämmas genom att den $^{14}CO_2$ som bildas fångas upp. Därefter kan en massbalans som inbegriper bildningen av jordbundna rester upprättas.

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Extraktion och analys av minst dubbla jordprover omedelbart efter tillförsel av testämnet ger en första indikation på analysmetodens repeterbarhet och enhetligheten hos det förfarande som har använts för tillförsel av testämnet. Utbyten för senare stadier av försöken erhålls genom massbalanserna. Utbytena bör vara 90–110 % för radioaktivt märkta kemikalier (8) och 70–110 för omärkta kemikalier (3).

([1]) Om testämnet till exempel innehåller en ring måste märkningen finnas på denna ring. Om testämnet innehåller två eller flera ringar kan det vara nödvändigt med separata undersökningar för utvärdering av vad som händer med de enskilda ringarna och för att få lämpliga upplysningar om bildningen av omvandlingsprodukter.

▼B

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Analysmetodens repeterbarhet (med undantag av den initiala extraktionseffektiviteten) när det gäller att kvantifiera testämnet och omvandlingsprodukterna kan kontrolleras genom en duplikatanalys av samma extrakt ur jorden, som bör ha inkuberats tillräckligt länge för att omvandlingsprodukter ska ha bildats.

Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testämnet och för omvandlingsprodukterna bör vara minst 0,01 mg· kg^{-1} jord (som testämne) eller 1 % av den tillförda dosen, beroende på vilket värde som är lägre. Likaså bör kvantifieringsgränsen (LOQ) anges.

1.7.3 **Noggrannheten hos omvandlingsdata**

Genom regressionsanalys av testämneskoncentrationerna som en funktion av tiden fås ungefärliga upplysningar om omvandlingskurvans tillförlitlighet och en möjlighet att beräkna konfidensgränserna för halveringstiderna (när det gäller kinetik av pseudoförsta ordningen) eller DT_{50}-värden och, om tillämpligt, värden för DT_{75} och DT_{90}.

1.8 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.8.1 **Utrustning och kemiska reagenser**

Inkubationssystemet kan vara ett statiskt slutet system eller ett lämpligt genomflödessystem (7), (17). Exempel på ett lämplig genomflödessystem för inkubation av jord och på flaskor av biometertyp finns i figur 1 respektive figur 2. Båda typerna av inkubationssystem har sina fördelar och begränsningar (7), (17).

Dessutom behövs normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

— Instrument för analysmetoder såsom gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC), tunnskiktskromatografi (TLC), inbegripet tillbörliga detektionssystem för analys av radioaktivt märkta eller omärkta ämnen eller metod med invers isotoputspädning.

— Instrument för identifiering (till exempel genom masspektrometri, GC-masspektrometri, HPLC-masspektrometri, kärnmagnetisk resonans (NMR)).

— Vätskeskintillationsräknare.

— Oxidationsmedel för förbränning av radioaktivt material.

— Centrifug.

— Extraktionsapparatur (till exempel centrifugrör för kallextraktion och Soxhlet-apparatur för kontinuerlig extration med återflöde).

— Utrustning för koncentrering av lösningar och extrakt (till exempel roterande evaporator).

— Vattenbad.

— Mekanisk blandare (till exempel knådningsmaskin eller roterande mixer).

▼B

Kemiska reagenser, till exempel följande:

— NaOH, p.a. kvalitet, 2 mol dm^{-3} eller annan lämplig bas (till exempel KOH, etanolamin).

— H_2SO_4, p.a kvalitet, 0,05 mol dm^{-3}.

— Etylenglykol, p.a. kvalitet.

— Fasta absorptionsmaterial såsom kalk- och polyuretanproppar.

— Organiska lösningsmedel (p.a. kvalitet), exempelvis aceton eller metanol.

— Skintillationsvätska.

1.8.2 **Tillförsel av testämnet**

Innan testämnet tillförs och fördelas i jorden kan det lösas upp i vatten (avjoniserat eller destillerat) eller vid behov i minsta möjliga mängd aceton eller något annat organiskt lösningsmedel (6) i vilket testämnet är tillräckligt lösligt och stabilt. Den mängd lösningsmedel som används får dock inte ha betydande inverkan på jordens mikrobiella aktivitet (se avsnitten 1.5 samt 1.9.2 och 1.9.3). Lösningsmedel som hämmar den mikrobiella aktiviteten, såsom kloroform, diklormetan och andra halogenerade lösningsmedel, bör undvikas.

Testämnet kan också tillföras i fast form, till exempel inblandat i kvartssand (6) eller i ett litet delprov av testjorden som har lufttorkats och steriliserats. Om testämnet tillförs med hjälp av lösningsmedel måste detta få avdunsta innan det spikade delprovet tillförs det ursprungliga icke-sterila jordprovet.

För allmänna kemikalier, vars som huvudsakligen når jorden genom applicering av avloppsslam eller jordbruksprodukter, bör testämnet först tillföras slammet som därefter blandas i jordprovet (se avsnitten 1.9.2 och 1.9.3).

Användningen av formulerade produkter rekommenderas i regel inte. För svårlösliga testämnen kan dock användningen av formulerat material vara ett lämpligt alternativ.

1.8.3 **Jord**

1.8.3.1 *Valet av jord*

För bestämning av omvandlingsmönstret används en representativ jordtyp – sandy loam, silty loam, loam eller loamy sand (enligt FAO- och USDA-klassificeringen (18)), pH 5,5–8,0, halten organiskt kol 0,5–2,5 % och en mikrobiell biomassa som utgör minst 1 % av totala mängden organiskt kol (10).

Vid undersökning av omvandlingshastigheter behövs minst tre ytterligare jordtyper som representerar ett urval relevanta jordtyper. Jordtyperna bör vara sinsemellan olika i fråga om halten organiskt kol, pH, lerhalt och mikrobiell biomassa (10).

▼B

All jord bör karakteriseras minst med avseende på textur (% sand, % silt, % clay) (enligt FAO- och USDA-klassificering (18)), pH, katjonbyteskapacitet, organiskt kol, bulktäthet, vattenretentionsegenskaper ([1]) och mikrobiell biomassa (endast vid aeroba undersökningar). Tilläggsupplysningar om jordens egenskaper kan vara till nytta vid tolkning av resultaten. Jordens egenskaper kan bestämmas med de metoder som rekommenderas i hänvisningarna (19), (20), (21), (22), (23). Den mikrobiella biomassan bör bestämmas med SIR-metoden (substratinducerad respiration) (25), (26) eller alternativa metoder (20).

1.8.3.2 *Insamling, hantering och lagring av jord*

Det bör finnas tillgång till detaljerade upplysningar om historian för den plats där testjorden tas. Upplysningarna bör omfatta exakt läge, växtlighetstäcke, behandlingar med kemikalier, behandlingar med organiska och oorganiska gödselmedel, tillförsel av biologiska material eller förorening. Om jorden har behandlats med testämnet eller ett strukturellt analogt ämne inom de fyra senaste åren bör den inte användas för undersökningar rörande omvandling (10), (15).

Jordproverna bör vara nytagna (från A-horisonten eller det översta 20 cm-skiktet) och ha en lämplig vattenhalt med tanke på siktning. För all annan jord än den från risfält bör provtagning undvikas under eller omedelbart efter långa perioder (mer än 30 dagar) av torka, frost eller översvämning (14). Proverna bör transporteras på sådant sätt att förändringar i vattenhalt minimeras. Under transporten bör proverna hållas i mörker med så fri tillgång till luft som det är möjligt. För detta ändamål är det i regel tillräckligt med en löst sluten polyetylenpåse.

Jordproverna bör bearbetas så snart som möjligt efter provtagningen. Först avlägsnas vegetation, större fauna och stenar och därefter får jorden passera ett 2 mm-sikt som fångar upp små stenar, fauna och växtrester. Omfattande torkning eller krossning av jorden före siktningen bör undvikas (15).

Om provtagningen försvåras under vintern (jorden är frusen eller snötäckt) kan proverna tas från en sats jord som har lagrats i växthus under ett växttäcke (till exempel gräs eller gräs–klöverblandning). Alla prover som undersöks bör helst vara nytagna. Om lagring av bearbetade jordprover inte kan undvikas före undersökningen måste betingelserna vara lämpliga och lagringstiden begränsad (4 ± 2 °C och högst tre månader) för att den mikrobiella aktiviteten ska upprätthållas ([2]). Närmare anvisningar om insamling, hantering och lagring av jordprover avsedda för undersökningar av bioomvandling finns i hänvisningarna (8), (10), (15), (26), (27).

([1]) Vattenretentionsegenskaperna hos jord kan mätas som fältkapacitet, vattenkapacitet eller tension (pF). Begreppsförklaringar finns i bilaga 1. I testrapporten bör anges om vattenretentionsegenskaperna och bulktätheten har bestämts i ostörda fältprover eller i störda (bearbetade) prover).

([2]) Färska forskningsresultat tyder på att jordprover från tempererade zoner även kan lagras vid -20 C under mer än tre månader (28), (29) utan betydande minskningar av den mikrobiella aktiviteten.

▼B

Innan ett bearbetat jordprov används för detta test bör provet förinkuberas för att framkalla groning och avlägsnande av frön, och för att återställa jämvikten för den mikrobiella metabolismen efter den ändring av betingelser som sker mellan provtagning eller lagring och inkubation. Det är i regel tillräckligt med en förinkubationsperiod vars längd är 2–28 dagar och vars temperatur- och fuktbetingelser är ungefär desamma som under det egentliga försöket (15). Lagrings- och förinkubationsperioden bör tillsammans inte vara längre än tre månader.

1.9 TESTETS UTFÖRANDE

1.9.1 **Testbetingelser**

1.9.1.1 *Testtemperatur*

Jordproverna bör under hela testperioden inkuberas i mörker vid en konstant temperatur som är representativ för de klimatförhållanden som råder på den plats där testämnet används eller släpps ut. Temperaturen 20 ± 2 ºC rekommenderas för testämnen som kan nå jorden i tempererade klimat. Temperaturen bör övervakas.

För kemikalier som appliceras eller släpps ut i kallare klimat (till exempel i de nordiska länderna under hösten och vintern) bör extra jordprover även inkuberas vid en lägre temperatur (till exempel 10 ± 2 ºC).

1.9.1.2 *Fukthalt*

För omvandlingstest som görs under aeroba betingelser bör jordens fukthalt ([1]) justeras till ett pF-värde mellan 2,0 och 2,5 och upprätthållas på denna nivå (3). Jordens fukthalt uttrycks som massan vatten per massan torr jord. Fukthalten bör regelbundet kontrolleras (till exempel med två veckors intervall) genom vägning av inkubationsflaskorna. Vattenförluster kompenseras genom att tillföra vatten (helst sterilfiltrerat kranvatten). När vatten tillförs är det viktigt att förebygga eller minimera förluster av testämnet eller omvandlingsprodukter som kan ske genom avdunstning eller fotonedbrytning (i förekommande fall).

Vid omvandlingstest som görs under anaeroba betingelser och risfältsbetingelser mättas jorden med vatten genom översvämning.

1.9.1.3 *Aeroba inkubationsbetingelser*

I genomflödessystem upprätthålls de aeroba betingelserna genom periodisk spolning eller kontinuerlig ventilering med fuktad luft. I biometerflaskorna upprätthålls luftväxlingen genom diffusion.

1.9.1.4 *Sterila aeroba betingelser*

För att få upplysningar om relevansen hos ett testämnes abiotiska omvandling kan jordproverna steriliseras (steriliseringsmetoder beskrivs i hänvisningarna 16 och 29), behandlas med sterilt testämne (till exempel så att lösningen tillförs genom ett sterilt filter) och luftas med fuktad steril luft (se avsnitt 1.9.1.3. När det gäller jord för risodling bör jord och vatten steriliseras, och inkubationen görs därefter enligt beskrivningen i avsnitt 1.9.1.6.

([1]) Jorden får inte vara för våt eller för torr med tanke på upprätthållande av tillbörlig luftning och näring för mikroflarn i jorden. De rekommenderade fukthalterna för optimal mikrobiell tillväxt är 40–60 % vattenkapacitet (WHC) och 0,1–0,33 bar (6). Det senare motsvarar pF-området 2,0–2,5. Typiska fukthalter för olika jordtyper anges i bilaga 2.

▼B

1.9.1.5 *Anaeroba inkubationsbetingelser*

För att etablera och upprätthålla anaeroba betingelser inkuberas jorden efter behandlingen med testämnet i aeroba betingelser under en period vars längd är 30 dagar, en halveringstid eller DT_{50} (beroende på vilken tid som är kortast). Därefter mättas jorden med vatten (1–3 cm vattenskikt) och inkubationssystemet spolas med en inert gas (till exempel kväve eller argon ([1]). Testsystemet måste vara utformat så att pH, syrehalt och redoxpotential kan bestämmas, och det måste innehålla uppfångare för flyktiga produkter. System av biometertyp måste vara slutna för att luftinträngning genom diffusion ska undvikas.

1.9.1.6 *Inkubationsbetingelser för ris*

Vid undersökning av omvandlingen i jord för risodling översvämmas jorden med ett vattenskikt på 1–5 cm och testämnet tillförs vattenfasen (9). Jorddjupet bör vara minst 5 cm. Systemet ventileras med luft på samma sätt som vid försök i aeroba betingelser. Vattenskiktets pH, syrehalt och redoxpotential bör övervakas och rapporteras. Före det egentliga försöket behövs en förinkubationsperiod på minst två veckor (se avsnitt 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Testets varaktighet*

Försöken rörande hastighet och mönster bör normalt inte överskrida 120 dagar ([2]) (3), (6), (8). Det beror på att jordens mikrobiella aktivitet efter denna period sannolikt börjar minska med tiden, eftersom det gäller ett konstgjort laboratoriesystem som är isolerat och inte får naturlig påfyllning. Om det finns ett behov för att karakterisera minskningen av testämnet samt bildningen och minskningen av viktiga omvandlingsprodukter, kan försöksperioden förlängas (till exempel till 6 eller 12 månader) (8). Förlängda inkubationsperioder bör motiveras i testrapporten, som då även bör innehålla resultat från bestämningar av biomassa under och vid slutet av dessa perioder.

1.9.2 **Testets utförande**

Omkring 50–200 g jord (torrvikt) placeras i varje inkubationsflaska (se figurerna 1 och 2 i bilaga 3), och jorden behandlas med testämnet genom en av de metoder som beskrivs i avsnitt 1.8.2. Om organiska lösningsmedel används för tillförsel av testämnet bör lösningsmedlet avlägsnas från jorden genom avdunstning. Jorden blandas grundligt med en spatel och/eller genom att skaka flaskan. Om försöket görs under risfältsbetingelser, bör jord och vatten blandas grundligt efter tillförseln av testämnet. Små delprover (till exempel 1 g) av den behandlade jorden bör analyseras med avseende på testämnet för att kontrollera att fördelningen är jämn. En alternativ metod beskrivs nedan.

([1]) Aeroba betingelser är dominerande i ytjord och även i jord under ytan, såsom visas i ett forskningsprojekt som fått stöd från EU (K. Takagi *et al.* (1992), ”Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents”, *Proc. Internat. Symp. Enxironm. Aspects Pesticides Microbiol.,* 270–277, den 17–21 augusti 1992, Sigtuna, Sverige). Anaeroba betingelser förekommer endast sporadiskt vid översvämningar efter skyfall eller när risfältsbetingelser etableras i risfält.

([2]) Aeroba försök kan avslutas mycket tidigare, förutsatt att omvandlingsmönstret och mineraliseringen med säkerhet har nått sin absoluta slutpunkt vid försökets slut. Det är möjligt att avsluta testet efter 120 dagar eller när minst 90 % av testämnet har omvandlats, dock endast om minst 5 % CO_2 har bildats.

▼B

Tillförseln av testämne bör motsvara den högsta dosen som anges i bruksanvisningen för en växtskyddsprodukt, och en jämn tillförsel till ett lämpligt djup i åkern (till exempel 10 cm av det översta jordskiktet ([1]). Till exempel för kemikalier som appliceras på bladen eller på jorden, utan att blandas ned i jorden, är 2,5 cm ett lämpligt djup för beräkning av hur mycket kemikalie som bör tillföras varje flaska. För kemikalier som tillförs in i jorden används det djup som anges i produktens bruksanvisning. För allmänna kemikalier bör dosen uppskattas enligt den mest relevanta tillförselvägen. Om till exempel den viktigaste tillförselvägen till jorden är via avloppsslam, bör kemikalien doseras i slammet i sådan mängd att koncentrationen motsvarar den förväntade koncentrationen i det slam som används på åkern, och den mängd slam som tillförs testjorden ska motsvara det som normalt tillförs jordbruksjordar. Om denna koncentration inte är tillräckligt hög för att det ska vara möjligt att identifiera de viktigaste omvandlingsprodukterna kan man försöka med att inkubera separata jordprover som innehåller högre halter. Mycket höga halter som påverkar jordens mikrobiella funktioner bör dock undvikas (se avsnitten 1.5 och 1.8.2).

Alternativt kan en större jordsats (till exempel 1–2 kg) behandlas med testämnet. Satsen blandas därefter omsorgsfullt i en lämplig blandare och överförs i mindre portioner (50–200 g) till inkubationsflaskorna (till exempel med hjälp av provfördelare). Små delprover (till exempel 1 g) av den behandlade jordsatsen bör analyseras med avseende på testämnet för att kontrollera att fördelningen är jämn. Detta förfarande rekommenderas eftersom det ger möjlighet till en jämnare fördelning av testämnet i jorden.

Även obehandlade jordprover inkuberas under samma betingelser (aeroba) som de prover som har behandlats med testämnet. Proverna används för bestämningar av biomassa under och vid slutet av försöken.

När testämnet tillförs jorden upplöst i organiskt lösningsmedel bör jordprover som har behandlats med samma mängd lösningsmedel inkuberas under samma betingelser (aeroba) som gäller för de prover som har behandlats med testämnet. Dessa prover används för bestämning av biomassan i början, under och i slutet av undersökningen, i syfte att kontrollera lösningsmedlets inverkan på den mikrobiella massan.

Behållarna som innehåller behandlat jordprov monteras i ett genomflödessystem av det slag som beskrivs i figur 1 eller försluts med en absorptionskolonn av det slag som visas i figur 2 (se bilaga 3).

([1]) Den ytbaserade initialkoncentrationen beräknas med följande ekvation:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{1[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d\left[kg_{soil}/m^{3}\right]}$$

C_{soil} = Initialkoncentration i jorden (mg· kg^{-1})

A = Dosering (kg· ha^{-1}), 1 = jordskiktets tjocklek (m), d = bulktäthet för torr jord (kg· m^{-3}).

Som en tumregel gäller att en dosering som är 1 kg· ha^{-1} ger en koncentration i jorden som ligger kring 1 mg· kg^{-1} i ett 10 cm skikt (när bulktätheten är 1 g cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Provtagning och mätning**

Dubbla inkubationsflaskor tas ur systemet med lämpliga intervall, jordproverna extraheras med lämpliga lösningsmedel med olika polaritet och analyseras därefter med avseende på testämnet och/eller omvandlingsprodukter. Ett välplanerat test ska omfatta så många flaskor att två flaskor kan tas ur systemet vid varje provtagningstillfälle. Likaså avlägsnas absorptionslösningar eller fasta absorptionsmaterial med olika intervall (7 dagars intervall under den första månaden och därefter 17 dagars intervall) under och i slutet av inkubationsperioden för varje jordprov, och analyseras med avseende på flyktiga produkter. Utöver ett jordprov som tas direkt efter tillförseln (dag 0) bör testet omfatta minst 5 ytterligare provtagningstillfällen. Tidsintervallerna bör väljas på sådant sätt att mönstret för minskningen av testämnet och mönstren för bildning och minskning av omvandlingsprodukter kan bestämmas (till exempel 0, 1, 3, 7 dagar, 2, 3 veckor, 1, 2, 3 månader).

Vid användning av ^{14}C-märkt testämne kvantifieras icke-extraherbar radioaktivitet genom förbränning och en massbalans beräknas för varje provtagningsintervall.

När det gäller anaerob inkubation och risfältsinkubation analyseras jord- och vattenfasema tillsammans med avseende på testämnet och omvandlingsprodukter, eller separeras genom filtrering eller centrifugering före extraktion och analys.

1.9.4 **Valfria tilläggstest**

Aeroba, icke-sterila undersökningar vid ytterligare temperaturer och jordfukthalter kan vara till hjälp för uppskattningen av temperaturens och fukthaltens inverkan på omvandlingshastigheten i jord för ett testämne och/eller dess omvandlingsprodukter.

Man kan även försöka få en närmare karakterisering av den icke-extraherbara radioaktiviteten till exempel med hjälp av superkritisk vätskeextraktion.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Mängden testämne, omvandlingsprodukter, flyktiga ämnen (endast i %) och icke-extraherbara ämnen bör anges som procent av initialkoncentrationen för det tillförda ämnet och, där det är lämpligt, som mg· kg^{-1} jord (torrvikt) för varje provtagningsintervall. En massbalans bör anges som procent av initialkoncentrationen för det tillförda ämnet för varje provtagningsintervall. Med hjälp av en grafisk presentation av testämnets koncentration mot tiden kan halveringstiden för testämnets omvandling eller DT_{50} uppskattas. De viktigaste omvandlingsprodukterna bör identifieras och deras koncentrationer bör plottas mot tiden så att bildnings- och minskningshastigheterna kan bestämmas. En viktig omvandlingsprodukt är varje produkt som utgör > 10 % av den tillförda dosen vid varje tidpunkt medan undersökningen pågår.

De uppfångade flyktiga produkterna ger en viss indikation om testämnets och dess omvandlingsprodukters potentiella flyktighet ur jord.

▼B

Mer exakta bestämningar av halveringstiderna eller DT_{50} och, vid behov, DT_{75} och DT_{90} bör göras med hjälp av lämpliga beräkningar med kinetiska modeller. Värdena för halveringstid och DT_{50} bör rapporteras tillsammans med en beskrivning av vilken modell som har använts, vilken ordning av kinetik som har tillämpats och bestämningskoefficient (r^2. Första ordningens rekommenderas, utom om $r^2 < 0,7$. Vid behov bör beräkningar även göras för viktiga omvandlingsprodukter. Exempel på lämpliga modeller beskrivs i hänvisningarna 31–35.

Om hastigheterna undersöks vid flera temperaturer bör omvandlingshastigheterna beskrivas som en funktion av temperaturen inom försökstemperaturintervallet. För detta används Arrhenius-förhållandet enligt följande formel.

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ eller } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

där ln A och B är regressionskonstanter från skärningspunkten respektive lutningen för en anpassad linje som har erhållits genom linjär regression av ln k mot 1/T, där k är hastighetskonstanten vid temperaturen T och T är temperaturen uttryckt som grader Kelvin. Det är viktigt att notera att Arrhenius-förhållandet endast är giltigt inom ett begränsat temperaturområde i situationer där omvandlingen sker genom mikrobiell aktivitet.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Trots att undersökningarna görs i ett konstgjort system i laboratoriebetingelser, ger resultatet ändå en möjlighet att uppskatta testämnets omvandlingshastighet och omvandlingsprodukternas bildnings- och minskningshastighet i fältbetingelser (36), (37).

En undersökning av mönstret för omvandlingen av ett testämne ger upplysningar om hur ett ämne som tillförs jorden förändras strukturellt genom kemiska och mikrobiella reaktioner.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande:

Testämne:

— trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse av märkningsposition om radioaktivt märkt material används) och relevanta fysikalkemiska egenskaper (se avsnitt 1.5),

— testämnets renhet (orenheter),

— strålningskemisk renhet hos märkta kemikalier och specifik aktivitet (vid behov).

Referenstämnen:

— kemiskt namn och struktur för referensämnen som används för karakterisering och/eller identifiering av omvandlingsprodukter.

Testjord:

— upplysningar om provtagningsstället,

— provtagningsdatum och -förfarande,

▼B

— jordens egenskaper, såsom pH, halten organiskt kol, textur (% sand, % silt, % clay), katjonbyteskapacitet, bulktäthet, vattenretentionsegenskaper och mikrobiell biomassa,

— hur länge jorden har lagrats och lagringsbetingelserna (i förekommande fall).

Testbetingelser:

— undersökningsdatum,

— mängden tillfört testämne,

— lösningsmedel som har använts och hur testämnet har tillförts,

— initialvikt hos det behandlade jordprovet och vikten hos varje prov som tas för analys,

— beskrivning av inkubationssystemet,

— luftflödeshastigheter (endast genomflödessystem),

— försökstemperatur,

— jordens fukthalt under inkubationen,

— mikrobiell biomassa i början, under och i slutet av de aeroba försöken,

— pH, syrehalt och redoxpotential i början, under och i slutet av anaeroba försök och risfältsförsök,

— extraktionsmetod(er),

— metoder för kvantifiering och identifiering av testämnet och viktiga omvandlingsprodukter i jorden och i absorptionsmaterial,

— antalet replikat och antalet kontrollprover.

Resultat:

— resultaten från bestämning av mikrobiell aktivitet,

— analysmetodens repeterbarhet och känslighet,

— utbyten (procentvärden för en valid undersökning anges i avsnitt 1.7.1),

— resultaten i tabellform, uttryckta som procentandel av initialdosen och, där det är lämpligt, som mg· kg^{-1} jord (torrvikt),

— massbalans under och i slutet av försöken,

— karakterisering av icke-extraherbar (bunden) radioaktivitet eller rester i jorden,

— kvantifiering av frigjord CO_2 och andra flyktiga föreningar,

— kurvor där koncentrationerna av testämnet och, i tillämpliga fall, viktiga omvandlingsprodukter i jorden har avsatts mot tiden,

— halveringstid eller DT_{50}, DT_{75} och DT_{90} för testämnet och, i tillämpliga fall, viktiga omvandlingsprodukter, inbegripet konfidensgränser,

▼B

— en uppskattning av abiotisk sönderfallshastighet under sterila betingelser,

— en bedömning av omvandlingskinetiken för testämnet och, i tillämpliga fall, för viktiga omvandlingsprodukter,

— förslag till omvandlingsmönster, där det är lämpligt,

— diskussion och tolkning av resultaten,

— rådata (till exempel kromatogram för prover, beräkningar av provernas omvandlingshastigheter och metoder som har använts för att identifiera omvandlingsprodukterna).

4. **HÄNVISNINGAR**

1. US Environmental Protection Agency (1982), ”Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate”.

2. Agriculture Canada (1987), ”Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada”.

3. Europeiska unionen (EU) (1995), ”Kommissionens direktiv 95/36/EG av den 14 juli 1995 om ändring av rådets direktiv 91/414/EEG om utsläppande av växtskyddsprodukter på marknaden. Bilaga II, del A och bilaga III, del A: Omvandling, spridning och fördelning i miljön”.

4. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995), ”Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air”.

5. BBA (1986), ”Richtlinie fur die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus”.

6. ISO/DIS 11266-1 (1994), ”Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic Chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions”.

7. ISO 14239 (1997), ”Markundersökningar – Inkubationssystem för bestämning av mineraliseringen av organiska kemikalier i jord under aeroba förhållanden”.

8. SETAC (1995), ”Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides”, Mark R. Lynch, red.

9. MAFF – Japan 2000, ”Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded)”.

10. OECD (1995), ”Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments”, Belgirate, Italien, den 18–20 januari 1995.

11. J. A. Guth (1980), ”The study of transtbrmations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J.Hance, red)”, *Academic Press,* 123–157.

12. DFG, ”Pesticide Bound Residues in Soil”, Wiley – VCH, (1998).

13. T.R. Roberts, ”Non-extractable pesticide residue in soils and plants”, *Pure Appl. Chem,* 56, 945–956 (IUPAC 1984).

14. OECD Test Guideline 304 A, ”Inherent Biodegradability in Soil” (antagen den 12 maj 1981).

▼B

15. ISO 10381-6 (1993), ”Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory”.

16. Bilaga V till direktiv 67/548/EEG.

17. J. A. Guth (1981), ”Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil”, *Progress in Pesticide Biochemislry,* (red. D. H. Hutson, T. R. Roberts), J. Wiley & Sons, Vol I, 85–114.

18. Soil Texture Classification (US and FAO systems), *Weed Science, 33,* Suppl. 1 (1985) och *Soil Sci. Soc. Amer. Proc,* 26, 305(1962).

19. Methods of Soil Analysis (1986), ”Part 1, Physical and Mineralogical Methods” (red. A. Klute), *Agronomy Series, 9,* andra utgåvan.

20. Methods of Soil Analysis (1982), ”Part 2, Chemical and Microbiological Properties”, (red. A. L. Page, R. H. Miller och D.R. Kelney), *Agronomy Series,* 9, andra utgåvan.

21. ISO Standard Compendium Environment (1994), ”Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis”, första utgåvan.

22. E. Muckenhausen (1975), ”Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen”, *DLG-Verlag,* Frankfurt am Main.

23. F. Scheffer, P. Schachtschabel (1975), ”Lehrbuch der Bodenkunde”, F. Enke Verlag, Stuttgart.

24. J.P.E. Anderson, K. H. Domsch (1978), ”A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils”, *SoilBiol. Biochem.,* 10, 215–221.

25. ISO 14240-1 och 2 (1997). Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 1: Sustratinducerad respirationsmetod. Del 2: Fumigering – extraheringsmetod.

26. J.P.E. Anderson (1987), ”Handling and storage of soils for pesticide experiments”, *Pesticide Effects on Soil Microflora,* (red. M. P. Somerville och Greaves), Taylor & Francis, 45–60.

27. Kato, Yasuhiro (1998), ”Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment”. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide,* 105–120.

28. O. Keuken, J.P.E. Anderson (1996), ”Influence of storage on biochemical processes in soil”, *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality,* 59–63 (SETAC-Europa).

29. B. Stenberg, M. Johansson, M. Pel, K. Sjödahl-Svensson, J. Stenström, L. Torstensson (1996), ”Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass”, *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality,* 68–9 (SETAC-Europa).

30. . Gennari, M. Negre, R. Ambrosoli (1987), ”Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics”, *Plant and Soil,* 102, 197–200.

31. J. P.E. Anderson (1975), ”Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden”, Z. *PflKrankh Pflschutz,* Sonderheft VII, 141–146.

▼B

32. J.W. Hamaker (1976), ”The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides”, *Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides,* 181–199.

33. C.A.I. Goring, D.A. Laskowski, J.W. Hamaker, R.W. Meikle (1975), ”Principles of pesticide degradation in soil”, *Environmental Dynamics of Pesticides,* (red. R. Haque och V.H. Freed), 135–172.

34. G. Timme, H. Frehse, V. Laska (1986), ”Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues”*II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer,* 39, 188–204.

35. G. Timme, H. Frehse (1980), ”Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues”, *I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer,* 33, 47–60.

36. D.I. Gustafson, L. R. Holden (1990), ”Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability”, *Environm. Sci. Technol.,* 24, 1032–1041.

37. K. Hurle, A. Walker (1980), ”Persistence and its prediction”, *Interactions between Herbicides and the Soil,* (red. R. J. Hance), *Academic Press,* 83–122.

▼B

Bilaga 1

TENSION, FÄLTKAPACITET (FC) OCH VATTENKAPACITET (WHC) [1]

Vattenpelarens höjd (cm)	pF [a]	bar [b]	Anmärkningar
10^7	7	10^4	Torr jord
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Permanent vissningsgräns
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Område för fältkapacitet [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (ungefärligt värde)
1	0	0,001	Vattenmättad jord

[a] pF = logaritmen av cm vattenpelare.
[b] 1 bar= 10^5 Pa.
[c] Motsvarar en ungefärlig vattenhalt på 10 % i sand, 35 % i loam och 45 % i clay.
[d] Fältkapaciteten är inte konstant utan varierar enligt jordtyp mellan pF 1,5 och 2,5.

Tensionen mäts i cm vattenpelare eller i bar. På grund av det stora området för tensionen uttrycks den i praktiken som ett pF-värde som är ekvivalent med logaritmen av cm vattenpelare.

Fältkapaciteten definieras som den mängd vatten som en naturjord kan hålla mot gravitationen i två dagar efter en längre regnperiod eller efter tillräcklig bevattning. Den bestäms på platsen i ostörd jord. Denna bestämning kan således inte göras på störda jordprover i laboratorium. FC-värden som bestäms med störd jord kan uppvisa stora systematiska variationer

Vattenkapaciteten (WHC) bestäms i laboratoriet med ostörd och störd jord genom att mätta en jordkolonn med vatten genom transport genom kapillärkraft. WHC är särskilt användbar för störda jord och kan vara upp till 30 % högre än fältkapaciteten (1). Det är också försöksmässigt enklare att bestämma WHC än att få tillförlitliga FC-värden.

Noter

[1] E. Muckenhausen (1975), ”Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen”, DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

▼B

Bilaga 2

JORDENS FUKTHALT (g vatten per 100 g torr jord) I OLIKA JORDTYPER FRÅN OLIKA LÄNDER

Jordtyp	Land	Jordens fukthalt vid		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Sand	Tyskland	28,7	8,8	3,9
Loamy sand	Tyskland	50,4	17,9	12,1
Loamy sand	Schweiz	44,0	35,3	9,2
Silt loam	Schweiz	72,8	56,6	28,4
Clay loam	Brasilien	69,7	38,4	27,3
Clay loam	Japan	74,4	57,8	31,4
Sandy loam	Japan	82,4	59,2	36,0
Silt loam	USA	47,2	33,2	18,8
Sandy loam	USA	40,4	25,2	13,3

(1) Vattenkapacitet

▼B

Bilaga 3

Figur 1

Exempel på genomflödesapparatur för undersökning av kemikaliers omvandling i jord ([1]), ([2])

1: Nålventil

2: Gastvättflaska med vatten

3: Ultramembran (endast sterila betingelser), porstorlek 0,2 µm

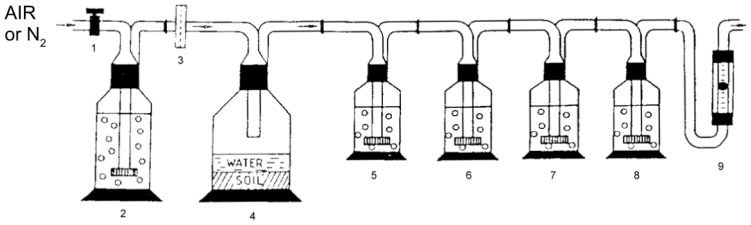
4: Flaska för jordmetabolism (vattenmättad endast vid anaeroba betingelser och risfältsbetingelser)

5: Etylenglykoluppfångare för organiska flyktiga ämnen

6: Svavelsyrauppfångare för alkaliska flyktiga ämnen

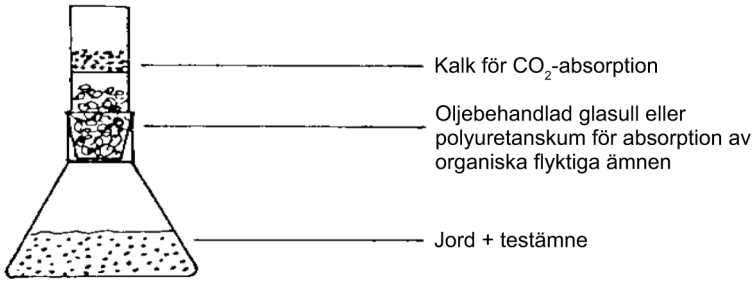
7, 8: Natriumhydroxiduppfångare för CO_2 och andra sura flyktiga ämnen

9: Flödesmätare



Figur 2

Exempel på en flaska av biometertyp för undersökning av kemikaliers omvandling i jord ([3])



([1]) J.A. Guth, (1980), ”The study of transformations”, *Interactions between Herbicides and the Soil* (red. R. J. Hance.), *Academic Press,* s. 123–157.

([2]) J .A. Guth, (1981), ”Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil”, *Progress in Pesticide Biochemistry,* (red. D.H. Hutson, T. R. Roberts),./. *Wiley & Sons,* Vol. *1,* s. 85–114.

([3]) J.P.E. Anderson, (1975), ”Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden”, Z. *PflKrankh Pflschutz,* Sonderheft VII, s. 141–146.

▼B

C.24 AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I AKVATISKA SEDIMENTSYSTEM

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 308 (2002).

1.1 INLEDNING

Kemikalier kan nå grunda eller djupa ytvatten exempelvis via direkt applicering, spridning med vinden, avrinning, dränering, bortskaffande av avfall eller utsläpp från industrin, hushåll, jordbruk och från atmosfären. Den testmetod som beskrivs här är en laboratoriemetod för bedömning av aerob och anaerob omvandling av organiska kemikalier i akvatiska sedimentsystem. Metoden grundar sig på existerande riktlinjer (1), (2), (3), (4), (5), (6). Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment som hölls i Belgirate, Italien, 1995 (7), kom man särskilt överens om hur många och vilka typer av sediment som ska användas i detta test. Workshopen i Belgirate gav också rekommendationer rörande insamling, hantering och lagring av sedimentprover, baserade på ISO-riktlinjer (8). Sådana undersökningar behövs för kemikalier som tillsätts direkt i vatten eller som sannolikt når vattenmiljön på det sätt som beskrivs ovan.

Betingelserna i naturliga akvatiska sedimentsystem är ofta aeroba i den övre vattenfasen. Sedimentets ytskikt kan vara aerobt eller anaerobt, medan djupare liggande sediment i regel är anaeroba. Med tanke på detta beskrivs både aerobt och anaerobt test i detta dokument. I det aeroba testet simuleras en aerob vattenpelare över ett aerobt sedimentskikt under vilket det finns en anaerob gradient. I det anaeroba testet simuleras ett fullständigt anaerobt vatten/sediment-system. I situationer där det krävs betydande avvikelser från dessa rekommendationer, till exempel i fråga om intakta sedimentkärnor eller sediment som kan ha exponerats för testämnet, kan andra metoder användas (9).

1.2 DEFINITIONER

Under alla omständigheter bör SI-enheter användas.

Testämne: Alla ämnen, oavsett det gäller en ursprunglig förorening eller relevanta omvandlingsprodukter.

Omvandlingsprodukter: Alla ämnen som uppstår till följd av biotiska eller abiotiska omvandlingsreaktioner av testämnet, inbegripet CO_2 och bundna rester.

Bundna rester: Sådana föreningar i jorden, i växter eller i djur som blir kvar i matrisen i form av ursprungligt ämne, dess metaboliter eller dess omvandlingsprodukter efter extraktion. Extraktionsmetoden får inte i avsevärd grad leda till förändringar i själva föreningarna eller matrisens struktur. Bindningens karaktär kan delvis klarläggas genom matrisstörande extraktionsmetoder och sofistikerade analysmetoder. Hittills har man på detta sätt kunnat identifiera till exempel kovalenta bindningar, jonbindningar och sorptiva bindningar samt inneslutning. Generellt sett innebär bildningen av bundna rester en betydande minskning av biotillgängligheten (10) (modifierat ur IUPAC 1984 (11)).

▼B

Aerob omvandling (oxidation): Reaktioner som sker i närvaro av molekylärt syre (12).

Anaerob omvandling (reduktion): Reaktioner som sker utan närvaro av molekylärt syre (12).

Naturliga vatten: Ytvatten som fås från dammar, floder, strömmar etc.

Sediment: En blandning av mineraliska och organisk-kemiska beståndsdelar. De senare består av föreningar med hög kol- och kvävehalt samt hög molekylvikt. Sediment deponeras genom inverkan av naturligt vatten och bildar ett gränssnitt med detta vatten.

Mineralisering: Det fullständiga sönderfallet av organiska föreningar till CO_2 och H_2O under aeroba betingelser, och till CH_4, CO_2 och H_2O under anaeroba betingelser. Med mineralisering avses här ett omfattande sönderfall som sker när en radioaktivt märkt förening används och en märkt kolatom oxideras eller reduceras kvantitativt under frigörande av motsvarande mängd $^{14}CO_2$ eller $^{14}CH_4$.

Halveringstid, $t_{0,5}$ – den tid det tar för ett testämne att omvandlas till 50 % när förloppet kan beskrivas med kinetik av första ordningen. Halveringstiden är oberoende av koncentrationen.

DT_{50} (tid för försvinnande 50): Den tid inom vilken testämnets koncentration minskar med 50 %.

DT_{75} (tid för försvinnande 75): Den tid inom vilken testämnets koncentration minskar med 75 %.

DT_{90} (tid för försvinnande 90): Den tid inom vilken testämnets koncentration minskar med 90 %.

1.3 REFERENSÄMNEN

Referensämnen bör användas för identifiering och kvantifiering av omvandlingsprodukterna genom spektroskopiska och kromatografiska metoder.

1.4 UPPLYSNINGAR OM TESTÄMNET

Omärkta eller isotopmärkta testämnen kan användas för bestämning av omvandlingshastigheten. Helst bör dock märkta ämnen användas. Märkt material behövs för undersökning av omvandlingsmönstret och för bestämning av en massbalans. ^{14}C-märkning rekommenderas, även om andra isotoper, såsom ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H och ^{32}P kan användas. Märkningen bör om möjligt finnas i molekylens mest stabila del(ar) ([1]). Kemikalien eller den radioaktiva kemikalien bör ha en renhetsgrad som är minst 95 %.

Innan ett test utförs bör följande upplysningar om testämnet finnas tillgängliga:

a) Vattenlöslighet (metod A.6).

b) Löslighet i organiska lösningsmedel.

c) Ångtryck (metod A.4) och Henrys lag-koefficient.

([1]) Om testämnet till exempel innehåller en ring måste märkningen finnas på denna ring. Om testämnet innehåller två eller flera ringar kan det vara nödvändigt med separata försök för utvärdering av vad som händer med de enskilda ringarna och för att få lämpliga upplysningar om bildningen av omvandlingsprodukter.

▼B

d) fördelningskoefficient n-oktanol/vatten (metod A.8).

e) Adsorptionskoefficient (K_d, K_f eller K_{oc}, om lämpligt) (metod C.18).

f) Hydrolys (metod C.7).

g) Dissociationskonstant (pK_a (OECD-riktlinje 112) (13).

h) Testämnets struktur och isotopens (isotopernas) placering, om tillämpligt.

Anmärkning: Den temperatur vid vilken mätningarna görs bör rapporteras.

Övriga användbar information är till exempel upplysningar om testämnets toxicitet för mikroorganismer, upplysningar om lätt eller inneboende bionedbrytbarhet och upplysningar om aerob och anaerob omvandling i jord.

Det bör finnas tillgång till analysmetoder (inbegripet extraktions- och reningsmetoder) för identifiering och kvantifiering av testämnet och dess omvandlingsprodukter i vatten och i sediment (se avsnitt 1.7.2).

1.5 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

I den testmetod som beskrivs här används ett aerobt och ett anaerobt akvatiskt sedimentsystem (se bilaga 1). Det ger möjlighet till följande:

i) bestämning av testämnets omvandlingshastighet i ett vatten/sediment-system,

ii) bestämning av testämnets omvandlingshastighet i sedimentet,

iii) bestämning av testämnets och/eller omvandlingsprodukternas mineraliseringshastighet (när ^{14}C-märkta testämnen används),

iv) identifiering och kvantifiering av omvandlingsprodukterna i vatten- och sedimentfaserna samt upprättandet av en massbalans (när radiomärkt testämne används),

v) bestämning av testämnets och omvandlingsprodukternas fördelning mellan de två faserna under en inkubationsperiod i mörker (för att undvika till exempel algblomning) vid konstant temperatur. Halveringstiderna samt värden på DT50, DT75 och DT90 kan bestämmas i de fall där tillräckliga data erhålls, men bör inte extrapoleras till tidpunkter som ligger långt efter försöksperioden (se avsnitt 1.2).

Minst två sedimenttyper och motsvarande vatten behövs för både den aeroba och anaeroba undersökningen (7). Det kan dock förekomma fall där fler än två akvatiska sediment bör används, till exempel om den kemikalie som testas kan förekomma i sötvattenmiljö och marin miljö.

▼B

1.6 TESTETS TILLÄMPBARHET

Metoden kan allmänt tillämpas på alla kemiska ämnen (omärkta eller radioaktivt märkta) för vilka det finns tillgång till en analysmetod som är tillräckligt exakt och känslig. Metoden kan tillämpas på föreningar som är i viss mån flyktiga, icke-flyktiga, lösliga i vatten eller svårlösliga i vatten. Testet bör inte tillämpas på kemikalier som är mycket flyktiga från vatten (till exempel desinfektionsmedel och organiska lösningsmedel) och som därför inte hålls kvar i vatten eller sediment under de försöksbetingelser som gäller för detta test.

Metoden har hittills använts för att undersöka kemikaliers omvandling i sötvatten och sediment, men kan i princip även tillämpas på flodmynning/havsystem. Metoden är inte lämplig för simulering av betingelserna i strömmande vatten (till exempel floder) eller i öppet hav.

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Extraktion och analys som görs av minst dubbla vatten- och sedimentprover omedelbart efter tillförsel av testämnet ger en första indikation på analysmetodens repeterbarhet och enhetligheten hos det förfarande som använts för tillförsel av testämnet. Utbyten för senare stadier av försöken erhålls genom massbalanserna (när märkt material används). Utbytena bör vara 90–110 % för märkta kemikalier (6) och 70–110 % för omärkta kemikalier.

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Analysmetodens repeterbarhet (med undantag av den initiala extraktionseffektiviteten) när det gäller att kvantifiera testämnet och omvandlingsprodukterna, kan kontrolleras genom en duplikatanalys av samma extrakt ur vatten- eller sedimentprover som har inkuberats tillräckligt länge för att omvandlingsprodukter ska ha bildats.

Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testämnet och för omvandlingsprodukterna bör vara minst 0,01 mg· kg^{-1} i vatten eller sediment (som testämne) eller 1 % av den dos som ursprungligen tillfördes testsystemet, beroende på vilket värde som är lägre. Likaså bör kvantifieringsgränsen (LOQ) anges.

1.7.3 **Noggrannheten hos omvandlingsdata**

Genom regressionsanalys av testämnets koncentrationer som en funktion av tiden fås ungefärliga upplysningar om omvandlingskurvans exakthet och en möjlighet att beräkna halveringstidernas konfidensgränser (när kinetik av pseudo-första ordningen tillämpas) eller DT_{50}-värden och, om tillämpligt, DT_{75}- och DT_{90}-värden.

1.8 BESKRIVNING AV METODEN

1.8.1 **Testsystem och utrustning**

Försöken bör utföras i glaskärl (till exempel flaskor eller centrifugrör), utom om förhandsupplysningarna (såsom fördelningskoefficient n-oktanol-vatten eller sorptionsdata) indikerar att testämnet kan bindas till glas, i vilket fall ett alternativt material (till exempel teflon) bör övervägas. Om det är känt att testämnet binds till glas kan problemet eventuellt lindras med en eller flera av följande metoder:

▼B

— bestämning av den massa testämne och omvandlingsprodukter som binds till glas,

— säkerställande av att alla glaskärl tvättas med lösningsmedel i slutet av testet,

— användning av formulerade produkter (se även avsnitt 1.9.2),

— användning av en större mängd hjälplösningsmedel för tillförsel av testämnet till systemet – hjälplösningsmedlet får dock inte leda till så kallad solvolys av testämnet.

Exempel på typisk testutrustning, till exempel genomflödessystem och system av biometertyp, visas i bilagorna 2 och 3 respektive (14). I hänvisning 15 beskrivs andra lämpliga inkubationssystem. Försöksutrustningen bör vara utformad på sådant sätt att luft- eller kväveväxling kan ske och flyktiga produkter kan uppfångas. Utrustningen bör ha sådana mått att testvillkoren uppfylls (se avsnitt 1.9.1). Ventilation kan ordnas genom försiktig bubbling eller genom att låta luft eller kväve passera över vattenytan. I det senare fallet kan det vara rekommendabelt med en försiktig omblandning av vattnet för bättre fördelning av syre eller kväve i vattnet. CO_2-fri luft bör inte användas eftersom detta kan leda till att vattnets pH-värde stiger. Det är under alla omständigheter önskvärt att om möjligt undvika störningar av sedimentet. Kemikalier som är i viss mån flyktiga bör testas i ett system av biometertyp med försiktig omblandning av vattenytan. Man kan även använda stängda kärl där utrymmet ovanför vätskeytan innehåller atmosfärsluft eller kväve och interna kärl för uppfångning av flyktiga produkter (16). Vid aeroba test behövs regelbunden växling av gasen i utrymmet ovanför vätskeytan för att kompensera för biomassans syreförbrukning.

Lämpliga uppfångare för flyktiga omvandlingsprodukter är till exempel kalium- eller natriumhydroxidlösning (1 M) för koldioxid ([1]), och etylenglykol, etanolamin eller tvåprocentig paraffin i xylen för organiska föreningar. Flyktiga ämnen som bildas under anaeroba betingelser, såsom metan, kan uppfångas till exempel med molekylsiktar. Sådana flyktiga ämnen kan förbrännas exempelvis till CO_2 genom att leda gasen genom ett kvartsrör fyllt med CuO vid 900 °C och fånga upp den bildade CO_2-gasen i en absorberare med alkali (17).

Det behövs också laboratorieinstrument för kemisk analys av testämnet och dess omvandlingsprodukter (till exempel gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC), tunnskiktskromatografi (TLC), masspektrometri (MS), gaskromatografi-masspektrometri (GC-MS), vätskekromatografi-masspektrometri (LC-MS), kärnmagnetisk resonans (NMR)), inbegripet detektionssystem för radioaktivt märkta eller omärkta kemikalier enligt behov. När radioaktivt märkt material används krävs också en vätskeskintillationsräknare och ett oxidationsmedel (för förbränning av sedimentprover före analys med avseende på radioaktivitet).

Likaså behövs övrig normal laboratorieutrustning för fysikalisk-kemiska och biologiska bestämningar (se tabell 1, avsnitt 1.8.2.2), glasvaror, kemikalier och reagenser, efter behov.

([1]) Eftersom dessa alkaliska absorptionslösningar även absorberar ventilationsluftens koldioxid och den koldioxid som bildas genom respiration vid aeroba försök, måste lösningarna regelbundet bytas ut för att de inte ska mättas och förlora sin absorptionskapacitet.

▼B

1.8.2 **Valet av akvatiska sediment, antal sediment**

Provtagningsplatserna bör alltid väljas i enlighet med testets ändamål. Vid valet av provtagningsplats måste hänsyn tas till eventuella utsläpp från jordbruk, industri eller hushåll till tillrinningsområden och till vatten som ligger uppströms. Sediment som inom de senaste fyra åren har förorenats med testämnet eller strukturellt analoga föreningar får inte användas.

1.8.2.1 *Valet av sediment*

För de aeroba försöken används i regel två sedimenttyper (7). De två sedimenttyper som väljs ut bör ha olika egenskaper med avseende på halten organiskt kol och textur. Ett av sedimenten bör ha en hög halt organiskt kol (2,5–7,5 %) och en fin textur, medan det andra sedimentet bör ha en låg halt organiskt kol (0,5–2,5 %) och en grov textur. Skillnaden mellan halterna organiskt kol bör i regel vara minst 2 %. Ett sediment har en fin textur när halten clay + silt ([1]) överstiger 50 % och en grov textur när halten clay + silt understiger 50 %. Skillnaden mellan de två sedimenttyperna med avseende på halterna clay + silt bör i regel vara minst 20 %. I fall där en kemikalie också kan nå havsvatten måste minst det ena vatten/sediment-systemet vara av marint ursprung.

För strikt anaeroba försök bör två sedimenttyper (med motsvarande vatten) tas från de anaeroba zonerna i ytvattenförekomster (7). Både sediment- och vattenfaserna bör hanteras och transporteras varsamt i syrefria betingelser.

Det kan även finnas andra parametrar som är viktiga vid valet av sediment, och dessa bör beaktas från fall till fall. Exempelvis sedimentens pH-område är en viktig faktor vid testning av kemikalier vars omvandling eller sorption kan vara pH-beroende. Ett sådant beroende kan framgå av testämnets pK_a-värde.

1.8.2.2 *Karakterisering av vatten/sediment-prover*

I tabellen som följer finns en översikt av de nyckelparametrar som måste bestämmas och rapporteras (med angivelse av den metod som använts) för både vatten och sediment. Likaså anges i vilket skede av testet dessa parametrar bör bestämmas. Metoder för bestämning av dessa parametrar beskrivs i hänvisningarna (18), (19), (20), (21).

Därutöver kan det, beroende på fall, vara nödvändigt att bestämma och rapportera andra parametrar (till exempel för sötvatten: partiklar, alkalinitet, hårdhet, konduktivitet, NO_3/PO_4 (förhållande och individuella värden), för sediment: katjonbyteskapacitet, vattenkapacitet, karbonat, totalkväve och totalfosfor samt för marina system: salinitet). Sediment och vatten behöver kanske också analyseras med avseende på nitrat, sulfat, biotillgängligt järn och eventuellt andra elektronmottagare, i syfte att bedöma redoxbetingelserna, särskilt med tanke på den anaeroba omvandlingen.

([1]) Clay + silt är den mineralfraktion vars partikelstorlek är mindre än 50 μm.

▼B

Bestämning av parametrar för karakterisering av vatten/sediment-prover (7), (22), (23)

Parameter	Skede av testförfarandet					
	Fältprovtagning	Efter-behandl.	Start av acklimatis.	Start av test	Under test	Slut av test
Vatten						
Ursprung/källa	X					
Temperatur	X					
pH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
Syrehalt$_2$	X		X	X	X	X
Redoxpntential*			X	X	X	X
Sediment						
Ursprung/källa	X					
Skiktets djup	X					
pH		X	X	X	X	X
Partikelstorleksfördelning		X				
TOC		X	X	X		X
Mikrobiell biomassa (*)		X		X		X
Redoxpotential (**)	Observationer (färg/lukt)		X	X	X	X

(*) Färska forskningsresultat tyder på att bestämningar av vattnets syrehalt och redoxpotential inte har något mekanistiskt eller prognostiskt värde när det gäller tillväxt och utveckling hos de mikrobiella populationerna i ytvatten (24), (25). Bestämning av den biokemiska syreförbrukningen (BOD, vid provtagning, start och slut av testet) och koncentrationerna för mikro- och makronäringsämnena Ca, Mg och Mn (vid start och slut av testet) i vatten, och bestämning av totalt N och totalt P i sediment (vid provtagning och vid slut av testet) kan vara bättre metoder när det gäller att tolka och utvärdera hastigheter och rutter för den aeroba bioomvandlingen.

(**) Metod för mikrobiell respiration (26), desinfektionsmetod (27) eller plate count-mätning (till exempel bakterier, aktinomyceter, svamp och kolonier totalt) för aeroba försök; metanogenes för anaeroba försök.

1.8.3 **Insamling, hantering och lagring**

1.8.3.1 *Insamling*

Anvisningarna i utkastet till ISO-riktlinjer om provtagning av bottensediment (8) bör följas vid provtagning av sediment. Sedimentproverna bör tas från sedimentets hela övre skikt (5–10 cm). Tillhörande vatten bör tas från samma plats och vid samma tidpunkt som sedimentprovet tas. För det anaeroba försöket bör sediment- och tillhörande vattenprov tas och transporteras under syrefria betingelser (28) (se avsnitt 1.8.2.1). I litteraturen finns beskrivningar av ett antal olika provtagningsutrustningar (8), (23).

▼B

1.8.3.2 *Hantering*

Sedimentet avskiljs från vatten genom filtrering och våtsiktas (2 mm) med användning av vattenöverskott (vatten från provtagningsplatsen). Detta vatten slängs efter siktningen. Därefter blandas kända mängder sediment och vatten i önskat förhållande (se avsnitt 1.9.1) i inkubationsflaskor och bereds för acklimatiseringsperioden (se avsnitt 1.8.4). Alla hanteringssteg som hör till det anaeroba försöket bör göras under syrefria betingelser (29), (30), (31), (32), (33).

1.8.3.3 *Lagring*

De sediment- och vattenprover som används ska allra helst vara nytagna. Om proverna ändå måste lagras bör sediment och vatten siktas enligt beskrivningen ovan och lagras tillsammans, med vattenmättnad (6–10 cm vattenskikt) i mörker och vid 4 ± 2 °C[4] under högst fyra veckor (7), (8), (23). Proverna för aeroba försök bör lagras med fri tillgång till luft (till exempel i en öppen behållare), medan proverna för anaeroba försök bör lagras i syrefria betingelser. Under transport och lagring får sediment eller vatten inte frysa, och sedimentet får inte torka ut.

1.8.4 **Beredning av sediment/vattenproverna för testet**

Innan testämnet tillförs bör proverna genomgå en acklimatiseringsperiod. För detta placeras varje sediment/vatten-prov i det inkubationskärl som kommer att användas under själva testet, och acklimatiseringen genomförs under exakt samma betingelser som gäller vid inkubationen under testet (se avsnitt 1.9.1). Acklimatiseringsperioden behövs för att systemet ska nå en tillräcklig stabilitet vad gäller pH, syrehalt i vatten, redoxpotential hos sediment och vatten samt makroskopisk separation av faserna. Acklimatiseringsperioden bör i regel omfatta en till två veckor, och bör inte överskrida fyra veckor. Resultaten från de bestämningar som görs under denna period bör rapporteras.

1.9 TESTETS UTFÖRANDE

1.9.1 **Testbetingelser**

Testet bör utföras i inkubationsutrustning (se avsnitt 1.8.1) med ett volymförhållande vatten/sediment mellan 3:1 och 4:1, och ett sedimentskikt med en tjocklek av 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). En minimimängd av 50 g sediment (baserat på torrvikt) per inkubationskärl är rekommenderad.

Testet bör genomföras i mörker vid en konstant temperatur inom intervallet 10–30 °C. Lämplig temperatur är (20 ± 2) °C. Vid behov kan ytterligare en lägre temperatur (till exempel 10 °C) övervägas från fall till fall, beroende på vilka upplysningar man vill få genom testet. Inkubationstemperaturen bör övervakas och rapporteras.

([1]) Färska undersökningar tyder på att lagring vid 4 °C kan leda till en minskning av sedimentets halt av organiskt kol, vilket eventuellt kan leda till en minskning av den mikrobiella aktiviteten (34).

▼B

1.9.2 **Behandling och tillförsel av testämnet**

En enda testkoncentration av kemikalien används ([1]). För växtskyddskemikalier som appliceras direkt i vattendrag används den maximidos som anges på etiketten, beräknad på grundval av vattenytan i testkärlet. I alla andra fall måste den koncentration som används basera sig på prognoser från utsläpp i miljön. Det är viktigt att säkerställa att den koncentration av testämnet som används är lämplig med tanke på karakterisering av omvandlingvägarna samt bildning och minskning av omvandlingsprodukter. Det kan vara nödvändigt att använda högre doser (till exempel 10-faldiga) i situationer där koncentrationerna av testämnet i början av försöket ligger nära detektionsgränserna, eller om viktiga omvandlingsprodukter inte utan svårighet kan detekteras när halterna är 10 % av testämnesdosen. Om högre testkoncentrationer används får de dock inte ha betydande negativa effekter på den mikrobiella aktiviteten i vatten/sedimentsystemet. För att få en konstant koncentration av testämnet i kärl av varierande storlek kan det vara lämpligt med en justering enligt den mängd material som har tillförts. Justeringen görs på grundval av vattenpelarens djup i kärlet i förhållande till vattendjupet på provtagningsplatsen (vilket antas vara 100 cm, även om andra djup kan användas). I bilaga 4 finns ett exempel på en beräkning.

Testämnet ska helst tillföras i form av vattenlösning i testsystemets vattenfas. I tvingande fall kan användningen av små mängder vattenlösliga lösningsmedel (såsom aceton eller etanol) tillåtas för tillförsel och fördelning av testämnet. Lösningsmedlets halt får dock inte överskrida 1 % (v/v) och det får inte ha negativa verkningar på den mikrobiella aktiviteten i testsystemet. Vattenlösningen av testämnet bör beredas med omsorg – det kan behövas genereringskolumner och förblandare för att säkerställa fullständig homogenitet. Efter tillsats av vattenlösningen till testsystemet rekommenderas varsam omblandning av vattenfasen, med så liten störning av sedimentet som möjligt.

Användningen av formulerade produkter rekommenderas i regel inte, eftersom de ingående beståndsdelarna kan påverka fördelningen av testämnet eller omvandlingsprodukter mellan vatten- och sedimentfaserna. För testämnen som är svårlösliga i vatten kan dock användningen av formulerat material vara ett lämpligt alternativ.

Antalet inkubationskärl beror på antalet provtagningstillfällen (se avsnitt 1.9.3). Testet bör omfatta tillräckligt många system så att två system kan tas ut vid varje provtagningstillfälle. Om testet omfattar kontrollenheter för varje akvatiskt sedimentsystem bör dessa enheter inte behandlas med testämnet. Kontrollenheterna kan användas för att bestämma den mikrobiella biomassan i sedimentet och totalt organiskt kol i vatten och sediment vid testets försökets slut. Två kontrollenheter (en kontrollenhet för varje akvatiskt sediment) kan användas för att övervaka de behövliga parametrarna i sediment och vatten under acklimatiseringsperioden (se tabellen i avsnitt 1.8.2.2). Två extra kontrollenheter måste tas in i fall där testämnet tillförs med hjälp av ett lösningsmedel, för bedömning av de negativa verkningarna på den mikrobiella aktiviteten i testsystemet.

([1]) Test med en extra koncentration kan vara till nytta i fråga om kemikalier som når ytvatten via olika rutter (vilket leder till avsevärt varierande koncentrationer) förutsatt att den lägre koncentrationen kan analyseras med tillräcklig exakthet.

▼B

1.9.3 **Testets varaktighet, provtagning**

Försöksperioden ska i regel inte sträcka sig över 100 dagar (6), och den bör fortsätta tills nedbrytningvägen och fördelningsmönstret för vatten och sediment har fastställts eller när 90 % av testämnet har omvandlats eller förflyktigats. Antalet provtagningstillfällen bör vara minst sex (inbegripet tidpunkt noll), med en valfri förhandsundersökning (se avsnitt 1.9.4) som görs i syfte att fastställa ett lämpligt provtagningsschema och testets varaktighet, i fall där det inte finns tillgång till tillräckliga data om testämnet från tidigare undersökningar. För hydrofoba testämnen kan det under försökets inledningsperiod behövas ytterligare provtagningstillfällen i syfte att bestämma hur fördelningen sker mellan vatten- och sedimentfaserna.

Vid provtagningstidpunkterna avlägsnas inkubationskärlen i sin helhet (med replikat) för analys. Sediment och ovanliggande vatten analyseras separat ([1]). Ytvattnet bör avlägsnas omsorgsfullt med minsta möjliga störning av sedimentet. Extraktionen och karakteriseringen av testämnet och omvandlingsprodukterna bör följa tillbörliga analysförfaranden. Det är viktigt att avlägsna material som kan ha adsorberats till inkubationskärlet eller mellanliggande slangar som används för att fånga upp flyktiga ämnen.

1.9.4 **Valfritt förförsök**

Om testets varaktighet och provtagningsschemat inte kan fastställas med stöd av andra relevanta undersökningar rörande testämnet kan det vara nödvändigt med ett valfritt förförsök. Detta bör utföras under samma betingelser som gäller för det slutliga försöket. I förekommande fall bör testrapporten innehålla en översiktlig redogörelse för relevanta försöksbetingelser och resultat från förförsöket.

1.9.5 **Mätningar och analys**

Vid varje provtagningstillfälle bör testämnets och omvandlingsprodukternas koncentration bestämmas i vatten och sediment, samt rapporteras (som en koncentration och som procentandel av den tillförda koncentrationen). Som allmän regel gäller att identifiering bör göras av alla omvandlingsprodukter som vid något provtagningstillfälle har detekterats med en andel som är ≥ 10 % av den radioaktivitet som tillförts det totala vatten/sediment-systemet, utom om det finns goda skäl för att låta bli. Likaså bör identifiering av omvandlingsprodukter vars koncentrationer kontinuerligt ökar under försökets gång övervägas (även i fall där dessa koncentrationer inte går över de gränser som anges ovan), eftersom ökningen kan tyda på beständighet. Denna fråga bör övervägas från fall till fall, och motiveringarna bör anges i rapporten.

Resultaten från system för uppfångning av gaser och flyktiga ämnen (CO_2 och övriga, till exempel flyktiga organiska ämnen) bör rapporteras för varje provtagningstillfälle. Mineraliseringshastigheterna bör rapporteras. Icke-extraherbara (bundna) rester i sediment bör rapporteras för varje provtagningstillfälle.

([1]) I fall där det förekommer en benägenhet till återoxidation av anaeroba omvandlingsprodukter bör de anaeroba betingelserna upprätthållas under provtagning och analys.

▼B

2 **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Den totala massbalansen eller utbytet (se avsnitt 1.7.1) av tillförd radioaktivitet bör beräknas för varje provtagningstillfälle. Resultatet bör rapporteras som en procentandel av den tillförda radioaktiviteten. Fördelningen av radioaktivitet mellan vatten och sediment bör rapporteras som koncentrationer och procentandelar, för varje provtagningstillfälle.

Halveringstiden, DT_{50} och, om tillämpligt, DT_{75} och DT_{90} för testämnet bör beräknas inbegripet konfidensgränser (se avsnitt 1.7.3). Upplysningar om den hastighet med vilken testämnet försvinner i vatten och sediment kan erhållas med hjälp av lämpliga utvärderingsmetoder. Dessa kan omfatta tillämpning av kinetik av pseudoförsta ordningen, empiriska kurvanpassningstekniker där grafiska eller numeriska lösningar används och mer komplexa bedömningar där till exempel modeller med en eller flera behållare används. Närmare upplysningar finns i relevant litteratur (35), (36), (37).

Alla metoder har sina för- och nackdelar samt stora variationer med avseende på komplexitet. Ett antagande om första ordningens kinetik kan innebära en för stark förenkling av nedbrytnings- och fördelningsprocesserna, men ger – i fall där detta antagande kan tillämpas – en term (hastighetskonstanten eller halveringstiden) som är lättbegriplig och av värde vid simuleringsmodellering och beräkningar av förväntade koncentrationer i miljön. Empiriska metoder eller linjära transformationer kan ge bättre anpassning av kurvorna till data, och därmed en bättre uppskattning av halveringstider, DT_{50} och, om tillämpligt, DT_{75} och DT_{90}. Användningen av härledda konstanter är dock begränsad. Med modellen med behållare kan man få ett antal användbara konstanter av värde vid riskbedömning. Dessa beskriver nedbrytningshastigheten i olika behållare och fördelningen av kemikalien. De bör också användas för uppskattning av hastighetskonstanter för bildning och nedbrytning av viktiga omvandlingsprodukter. Under alla omständigheter måste den metod som används motiveras, och anpassningsgraden bör demonstreras grafiskt eller statistiskt.

3 **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Testämne:

— trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse av märkningsposition(er) om radioaktivt märkt material används) och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— testämnets renhet (orenheter),

— strålningskemisk renhet hos märkta kemikalier och molär aktivitet (vid behov).

▼B

Referensämnen:

— kemiskt namn och struktur för referensämnen som används för karakterisering och/eller identifiering av omvandlingsprodukter.

Testsediment och -vatten:

— platsangivelse och beskrivning av provtagningsplats(er) för akvatiska sediment inklusive, om möjligt, föroreningshistoria,

— alla upplysningar rörande insamling, lagring (i förekommande fall) och acklimatisering av vatten/sediment-system,

— egenskaperna hos vatten/sediment-proverna (se tabellen i avsnitt 1.8.2.2).

Testbetingelser:

— testsystem (till exempel genomflöde, biometer, ventilationssätt, omblandningsmetod, vattenvolym, sedimentmassa, tjocklek hos vatten- respektive sedimentskikt, testkärlens mått)

— tillförsel av testämnet till testsystemet: testkoncentration, antalet replikat och kontrollprover, hur testämnet har tillförts (till exempel om lösningsmedel har använts),

— inkubationstemperatur,

— provtagningstidpunkter,

— exktraktionsmetoder och deras effektivitet samt analysmetoder och detektionsgränser,

— metoder för karakterisering och identifiering av omvandlingsprodukter,

— avvikelser från testprotokollet eller testbetingelserna under försökets gång.

Resultat:

— rådata för representativa analyser (alla rådata måste arkiveras enligt principerna om god laboratoriesed),

— analysmetodens repeterbarhet och känslighet,

— utbyten (procentvärden för en valid undersökning anges i avsnitt 1.7.1),

— tabeller med resultaten uttryckta som procentandel av den tillförda dosen och som $mg \cdot kg^{-1}$ i vatten, sediment och totalsystemet (endast procent) för testämnet och, om tillämpligt, för omvandlingsprodukter och icke-extraherbar radioaktivitet,

— massbalans under och i slutet av försöken,

— en grafisk presentation av omvandlingen i vatten, i sediment och i totalsystemet (inbegripet mineralisering),

— mineraliseringshastigheter,

▼B

— halveringstid, DT_{50} och, om tillämpligt, DT_{75} och DT_{90} för testämnet och, om tillämpligt, för viktiga omvandlingsprodukter, inbegripet konfidensgränser i vatten, sediment och totalsystemet,

— en bedömning av omvandlingskinetiken för testämnet och, om tillämpligt, för viktiga omvandlingsprodukter,

— förslag till omvandlingsmönster, om tillämpligt,

— diskussion av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990), Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system, Germany.

2. Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991), Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a), The Netherlands.

3. MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992), Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046, United-Kingdom.

4. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and fate (1987), Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic, Canada, s. 35–37.

5. US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982), Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

6. SETAC-Europe publication. (1995), Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Bryssel.

7. OECD Test Guidelines Programme. (1995), Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 januari 1995.

8. ISO/DIS 5667-12 (1994), Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9. US-EPA (1998a), Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180), EPA 712-C-98-080.

10. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11. T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, s. 945–956 (IUPAC 1984).

12. OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

13. OECD (1993), Guidelines for Testing of Chemicals, Paris, OECD (1994–2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14. Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988), Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

▼B

15. Guth, J.A. (1981), Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, s. 85–114. J. Wiley & Sons.

16. Madsen, T., Kristensen, P. (1997), Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, s. 631–637.

17. Steber, J., Wierich, P. (1987), The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, s. 661–667.

18. Black, CA. (1965), Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

19. APHA (1989), Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20. Rowell, D.L. (1994), Soil Science Methods and Applications. Longman.

21. Light, T.S. (1972), Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, s. 1038–1039.

22. SETAC-Europe publication (1991), Guidance document on testing Procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop ”A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests”, den 3–4 juli 1991.

23. SETAC-Europe publication. (1993), Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8–10 november 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

24. Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997), Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, s. 2858–2868.

25. Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999), Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, s. 329–338.

26. Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985), Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, s. 197–203.

27. ISO-14240-2. (1997), Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation- extraction method.

28. Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol, Bull. 24 (1), s. 13–21.

29. Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984), General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, s. 850–857.

30. Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989), Screening of Chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, s. 1527–1550.

31. Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993), Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, s. 1499–1509.

▼B

32. Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986), A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, s. 3597–3603.

33. US-EPA (1998b), Anaerobic biodegradability of organic Chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

34. Sijm, Haller and Schrap (1997), Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, s. 961–968.

35. Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986), Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues 11. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, s. 187–203.

36. Timme, G., Frehse, H. (1980), Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, s. 47–60.

37. Carlton, R.R. and Allen, R. (1994), The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, s. 1349–1354.

▼B

Bilaga 1

VÄGLEDNING RÖRANDE AEROBA OCH ANAEROBA TESTSYSTEM

Aerobt testsystem

Det aeroba testsystem som beskrivs i denna testmetod består av ett aerobt vattenskikt (typisk syrehalt är 7 – 10 mg· l^{-1}) och ett sedimentskikt som är aerobt vid ytan och anaerobt under ytan (den typiska genomsnittliga redoxpotentialen (E_h) i sedimentets anaeroba zon ligger mellan – 80 och – 190 mV). Fuktad luft leds över vattenytan i varje inkubationsenhet för att upprätthålla tillräcklig syrehalt i utrymmet ovanför vätskeytan.

Anaerobt testsystem

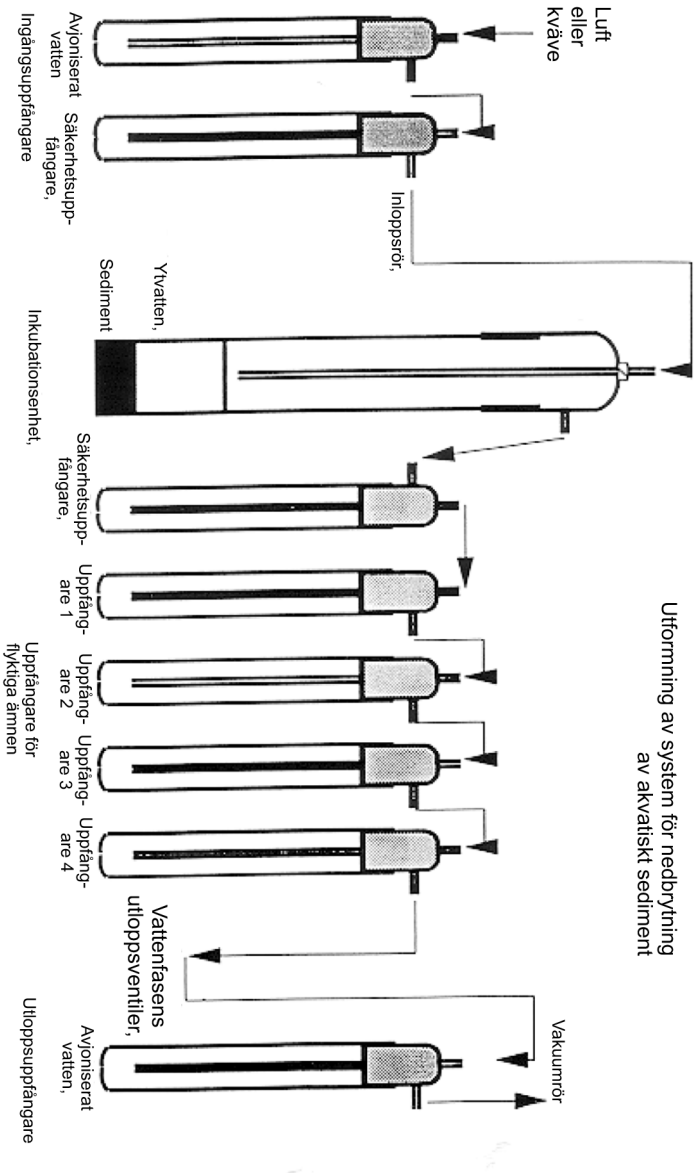
Testförfarandet är till väsentliga delar samma i ett aerobt som i ett anaerobt testsystem, med undantag av att fuktad kvävgas leds över vattenytan i varje inkubationsenhet för att upprätthålla en kvävgasatmosfär. Sediment och vatten anses vara anaeroba när redoxpotentialen (E_h) är lägre än – 100 mV.

I anaeroba test inbegriper bedömningen av mineraliseringen även bedömning av frigjord koldioxid och metan.

▼B

Bilaga 2

EXEMPEL PÅ EN GENOMFLÖDESUTRUSTNING

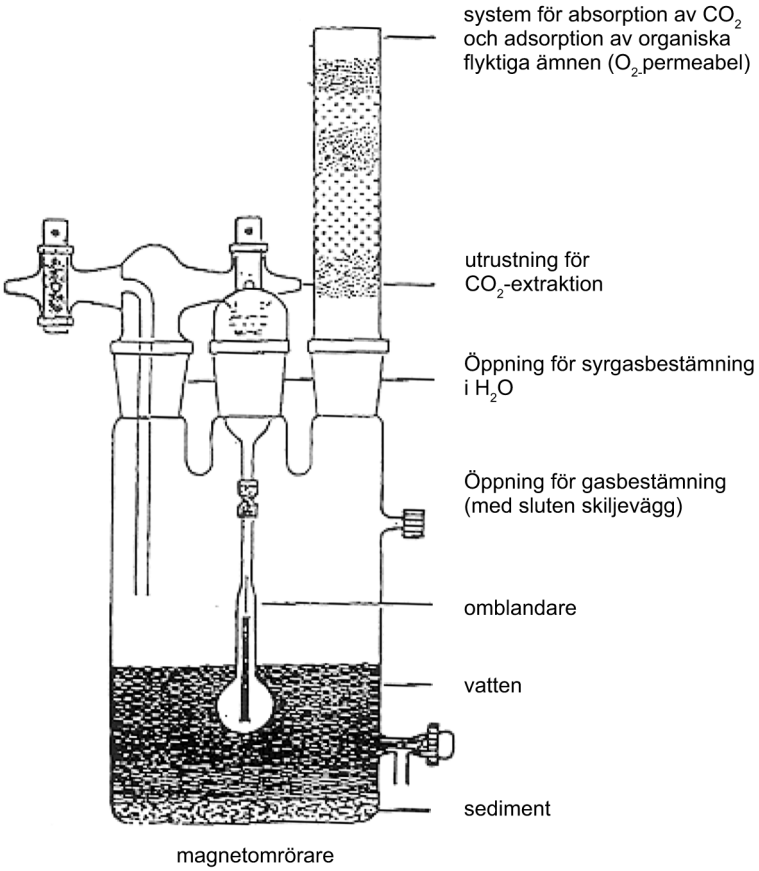


Säkerhetsuppfångare, tom
Uppfångare 1:
Etylenglykol för uppfångning av organiska flyktiga ämnen
Uppfångare 2:
Svavelsyra (0,1 M) för uppfångning av alkaliska flyktiga ämnen
Uppfångare 3 och 4:
Natriumhydroxid (2 M) för uppfångning av CO_2 och andra sura flyktiga ämnen

▼B

Bilaga 3

EXEMPEL PÅ EN HIOMETERUTRUSTNING



▼B

Bilaga 4

EXAMPELBERÄKNINGAR FÖR DEN DOS SOM TILLFÖRS TESTKÄRLEN

Cylinderns innerdiameter:	= 8 cm
Vattenpelarens djup exklusive sediment:	= 12 cm
Yta: 3,142 × 4^2	= 50,3 cm^2
Dosering: 500 g testämne/ha motsvarar 5 µg/cm^2	
Totalt i µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
Justering av mängden till att motsvara djupet 100 cm:	
12 × 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Vattenpelarens volym: 50,3 × 12	= 603 ml
Koncentration i vatten: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml eller 50 µg/l

▼M1

C.25. AEROB MINERALISERING I YTVATTEN – SIMULERINGSTEST AV BIOLOGISK NEDBRYTNING

1. METOD

Denna metod motsvarar OECD TG 309 (2004) (1).

1.1 INLEDNING

Syftet med detta test är att mäta tiden för biologisk nedbrytning av en testsubstans vid låg koncentration i aerobt naturligt vatten, samt att kvantifiera observationerna i form av kinetiska hastighetsuttryck. Detta simuleringstest är ett batchvis skakflasktest för bestämning av hastigheten för aerob nedbrytning av organiska ämnen i prover av naturligt ytvatten (sött, bräckt eller salt). Det är grundat på ISO/DIS 14592–1 (2) och innehåller också delar av testmetoderna C.23 och C.24 (3) (4). För att undvika att mikromiljön i testet försämras vid långa testperioder kan ett semikontinuerligt testförfarande användas i stället för batchtest. Simuleringstestet syftar i första hand till att fastställa testsubstansens mineralisering i ytvatten, och mineralisering utgör grunden för att kunna formulera nedbrytningskinetiken. I andra hand syftar testet emellertid också till att få fram uppgifter om primär nedbrytning och bildandet av viktiga nedbrytningsprodukter. Identifiering av nedbrytningsprodukter, och om möjligt kvantifiering av deras koncentration, är särskilt viktigt för ämnen som mineraliseras mycket långsamt (t.ex. sådana med en halveringstid för den totala mängden kvarvarande ^{14}C på över 60 dygn). Högre koncentrationer av testsubstansen (t.ex. > 100 μg/l) bör med tanke på analytiska begränsningar normalt sett användas för identifiering och kvantifiering av viktiga nedbrytningsprodukter.

I detta test innebär en låg koncentration (t.ex. mindre än 1 μg/l upp till 100 μg/l) att den är tillräckligt låg för att den biologiska nedbrytningskinetiken i testet ska spegla vad som kan förväntas i miljön. Jämfört med den sammanlagda massan av biologiskt nedbrytbara kolsubstrat i det naturliga vatten som används i testet ska den testsubstans som förekommer i låg koncentration fungera som sekundärt substrat. Det innebär att den förväntade biologiska nedbrytningskinetiken är av första ordningen (icke-tillväxt-kinetik) och att testsubstansen kan brytas ned genom s.k. co-metabolism. Första ordningens kinetik innebär att nedbrytningshastigheten (mg/l/dygn) är proportionell till substratkoncentrationen, som minskar med tiden. Vid verklig första ordningens kinetik är den specifika hastighetskonstanten (k) för nedbrytningen oberoende av tid och koncentration. Konstanten k varierar alltså inte märkbart under ett experiments gång, och ändras inte till följd av ökad koncentration mellan experimenten. Enligt definition är den specifika hastighetskonstanten för nedbrytningen lika med den relativa koncentrationsförändringen per tidsenhet: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Normalt sett förväntas första ordningens kinetik under de angivna villkoren, men det kan förekomma särskilda förhållanden där annan kinetik är mer passande. Exempelvis kan avvikelser från första ordningens kinetik iakttas om den biologiska omvandlingens hastighet begränsas av massöverföringsfenomen som diffusionshastighet, snarare än av den biologiska reaktionshastigheten. Data kan emellertid nästan alltid beskrivas med hjälp av pseudoförsta ordningens kinetik där man accepterar en hastighetskonstant som är beroende av koncentrationen.

▼M1

Uppgifter om testsubstansens biologiska nedbrytbarhet vid högre koncentrationer (t.ex. från standard-screeningtest) och om abiotisk nedbrytbarhet, nedbrytningsprodukter och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper bör finnas tillgängliga före testets genomförande för att underlätta planeringen av experimentet och tolkningen av resultaten. Genom att använda ^{14}C-märkta testsubstanser och fastställa fasfördelningen av ^{14}C i slutet av testet blir det möjligt att bestämma fullständig biologisk nedbrytbarhet. Om omärkta testsubstanser används kan fullständig biologisk nedbrytbarhet uppskattas endast om en högre koncentration testas och alla viktiga nedbrytningsprodukter är kända.

1.2 DEFINITIONER

Primär biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes strukturella förändring (omvandling) genom mikroorganismer, som leder till att den kemiska identiteten förloras.

Funktionell biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes strukturella förändring (omvandling) genom mikroorganismer, som leder till att en viss egenskap förloras.

Fullständig aerob biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes nedbrytning genom mikroorganismer i närvaro av syre till koldioxid, vatten och mineralsalter av förekommande grundämnen (mineralisering), och produktion av ny biomassa och organiska mikrobiella biosyntetiska produkter.

Mineralisering: Ett kemiskt ämnes eller organisk materias nedbrytning genom mikroorganismer i närvaro av syre till koldioxid, vatten och mineralsalter av förekommande grundämnen.

Lagfas: Tiden mellan ett tests början och den tidpunkt då de nedbrytande mikroorganismerna har adapterats och graden av biologisk nedbrytning för ett kemiskt ämne eller en organisk materia har nått mätbara nivåer (t.ex. 10 % av den maximala teoretiska biologiska nedbrytningen eller lägre, beroende på mätteknikens noggrannhet).

Maximal biologisk nedbrytningsgrad: Ett kemiskt ämnes eller en organisk materias nedbrytningsgrad i ett test, uttryckt i procent, över vilken ingen ytterligare biologisk nedbrytning sker under testets gång.

Primärt substrat: En samling av naturliga kol- och energikällor som gör att den mikrobiella biomassan kan upprätthållas och tillväxa.

Sekundärt substrat: En substratkomponent som förekommer i så låg koncentration att dess nedbrytning endast förser de berörda mikroorganismerna med obetydliga kol- och energimängder, till skillnad mot det kol och den energi som tillhandahålls vid nedbrytningen av de huvudsakliga substratkomponenterna (primärt substrat).

Hastighetskonstant för nedbrytning: En konstant i första ordningens eller pseudo-första ordningens kinetik, k (d^{-1}), som anger nedbrytningsprocessernas hastighet. För ett batchexperiment uppskattas k från den första delen av den nedbrytningskurva som erhålls efter lagfasens slut.

▼M1

Halveringstid, $t_{1/2}$ (d): Term som används för att beskriva hastigheten för en första ordningens reaktion. Den motsvarar den tid som krävs för en koncentrationsminskning med faktor 2. Förhållandet mellan halveringstiden och hastighetskonstanten för nedbrytningen kan uttryckas med ekvationen $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Halveringstid för nedbrytning, DT_{50} (d): Term som används för att kvantifiera resultaten av test av biologisk nedbrytning. Den motsvarar den tid, inbegripet lagfasen, som krävs för att uppnå en biologisk nedbrytning på 50 %.

Detektionsgräns (LOD)och kvantifieringsgräns (LOQ) : Detektionsgränsen (LOD) är den koncentration av ett ämne under vilken ämnet inte kan särskiljas från analytiska artefakter. Kvantifieringsgränsen (LOQ) är den koncentration av ett ämne under vilken koncentrationen inte kan bestämmas med tillräcklig noggrannhet.

Löst organiskt kol (DOC): Den del av det organiska kolet i ett vattenprov som inte kan avlägsnas genom specificerad fasseparation, exempelvis genom centrifugering med 40 000 ms^{-2} i 15 minuter eller filtrering genom membran med en porstorlek på 0,2–0,45 μm.

Total ^{14}C-aktivitet i organiskt kol (TOA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till organiskt kol.

^{14}C-aktivitet i löst organiskt kol (DOA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till löst organiskt kol.

^{14}C-aktivitet i partikulärt organiskt kol (POA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till partikulärt organiskt kol.

1.3 TESTMETODENS TILLÄMPLIGHET

Simuleringstestet kan användas för icke-flyktiga eller halvflyktiga organiska ämnen som testas vid låga koncentrationer. Vid användning av öppna flaskor (t.ex. med en propp av bomull) kan ämnen med Henrys konstant under ca 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (ung. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) i praktiken anses vara icke-flyktiga. Vid användning av förslutna flaskor med en innesluten luftvolym kan halvflyktiga ämnen (med Henrys konstant < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) testas utan förluster från testsystemet. Förlust av ^{14}C-märkta ämnen kan ske när koldioxiden strippas av, om nödvändiga försiktighetsåtgärder inte vidtas. I sådana fall kan det vara nödvändigt att fånga upp koldioxiden i ett internt absorptionsmedel med alkali eller att använda ett externt system för absorption av koldioxid (direkt $^{14}CO_2$-bestämning, se tillägg 3). Om man vill bestämma den biologiska nedbrytningskinetiken måste testsubstansens koncentration vara lägre än dess vattenlöslighet. Det bör emellertid noteras att de värden som anges för vattenlöslighet i litteraturen kan vara avsevärt högre än testsubstansens löslighet i naturliga vatten. Eventuellt kan lösligheten för testsubstanser med särskilt dålig vattenlöslighet fastställas genom användning av de naturliga vatten som ska testas.

Denna metod kan användas för att simulera biologisk nedbrytning i ytvatten utan grova partiklar (pelagiskt test) eller i grumligt ytvatten som exempelvis kan förekomma i gränsskiktet mellan vatten och sediment (suspenderat sediment-test).

▼M1

1.4 TESTPRINCIP

Testet genomförs i batch genom att testsubstansen inkuberas antingen endast med ytvatten (pelagiskt test) eller med vatten med tillsats av suspenderade fasta ämnen/sediment med en torrvikt på 0,01–1 g/l (suspenderat sediment-test) för att simulera ett vattendrag med suspenderade fasta ämnen eller resuspenderat sediment. Koncentrationer av suspenderade fasta ämnen/sediment i den lägre delen av detta intervall är utmärkande för de flesta ytvatten. Testflaskorna inkuberas i mörker vid omgivande temperatur under aeroba förhållanden och omblandning. Minst två olika koncentrationer av testsubstansen bör användas för bestämning av nedbrytningskinetiken. Koncentrationerna bör skilja sig från varandra med en faktor 5 till 10 och bör motsvara den förväntade koncentrationsspridningen i miljön. Testsubstansens högsta koncentration bör inte överstiga 100 µg/l, men maximikoncentrationer under 10 µg/l eller lägre är att föredra för att man ska kunna vara säker på att den biologiska nedbrytningen följer första ordningens kinetik. De lägsta koncentrationerna bör inte överstiga 10 µg/L, men lägsta testkoncentrationer på 1–2 µg/l eller under 1 µg/l är att föredra. Normalt sett kan en adekvat analys av så låga koncentrationer göras med hjälp av ^{14}C-märkta ämnen som finns i handeln. På grund av analytiska begränsningar är det inte alltid möjligt att mäta testsubstansens koncentration med tillräcklig noggrannhet om testsubstansen tillsätts i koncentrationer på ≤ 100 µg/l (se andra stycket i avsnitt 1.7.2). Högre koncentrationer av testsubstansen (> 100 µg/l och ibland > 1 mg/l) kan användas för identifiering och kvantifiering av viktiga nedbrytningsprodukter eller om det inte finns en specifik analysmetod med låg detektionsgräns. Vid test av höga koncentrationer av en testsubstans kan det vara omöjligt att utnyttja resultaten för att uppskatta första ordningens nedbrytningskonstant och halveringstiden, eftersom nedbrytningen förmodligen inte följer första ordningens kinetik.

Nedbrytningen följs vid lämpliga tillfällen genom mätning av kvarvarande ^{14}C eller av testsubstansens restkoncentration vid användning av specifika kemiska analyser. ^{14}C-märkning av molekylens stabilaste del gör att man kan bestämma den totala mineraliseringen, medan ^{14}C-märkning av en mindre stabil del av molekylen eller användning av specifika analyser endast möjliggör bedömning av primär biologisk nedbrytning. Den stabilaste delen av en molekyl innehåller emellertid inte nödvändigtvis molekylens funktionella del (som kan kopplas till en specifik egenskap som toxicitet, bioackumulation o.d.). I sådana fall kan det vara lämpligt att använda en ^{14}C-märkt testsubstans i den funktionella delen, för att följa upp den specifika egenskapens eliminering.

1.5 INFORMATION OM TESTSUBSTANSEN

I detta test kan både radioaktivt märkta och omärkta testsubstanser användas. Det rekommenderas att ^{14}C-märkning används, och märkningen bör normalt sett göras i molekylens stabilaste del (se även avsnitt 1.4). För ämnen som innehåller mer än en aromatisk ring bör helst en eller flera kolatomer i varje ring ^{14}C-märkas. Dessutom bör helst en eller flera kolatomer på båda sidor om bindningar som bryts lätt ^{14}C-märkas. Testsubstansens kemiska och radiokemiska renhet ska vara > 95 %. För radioaktivt märkta ämnen rekommenderas en specifik aktivitet på ca 50 µCi/mg (1,85 MBq) eller mer i syfte att underlätta ^{14}C-mätning i test som genomförs med låg initial koncentration. Följande uppgifter om testsubstansen bör finnas tillgängliga:

▼M1

— Löslighet i vatten [metod A.6].

— Löslighet i organiska lösningsmedel (ämnen som används med lösningsmedel eller har dålig löslighet i vatten).

— Dissociationskonstant (pKa) om ämnet tenderar till protonering eller deprotonering [OECD TG 112] (5).

— Ångtryck [metod A.4] och Henrys konstant.

— Kemisk stabilitet i vatten och i mörker (hydrolys) [metod C.7].

Om ämnen med dålig vattenlöslighet testas i havsvatten kan det också vara bra att känna till utsaltningskonstanten (Setjenovs konstant) K^s, som definieras genom formeln log (S/S') = K^s C_m, där S och S' är ämnets löslighet i söt- respektive saltvatten och C_m är saltets molaritet.

Om testet görs som ett ”suspenderat sediment-test” ska även följande uppgifter finnas tillgängliga:

— Fördelningskoefficient n-oktanol/vatten [metod A.8].

— Adsorptionskoefficient [metod C.18].

Andra viktiga uppgifter, bl.a. följande:

— Koncentration i miljön, såvida den är känd eller kan uppskattas.

— Testsubstansens toxicitet för mikroorganismer [metod C.11].

— Lätt och/eller potentiell biologisk nedbrytbarhet [metoderna C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)].

— Aerob eller anaerob biologisk nedbrytbarhet vid omvandlingsstudier i jord och sediment/vatten [metoderna C.23 och C.24].

1.6 REFERENSSUBSTANS

Ett ämne som normalt sett lätt bryts ned under aeroba förhållanden (t.ex. anilin eller natriumbensoat) bör användas som referenssubstans. Anilin och natriumbensoat kan vanligen förväntas brytas ned på mindre än två veckor. Referenssubstansen ska visa att den mikrobiella aktiviteten i testvattnet ligger inom vissa gränser, dvs. att vattnet innehåller en aktiv population av mikroorganismer.

▼M1

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Omedelbart efter det att testsubstansen tillförts ska alla initiala testkoncentrationer kontrolleras genom mätning av ^{14}C-aktivitet, eller genom kemisk analys om ämnena är omärkta, i minst två prover. Därigenom kan man få information om analysmetodens tillämplighet och repeterbarhet, och om testsubstansen är jämnt fördelad. Normalt sett används den uppmätta initiala ^{14}C-aktiviteten eller testsubstansens koncentration vid de följande analyserna av data, snarare än de nominala koncentrationerna, eftersom man därigenom kompenserar för förluster genom sorption och doseringsfel. För ^{14}C-märkta testsubstanser anges utbytet vid experimentets slut genom massbalans (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.4). Idealt sett ska den radioaktivt märkta massbalansen ligga inom intervallet 90 % till 110 %, medan analysnoggrannheten bör ge ett initialt utbyte på mellan 70 % och 110 % för omärkta testsubstanser. Dessa intervall ska ses som mål och bör inte användas som kriterier för huruvida testet ska accepteras. Eventuellt kan analysnoggrannheten för testsubstansen bestämmas vid lägre koncentrationer än den initiala koncentrationen och för viktiga nedbrytningsprodukter.

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Analysmetodens repeterbarhet (inbegripet den initiala extraktionseffektiviteten) när det gäller att kvantifiera testsubstansen och, i förekommande fall, nedbrytningsprodukterna bör kontrolleras genom analys av fem prover av varje enskilt extrakt av ytvattnet.

Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testsubstansen och för nedbrytningsprodukterna bör möjliggöra detektion av 1 % eller mindre av den initiala mängd som tillförts testsystemet. Kvantifieringsgränsen (LOQ) bör vara högst 10 % av den tillförda koncentrationen. För kemisk analys av många organiska ämnen och deras nedbrytningsprodukter krävs ofta att testsubstansen tillförs i relativt hög koncentration, dvs. > 100 μg/l.

1.8 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.8.1 **Utrustning**

Testet kan utföras i koniska eller cylindriska flaskor av lämplig storlek (t.ex. 0,5 eller 1,0 liter), som försluts med silikon- eller gummiproppar, eller i serumflaskor med koldioxidtäta lock (t.ex. butylgummimembran). En annan möjlighet är att utföra testet med olika flaskor och att ta ut hela flaskor, med minst två replikat, för varje provintervall (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.1). För icke-flyktiga testsubstanser som inte är radioaktivt märkta krävs inga gastäta proppar eller lock. Lösa bomullsproppar som hindrar kontaminering från luften är lämpliga (se andra stycket i avsnitt 1.8.9.1). Halvflyktiga ämnen bör testas i system av biometertyp under lätt omrörning av vattenytan. För att undvika bakteriekontamination kan behållarna eventuellt steriliseras genom upphettning eller autoklavering före användning. Dessutom används följande standardutrustning:

— Skakbord eller magnetomrörare för kontinuerlig omblandning av testflaskorna.

▼M1

— Centrifug.

— pH-mätare.

— Turbidimeter för nefelometrisk mätning av grumlighet.

— Ugn eller mikrovågsugn för torrviktsbestämning.

— Utrustning för membranfiltrering.

— Autoklav eller ugn för värmesterilisering av glas.

— Utrustning för hantering av ^{14}C-märkta ämnen.

— Utrustning för att kvantifiera ^{14}C-aktivitet i prover av lösningar från CO_2-fälla och, vid behov, från sedimentprover.

— Analysutrustning för bestämning av testsubstans (och referenssubstans) vid specifik kemisk analys (t.ex. gaskromatograf, högtrycksvätskekromatograf).

1.8.2 **Stamlösningar av testsubstansen**

Avjonat vatten används för att bereda stamlösningar av test- och referenssubstanserna (se första stycket i avsnitt 1.8.7). Det avjonade vattnet ska vara fritt från ämnen som kan vara toxiska för mikroorganismer, och får innehålla högst 1 mg löst organiskt kol (DOC) per liter (6).

1.8.3 **Insamling och transport av ytvatten**

Valet av provtagningsplats för insamling av ytvatten beror på testets syfte i varje given situation. Vid val av provtagningsplatser ska eventuella tidigare utsläpp från jordbruk, industrier och hushåll beaktas. Om det är känt att en akvatisk miljö har blivit kontaminerad med testsubstansen eller en strukturell analog till denna under de senaste fyra åren, bör miljön inte användas för insamling av testvatten, såvida inte undersökningens uttalade syfte är att undersöka nedbrytningstakten på tidigare exponerade platser. Vattnets pH och temperatur bör mätas på provtagningsplatsen. Dessutom bör provtagningsdjupet och vattenprovets utseende (t.ex. färg och grumlighet) noteras (se avsnitt 3). Syrekoncentration och/eller redoxpotential i vatten och i sedimentytan bör mätas för att påvisa att aeroba förhållanden råder, såvida inte platsens utseende och tidigare erfarenheter därifrån gör detta uppenbart. Ytvattnet bör transporteras i en väl rengjord behållare. Provets temperatur under transporten bör inte avsevärt överstiga den temperatur som råder vid testet. Kylning till 4 °C rekommenderas om transporttiden är längre än 2–3 timmar. Vattenprovet får inte frysas.

▼M1

1.8.4 **Lagring och beredning av ytvatten**

Testet bör helst påbörjas inom ett dygn efter provtagningen. Om det är nödvändigt att lagra vattnet bör lagringstiden vara så kort som möjligt. Den får under inga omständigheter överskrida fyra veckor. Vattenprovet bör hållas luftat vid 4 °C fram till användningen. Före användning bör grova partiklar avlägsnas, exempelvis med hjälp av ett nylonfilter med en maskstorlek på ca 100 μm eller ett grovt pappersfilter eller genom sedimentering.

1.8.5 **Beredning av vatten tillsatt med sediment (frivilligt)**

För testet med suspenderat sediment tillsätts ytsediment till flaskorna med naturligt vatten (filtrerat för att avlägsna grova partiklar enligt beskrivning i avsnitt 1.8.4) så att en suspension erhålls. Koncentrationen av suspenderade fasta ämnen bör ligga mellan 0,01 och 1 g/l. Ytsedimentet bör komma från samma plats som vattenprovet. Beroende på den specifika vattenmiljön kan ytsedimentet kännetecknas antingen av en hög halt av organiskt kol (2,5–7,5 %) och fin textur eller en låg halt av organiskt kol (0,5–2,5 %) och grov textur (3). Ytsedimentet kan beredas på följande sätt: Flera sedimentkärnor tas med hjälp av en genomskinlig plastslang. De övre aeroba lagren (från ytan till högst 5 mm djup) skärs av genast efter provtagningen och blandas till ett samlingsprov. Detta sedimentprov bör transporteras i en behållare med en stor innesluten luftvolym för att hålla sedimentet under aeroba förhållanden (kyl till 4 °C om transporten varar mer än 2–3 timmar). Sedimentprovet bör suspenderas i testvattnet i förhållandet 1:10 och hållas luftat vid 4 °C fram till användningen. Om det är nödvändigt att lagra sedimentet bör lagringstiden vara så kort som möjligt. Den får under inga omständigheter överskrida fyra veckor.

1.8.6 **Semikontinuerligt förfarande (frivilligt)**

En förlängd inkubering (flera månader) kan vara nödvändig om det är en lång fördröjningstid innan en betydande nedbrytning av testsubstansen kan mätas. Om detta är känt från tidigare test av ett ämne, kan testet redan från början göras med ett semikontinuerligt förfarande som möjliggör en regelbunden förnyelse av en del av testvattnet eller testsuspensionen (se tillägg 2). Alternativt kan ett normalt batchtest ändras till ett semikontinuerligt test, om ingen nedbrytning av testsubstansen kan påvisas under ca 60 dygns test med batchförfarande (se andra stycket i 1.8.8.3).

1.8.7 **Tillsats av testsubstans eller referenssubstans**

För ämnen med hög vattenlöslighet (> 1 mg/l) och låg flyktighet (Henrys konstant < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) kan en stamlösning beredas i avjonat vatten (se avsnitt 1.8.2). Stamlösning tillsätts i testbehållarna i lämplig volym så att önskad koncentration uppnås. Den volym stamlösning som tillsätts bör vara så liten som det är praktiskt möjligt (helst < 10 % av den slutliga vätskevolymen). Ett annat förfarande är att lösa testsubstansen i en större volym testvatten, vilket kan vara ett alternativ till att använda organiska lösningsmedel.

▼M1

Om det är oundvikligt bör stamlösningar av icke-flyktiga ämnen med låg vattenlöslighet beredas med hjälp av ett flyktigt organiskt lösningsmedel, men den mängd lösningsmedel som sätts till testsystemet bör inte överstiga 1 volymprocent och får inte påverka den mikrobiella aktiviteten negativt. Lösningsmedlet får inte påverka testsubstansens stabilitet i vatten. Lösningsmedlet bör strippas av till en extremt liten kvantitet så att det inte ger en betydande ökning av halten löst organiskt kol i testvattnet eller testsuspensionen. Detta bör kontrolleras genom en ämnesspecifik analys eller om möjligt genom analys av löst organiskt kol (6). Det är viktigt att den tillförda mängden lösningsmedel inte är större än absolut nödvändigt och att mängden testsubstans kan lösas i den slutliga volymen testvatten. Andra metoder att tillsätta testsubstansen i testbehållarna beskrivs i (7) och (8). Om ett organiskt lösningsmedel används för att tillsätta testsubstansen, bör kontroller med lösningsmedel blandat med testvatten (utan tillsatser) och testvatten blandat med referenssubstans behandlas på samma sätt som aktiva testbehållare med testsubstans i lösningsmedel. Syftet med kontrollerna med lösningsmedel är att undersöka lösningsmedlets eventuella negativa effekter på populationen av mikroorganismer, vilka kan påvisas genom testsubstansens nedbrytning.

1.8.8 **Testförhållanden**

1.8.8.1 *Testtemperatur*

Inkubationen bör ske i mörker (att föredra) eller i diffust ljus vid en kontrollerad (± 2 °C) temperatur som kan vara antingen temperaturen i fält eller en standardtemperatur på 20–25 °C. Temperaturen i fält kan vara antingen provets faktiska temperatur vid provtagningstillfället eller en genomsnittlig temperatur i fält på provtagningsplatsen.

1.8.8.2 *Omblandning*

Omblandning genom kontinuerlig skakning eller omrörning måste ske för att hålla partiklar och mikroorganismer i suspension. Omblandningen underlättar också syretransporten från den inneslutna luftvolymen till vätskan så att tillräckligt aeroba förhållanden kan upprätthållas. Flaskorna ställs på ett skakbord (ca 100 rpm) eller också används magnetomrörare. Omblandningen måste vara kontinuerlig. Skakning eller omrörning bör dock ske så försiktigt som möjligt samtidigt som en homogen suspension upprätthålls.

1.8.8.3 *Testets varaktighet*

Testet bör normalt inte pågå i mer än 60 dygn om inte ett semikontinuerligt förfarande med regelbunden förnyelse av testsuspensionen används (se avsnitt 1.8.6 och tillägg 2). Testperioden för batchtest kan dock utsträckas till 90 dygn om testsubstansen har börjat brytas ned under de första 60 dygnen. Nedbrytningen följs med lämpliga tidsintervall genom bestämning av kvarvarande ^{14}C-aktivitet eller utvecklad $^{14}CO_2$ (se avsnitt 1.8.9.4) och/eller genom kemisk analys (avsnitt 1.8.9.5). Inkubationstiden måste vara tillräckligt lång för att det ska vara möjligt att utvärdera nedbrytningsprocessen. Nedbrytningsgraden bör helst vara högre än 50 %. För ämnen som bryts ned långsamt måste nedbrytningsgraden vara tillräckligt hög (normalt över 20 %) för att det ska vara möjligt att uppskatta en kinetisk hastighetskonstant för nedbrytningen.

▼M1

pH och syrekoncentration i testsystemet ska mätas regelbundet om inte tidigare erfarenheter från liknande test med vatten- och sedimentprover tagna på samma plats gör sådana mätningar överflödiga. Under vissa förhållanden kan det hända att metabolism av primära substrat vid mycket högre koncentrationer i vattnet eller sedimentet ger tillräckligt stor koldioxidutveckling och syreförbrukning för att påtagligt ändra försöksbetingelserna under testet.

1.8.9 **Förfarande**

1.8.9.1 *Beredning av flaskor för pelagiskt test*

En lämplig volym testvatten förs över till testflaskorna, upp till en tredjedel av flaskvolymen och inte mindre än ca 100 ml. Även om flera flaskor används (för att kunna ta ut hela flaskor vid varje provtagningstidpunkt) är den lämpliga volymen testvatten ca 100 ml, eftersom en liten provvolym kan påverka lagfasens längd. Testsubstansen tillsätts från en stamlösning enligt beskrivning i avsnitten 1.8.2 och 1.8.7. Minst två olika koncentrationer av testsubstansen åtskilda med en faktor 5–10 bör användas för att bestämma nedbrytningens kinetik och beräkna hastighetskonstanten för nedbrytningen. Båda de valda koncentrationerna bör vara lägre än 100 µg/l och bör helst ligga i intervallet < 1–10 µg/l.

Flaskorna försluts med proppar eller lock som inte släpper genom luft och koldioxid. För icke-flyktiga testsubstanser som inte är ^{14}C-märkta är det lämpligt att använda lösa bomullspluggar som motverkar kontaminering från luften (se avsnitt 1.8.1) under förutsättning att det är känt att alla viktiga nedbrytningsprodukter är icke-flyktiga, och om indirekt bestämning av koldioxid görs (se tillägg 3).

Flaskorna inkuberas vid den valda temperaturen (se avsnitt 1.8.8.1). Prover för kemisk analys eller ^{14}C-mätning tas ut vid testets början (dvs. innan den biologiska nedbrytningen inleds, se avsnitt 1.7.1) och därefter med lämpliga tidsintervall under testets gång. Provtagningen kan göras genom att delprov (t.ex. alikvoter på 5 ml) tas från varje replikat eller genom att hela flaskor tas ut vid varje provtagningstidpunkt. Testsubstansens mineralisering kan bestämmas direkt eller indirekt (se tillägg 3). Vanligen krävs minst fem provtagningar under nedbrytningsfasen (dvs. efter lagfasens slut) för att göra en tillförlitlig bestämning av hastighetskonstanten. För vissa snabbt nedbrytbara ämnen kan det dock vara motiverat att nöja sig med tre provtagningar. För ämnen som inte bryts ned snabbt kan flera mätningar lätt göras under nedbrytningsfasen och därför bör flera datapunkter användas för uppskattning av k. Det kan inte anges något bestämt tidsschema för provtagningen, eftersom den biologiska nedbrytningshastigheten varierar. Provtagning en gång i veckan kan dock rekommenderas om nedbrytningen är långsam. Om testsubstansen är snabbt nedbrytbar, bör provtagning ske en gång per dag under de tre första dygnen och därefter varannan eller var tredje dag. Under vissa omständigheter, exempelvis med ämnen som hydrolyseras mycket snabbt, kan det vara nödvändigt att ta prover en gång i timmen. Det rekommenderas att en preliminär studie görs före testet för att bestämma lämpliga provtagningsintervall. Om prover måste finnas tillgängliga för vidare specifik analys, är det lämpligt att ta flera prover och sedan välja vilka som ska analyseras i slutet av experimentet genom att börja bakifrån, dvs. de sista proverna analyseras först (se andra stycket i avsnitt 1.8.9.5 för vägledning om provernas lagringsbeständighet).

▼**M1**

1.8.9.2 *Antal flaskor och prover*

Gör i ordning så många flaskor att det räcker till följande:

— Testflaskor: minst två flaskor för varje koncentration av testsubstansen (helst minst tre) eller flera testflaskor för varje koncentration om hela flaskor ska tas ut vid varje provtagningstidpunkt (betecknas F_T).

— Testflaskor för beräkning av massbalans: minst två flaskor för varje testkoncentration (betecknas F_M).

— Blankprov utan testsubstans: minst en flaska med blankprov innehållande endast testvatten (betecknas F_B).

— Referensprov: två flaskor med referenssubstans (t.ex. anilin eller natriumbensoat, 10 µg/l) (betecknas F_C). Syftet med referensprovet är att fastställa lägsta nivån för mikrobiell aktivitet. Om det är lämpligt kan en radioaktivt märkt referenssubstans användas, även om nedbrytningen av testsubstansen följs genom kemiska analyser.

— Sterilt kontrollprov: en eller två flaskor med steriliserat testvatten för att påvisa eventuell abiotisk nedbrytning och annan icke-biologisk förlust av testsubstansen (betecknade F_S). Den biologiska aktiviteten kan avbrytas genom autoklavering (121 °C, 20 min) av testvattnet eller genom tillsats av ett gift (t.ex. natriumazid (NaN_3) 10–20 g/l, kvicksilverklorid ($HgCl_2$) 100 mg/l eller formalin 100 mg/l) eller med hjälp av gammastrålning. Om $HgCl_2$ används bör det behandlas som giftigt avfall. För vatten med stor tillsats av sediment är det inte lätt att åstadkomma sterila förhållanden. I detta fall rekommenderas upprepad autoklavering (t.ex. tre gånger). Tänk på att autoklavering kan leda till att sedimentets sorptionsegenskaper ändras.

— Kontroller med lösningsmedel, innehållande testvatten och testvatten med referenssubstans: två flaskor behandlade med samma mängd lösningsmedel och med samma förfarande som används för att tillsätta testsubstansen. Syftet är att påvisa eventuella negativa effekter av lösningsmedlet genom att bestämma nedbrytningen av referenssubstansen.

Vid testets utformning bör försöksledaren beakta den relativa betydelsen av flera replikat gentemot ett ökat antal provtagningstidpunkter. Det exakta antalet flaskor som behövs beror på vilken metod som används för att mäta nedbrytningen (se tredje stycket i avsnitt 1.8.9.1, avsnitt 1.8.9.4 och tillägg 3).

▼M1

Två delprov (t.ex. alikvoter på 5 ml) bör tas ut från varje flaska vid varje provtagningstidpunkt. Om flera flaskor används för att möjliggöra uttag av hela flaskor, bör minst två flaskor offras vid varje provtagningstidpunkt (se första stycket i avsnitt 1.8.9.1).

1.8.9.3 *Beredning av flaskor för suspenderat sediment-test [frivilligt]*

Lämpliga volymer av testvatten och sediment tillsätts i testkärlen (se avsnitt 1.8.5). Beredningen av flaskor för suspenderat sediment sker på samma sätt som för det pelagiska testet (se avsnitten 1.8.9.1 och 1.8.9.2). Använd helst serumflaskor eller flaskor av liknande form. De förslutna flaskorna placeras horisontellt i en skakapparat. Öppna flaskor för icke-flyktiga ämnen som inte är ^{14}C-märkta bör givetvis placeras upprätt. I detta fall rekommenderas magnetomrörning med glasbelagda magnetstavar. Vid behov luftas flaskorna för att upprätthålla lämpliga aeroba förhållanden.

1.8.9.4 *Radiokemiska bestämningar*

Den utvecklade $^{14}CO_2$ mäts indirekt och direkt (se tillägg 3). $^{14}CO_2$ bestäms indirekt genom skillnaden mellan den initiala ^{14}C-aktiviteten i testvattnet eller suspensionen och den totala kvarvarande aktiviteten vid provtagningstidpunkten mätt efter det att provet surgjorts till pH 2–3 och CO_2 har strippats av. Därigenom avlägsnas organiskt kol och den kvarvarande aktivitet som uppmäts kommer från organiskt material. Indirekt bestämning av $^{14}CO_2$ bör inte ske om viktiga flyktiga nedbrytningsprodukter bildas under testsubstansens omvandling (se tillägg 3). Om möjligt bör $^{14}CO_2$-utvecklingen mätas direkt (se tillägg 3) i minst en flaska vid varje provtagningstidpunkt. Detta förfarande gör det möjligt att kontrollera både massbalans och biologisk nedbrytning, men det kan bara användas vid test som görs med förslutna flaskor.

Om $^{14}CO_2$-utvecklingen mäts direkt under testet, bör flera flaskor göras i ordning för detta syfte vid testets början. Direkt bestämning av $^{14}CO_2$ rekommenderas om viktiga flyktiga nedbrytningsprodukter bildas under testsubstansens omvandling. Vid varje mättillfälle surgörs de extra testflaskorna till pH 2–3 och $^{14}CO_2$ samlas in i ett internt eller externt absorptionsmedel (se tillägg 3).

Eventuellt kan koncentrationerna av ^{14}C-märkt testsubstans och viktiga nedbrytningsprodukter bestämmas med hjälp av radiokromatografi (t.ex. tunnskiktskromatografi, RAD-TLC) eller HPLC med radiokemisk detektion.

Eventuellt kan också fasfördelningen av den kvarvarande radioaktiviteten (se tillägg 1) och rester av testsubstansen och nedbrytningsprodukter bestämmas.

▼M1

Vid testets slut bör massbalansen bestämmas genom direkt $^{14}CO_2$-mätning i separata testflaskor från vilka inga prover har tagits under testets gång (se tillägg 3).

1.8.9.5 *Specifik kemisk analys*

Om det finns en känslig specifik analysmetod kan den primära biologiska nedbrytningen uppskattas genom mätning av den totala restkoncentrationen av testsubstansen i stället för genom radioaktiv märkning. Om en radioaktivt märkt testsubstans används (för att mäta total mineralisering), kan specifika kemiska analyser göras parallellt för att få värdefull kompletterande information och kontrollera förfarandet. Specifika kemiska analyser kan också användas för att mäta nedbrytningsprodukter som bildas under testsubstansens nedbrytning, och detta rekommenderas för ämnen som mineraliseras med halveringstider över 60 dygn. Testsubstansens och nedbrytningsprodukternas koncentration vid varje provtagningstidpunkt bör mätas och rapporteras (som koncentration och som procentandel av den tillförda mängden). Detekterade nedbrytningsprodukter, som vid en viss provtagningstidpunkt har en koncentration ≥ 10 % av den tillförda koncentrationen, bör generellt sett identifieras om det inte finns rimlig anledning att avstå. Nedbrytningsprodukter vars koncentrationer kontinuerligt ökar under studien bör helst också identifieras, även om koncentrationerna inte överskrider den ovan nämnda gränsen, eftersom ökningen kan tyda på svårnedbrytbarhet. Analys av nedbrytningsprodukter i sterila kontrollprov bör övervägas om snabb abiotisk omvandling av testsubstansen (t.ex. genom hydrolys) bedöms vara möjlig. Behovet av att kvantifiera och identifiera nedbrytningsprodukter bör bedömas från fall till fall, med motiveringar angivna i rapporten. Metoder som innebär extraktion med organiska lösningsmedel bör användas i enlighet med de riktlinjer som anges för respektive analysförfarande.

Alla prover bör förvaras vid 2–4 °C och lufttätt om analysen utförs inom 24 timmar (att föredra). För längre lagring bör proverna frysas till lägre temperatur än –18 °C eller behandlas med ett kemiskt konserveringsmedel. Surgörning rekommenderas inte som metod att konservera proverna, eftersom surgjorda prover kan vara instabila. Om proverna inte analyseras inom 24 timmar och lagras under längre tid, bör lagringsbeständigheten undersökas för att visa att de intressanta kemikalierna är stabila om de lagras vid lägre temperatur än –18 °C eller i konserverad form. Om analysmetoden innebär extraktion med lösningsmedel eller extraktion med fast fas (SPE), bör extraktionen göras omedelbart efter provtagningen eller efter förvaring av provet i kyla i högst 24 timmar.

Beroende på analysmetodens känslighet, kan det vara nödvändigt med större provvolymer än de som anges i punkt 1.8.1. Testet kan lätt utföras med testvolymer på en liter i flaskor med en volym på 2–3 liter, vilket gör det möjligt att ta ut prover på ca 100 ml.

▼M1

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

2.1.1 **Diagram**

Provtagningstiderna avrundas till hela timmar (om inte ämnet bryts ned kraftigt inom minuter eller timmar) men inte till hela dygn. Testsubstansens kvarvarande aktivitet (för ^{14}C-märkta ämnen) eller restkoncentration (för omärkta ämnen) avsätts mot tiden både i ett linjärt och i ett halvlogaritmiskt diagram (se figur 1a och 1b). Om nedbrytning har skett, jämförs resultaten från flaskorna F_T med dem från flaskorna F_S. Om medelvärdena av resultaten från flaskorna med testsubstans (F_T) och de sterila flaskorna (F_S) avviker med mindre än 10 %, kan det antas att den iakttagna nedbrytningen huvudsakligen är abiotisk. Om nedbrytningen i flaskorna F_S är lägre kan siffrorna användas för att korrigera de siffror som erhålls med flaskorna F_T (genom subtraktion) för att uppskatta den biologiska nedbrytningen. Om frivilliga analyser görs av viktiga nedbrytningsprodukter, bör diagram över deras bildning och minskning redovisas utöver diagrammet över testsubstansens minskning.

Uppskatta lagfasens längd t_L utifrån nedbrytningskurvan (halvlogaritmiskt diagram) genom att extrapolera dess linjära del till noll procents nedbrytning eller genom att bestämma tiden för ca 10 % nedbrytning (se figur 1a och 1b). Utifrån det halvlogaritmiska diagrammet bestäms hastighetskonstanten k för första ordningens reaktion, och dess standardfel bestäms genom linjär regression av ln (kvarvarande ^{14}C-aktivitet eller testsubstansens restkoncentration) mot tiden. Särskilt när det gäller ^{14}C-mätningar bör man tänka på att bara använda data som tillhör den första linjära delen av kurvan efter avslutad lagfas, och hellre välja några få representativa data än flera mer osäkra data. En del av osäkerheten beror här på fel förknippade med den rekommenderade direkta användningen av uppmätt kvarvarande ^{14}C-aktivitet (se nedan). Det kan ibland vara lämpligt att beräkna två olika hastighetskonstanter, om nedbrytningen sker i två faser. I så fall definieras två skilda faser på nedbrytningskurvan. Beräkning av hastighetskonstanten k och halveringstiden $t_{½} = \ln 2/k$ bör göras för var och en av de enskilda flaskor som är replikat, om delprov tas ut från samma flaska, eller med hjälp av medelvärden, om hela flaskor tas ut vid varje provtagningstidpunkt (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.2). Om det förstnämnda förfarandet följs bör hastighetskonstanten och halveringstiden rapporteras dels för var och en av de enskilda flaskor som är replikat, dels som medelvärde och medelfel. Om höga koncentrationer av testsubstansen har använts, kan nedbrytningskurvan avvika avsevärt från en rät linje (halvlogaritmiskt diagram) och det är möjligt att första ordningens reaktionskinetik inte är giltig. Bestämning av halveringstid har då ingen mening. För ett begränsat dataintervall kan dock pseudo-första ordningens kinetik tillämpas och nedbrytningens halveringstid DT_{50} (tiden för att nå 50 % nedbrytning) uppskattas. Man måste dock komma ihåg att nedbrytningens förlopp utanför det valda dataintervallet inte kan förutsägas med hjälp av DT_{50} som endast är en deskriptor för en given uppsättning data. Det finns gott om analytiska verktyg som underlättar statistiska beräkningar och anpassning av kurvor, och användning av sådana program rekommenderas.

▼M1

Om specifika kemiska analyser görs, uppskattas hastighetskonstanter och halveringstider för primär nedbrytning på det sätt som ovan beskrivits för total mineralisering. Om den primära nedbrytningen är den begränsande processen, kan i vissa fall datapunkter från hela nedbrytningsförloppet användas. Detta för att mätningarna är direkta till skillnad från mätningar av ^{14}C-aktivitet.

Om ^{14}C-märkta ämnen används, bör massbalans uttryckas i procent av den tillförda initiala koncentrationen, åtminstone vid testets slut.

2.1.2 **Kvarvarande aktivitet**

När en ^{14}C-märkt del av ett organiskt ämne bryts ned biologiskt, omvandlas större delen av ^{14}C till $^{14}CO_2$, medan en annan del används för uppbyggnad av biomassa och/eller syntes av extracellulära metaboliter. En fullständig biologisk nedbrytning av ett ämne innebär därför inte en hundraprocentig omvandling av dess kol till $^{14}CO_2$. Det ^{14}C som byggs in i produkter som bildas genom biosyntes frigörs sedan långsamt som $^{14}CO_2$ genom s.k. sekundär mineralisering. Diagram över kvarvarande ^{14}C-aktivitet (mätt efter det att CO_2 har strippats av) eller över $^{14}CO_2$-utvecklingen avsatt mot tiden, kommer därför att uppvisa en ”svans” efter avslutad nedbrytning. Detta försvårar en kinetisk tolkning av data, och av denna anledning bör i normala fall endast den första delen av kurvan (efter avslutad lagfas och innan ca 50 % nedbrytning har uppnåtts) användas för att uppskatta hastighetskonstanten för nedbrytningen. Om testsubstansen bryts ned är den totala kvarvarande ^{14}C-aktiviteten alltid högre än den ^{14}C-aktivitet som beror på återstående onedbruten testsubstans. Om testsubstansen bryts ned genom en första ordningens reaktion och en konstant andel α mineraliseras till CO_2, kommer den initiala lutningen på den kurva som visar hur ^{14}C avtar (totalt organiskt ^{14}C avsatt mot tiden) att vara α gånger lutningen för testsubstansens koncentration (eller för att vara noggrann, den del av testsubstansen som är märkt med ^{14}C). Om okorrigerade mätvärden av den totala ^{14}C-aktiviteten används, kommer därför den beräknade hastighetskonstanten för nedbrytningen att vara för låg. Metoder för att uppskatta testsubstansens koncentration utifrån uppmätt radiokemisk aktivitet på grundval av olika förenklande antaganden har beskrivits i litteraturen (2) (9) (10) (11). Dessa metoder är lättast att använda för snabbt nedbrytbara ämnen.

2.2 TOLKNING AV RESULTAT

Om hastighetskonstanten k konstateras vara oberoende av den tillförda koncentrationen (dvs. om k har ungefär samma värde vid olika koncentrationer av testsubstansen) kan det antas att första ordningens hastighetskonstant är representativ för rådande testförhållanden, dvs. testsubstans, vattenprov och testtemperatur. I vilken utsträckning resultaten kan generaliseras eller extrapoleras till andra system måste utvärderas genom en expertbedömning. Om en hög koncentration av testsubstansen används och nedbrytningen därför inte följer första ordningens kinetik, kan data inte användas för direkt uppskattning av första ordningens hastighetskonstant eller motsvarande halveringstid. Data som erhålls från ett test med en hög koncentration av testsubstansen kan dock ändå vara användbara för att uppskatta den totala mineraliseringsgraden och för att påvisa och kvantifiera nedbrytningsprodukter.

▼M1

Om hastigheterna för andra förlustprocesser än biologisk nedbrytning är kända (t.ex. hydrolys eller avdunstning) kan dessa dras av från den nettoförlusthastighet som observerats under testet för att ge en ungefärlig uppskattning av den biologiska nedbrytningshastigheten. Data över hydrolys kan exempelvis erhållas från det sterila kontrollprovet eller från parallelltest med en högre koncentration av testsubstansen.

Indirekt och direkt bestämning av $^{14}CO_2$ (avsnitt 1.8.9.4 och tillägg 3) kan bara användas för att mäta storleken av testsubstansens mineralisering till CO_2. Radiokromatografi (RAD-TLC) eller HPLC kan användas för att analysera koncentrationerna av ^{14}C-märkt testsubstans och bildning av viktiga nedbrytningsprodukter (tredje stycket i avsnitt 1.8.9.4). För att kunna göra en direkt uppskattning av halveringstiden är det nödvändigt att inga viktiga nedbrytningsprodukter (definierat som ≥ 10 % av den tillförda mängden testsubstans) är närvarande. Om sådana viktiga nedbrytningsprodukter är närvarande, krävs en noggrann utvärdering av data. Detta kan innebära upprepade test och/eller identifiering av nedbrytningsprodukter (se första stycket i avsnitt 1.8.9.5) om inte nedbrytningsprodukternas öde kan bedömas på ett rimligt sätt erfarenhetsmässigt (t.ex. med hjälp av information om reaktionsvägen för nedbrytningen). Eftersom den proportion av testsubstansens kol som omvandlas till CO_2 varierar (till stor del beroende på koncentrationen av testsubstans och andra närvarande substrat, testförhållandena och mikroorganismsamhället), möjliggör detta test inte en direkt uppskattning av fullständig biologisk nedbrytning som i ett test av eliminering av löst organiskt kol, men resultatet liknar det som erhålls med ett respirometertest. Mineraliseringsgraden kommer alltså att vara lägre än eller lika med den lägsta nivån av slutlig biologisk nedbrytning. För att få en mer fullständig bild av den slutliga biologiska nedbrytningen (mineralisering och inkorporering i biomassa), bör analysen av fasfördelningen av ^{14}C utföras i slutet av testet (se tillägg 1). Det ^{14}C som ingår i partikelfasen utgörs av ^{14}C inkorporerat i bakteriebiomassa och ^{14}C sorberat till organiska partiklar.

2.3 TESTETS VALIDITET

Om referenssubstansen inte bryts ned inom det förväntade tidsintervallet (för anilin och natriumbensoat vanligen mindre än två veckor), kan testets validitet betvivlas och måste verifieras ytterligare, eller också görs testet om med ett nytt vattenprov. I en ISO-interkalibrering av metoden, där sju laboratorier från olika delar av Europa deltog, låg de anpassade hastighetskonstanterna för nedbrytning av anilin i intervallet 0,3–1,7 $dygn^{-1}$ med ett medelvärde på 0,8 $dygn^{-1}$ vid 20 °C och ett standardfel på 0,4 $dygn^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 dygn). Lagfasen varade normalt mellan 1 och 7 dygn. De undersökta vattnen rapporterades ha en bakteriebiomassa motsvarande 10^3–10^4 kolonibildande enheter (CFU) per ml. Nedbrytningshastigheterna i näringsrika mellaneuropeiska vatten var högre än i nordiska näringsfattiga vatten, vilket kan bero på olikheten i näringsstatus eller tidigare exponering för kemiska ämnen.

Det totala utbytet (massbalans) vid experimentets slut bör ligga mellan 90 % och 110 % för radioaktivt märkta ämnen, medan det initiala utbytet av experimentets början bör ligga mellan 70 % och 110 % för omärkta ämnen. Dessa intervall bör dock endast ses som mål och bör inte användas som kriterier för huruvida testet ska accepteras.

▼M1

3. **TESTRAPPORT**

Typen av undersökning, dvs. pelagiskt test eller suspenderat sediment-test, ska klart anges i testrapporten, som också ska innehålla åtminstone följande uppgifter:

Testsubstans och referenssubstans(er):

— Trivialnamn, kemiska namn (IUPAC-namn och/eller CAS-namn rekommenderas), CAS-nummer, strukturformler (med angivelse av positionen för ^{14}C om radioaktivt märkta ämnen används) samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos testsubstans och referenssubstans (se avsnitten 1.5 och 1.6).

— Kemiska namn, CAS-nummer, strukturformler (med angivelse av positionen för ^{14}C om radioaktivt märkta ämnen används) samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos ämnen som används som standard för identifiering och kvantifiering av nedbrytningsprodukter.

— Test- och referenssubstansers renhet och eventuella föroreningar.

— Radiokemisk renhet hos den märkta kemikalien och dess specifika aktivitet (i tillämpliga fall).

Ytvatten:

För de vattenprover som tas ska minst följande uppgifter anges:

— Läge och beskrivning av provtagningsstället, om möjligt även dess föroreningshistoria.

— Datum och tid för provtagning.

— Näringsämnen (total-N, ammonium, nitrit, nitrat, total-P, löst ortofosfat).

— Provtagningsdjup.

— Provets utseende (t.ex. färg och grumlighet).

— DOC och TOC.

— BOD.

— Temperatur och pH på provtagningsplatsen vid provtagningstillfället.

— Syrehalt eller redoxpotential (obligatoriskt endast om det inte är uppenbart att aeroba förhållanden råder).

— Salthalt eller konduktivitet (om det är fråga om saltvatten eller bräckt vatten).

— Suspenderade fasta ämnen (om provet är grumligt).

— Eventuellt annan relevant information om provtagningsplatsen vid provtagningstillfället (t.ex. aktuella eller historiska uppgifter om flödeshastighet i vattendrag eller havsströmmar, större utsläpp i närheten och utsläppstyp, väderförhållanden före provtagningstillfället).

Frivilligt anges följande:

— Mikrobiell biomassa (t.ex. direkt räkning med akridinorange eller kolonibildande enheter).

▼M1

— Oorganiskt kol.

— Klorofyll-a-koncentration som ett specifikt mått på algbiomassa.

Dessutom bör följande uppgifter om sediment lämnas om test med suspenderat sediment görs:

— På vilket djup sedimentprovet tagits.

— Sedimentets utseende (t.ex. färgat, lerigt, dyigt eller sandigt).

— Textur (t.ex. % grovsand, finsand, mjäla och lera).

— Torrvikt av suspenderade fasta ämnen i g/l, TOC-koncentration eller glödförlust som ett mått på innehåll av organiskt material.

— pH.

— Syrehalt eller redoxpotential (obligatoriskt endast om det inte är uppenbart att aeroba förhållanden råder.

Testförhållanden:

— Tid mellan provtagning och användning i laboratorietest, lagring och förbehandling av provet, datum då undersökningen gjordes.

— Tillförd mängd testsubstans, testkoncentration och referenssubstans.

— Metod för tillförsel av testsubstans med uppgift om eventuella lösningsmedel.

— Använd volym ytvatten och sediment (i tillämpliga fall) samt provvolym som tagits ut för analys vid varje provtagningstidpunkt.

— Beskrivning av det använda testsystemet.

Om inkubationen inte sker i mörker, information om ”diffusa ljusförhållanden”:

— Information om metod(er) som används för att bereda sterila kontrollprover (t.ex. temperatur, tid och antal autoklaveringar).

— Inkubationstemperatur.

— Information om analysmetoder och metoder som används för radiokemiska mätningar, massbalanskontroll och mätningar av fasfördelning (om detta genomförs).

— Antal replikat.

Resultat:

— Procentuellt utbyte (se avsnitt 1.7.1).

— Repeterbarhet och känslighet hos de analysmetoder som används samt detektionsgräns och kvantifieringsgräns (se avsnitt 1.7.2).

▼M1

— Alla mätdata (även provtagningstidpunkter) och beräknade värden i tabellform och nedbrytningskurvor. För varje testkoncentration och för varje flaska som är replikat rapporteras den linjära korrelationskoefficienten för den logaritmiska kurvans lutning, uppskattad lagfas och första eller pseudo-första ordningens hastighetskonstant (om möjligt) samt motsvarande halveringstid för nedbrytningen (eller halveringstiden t_{50}).

— Relevanta värden rapporteras som medelvärden av de resultat som observeras i enskilda replikat, t.ex. lagfasens längd, hastighetskonstanten och halveringstiden för nedbrytningen (eller t_{50}).

— Systemet kategoriseras som antingen ej adapterat eller adapterat med utgångspunkt från nedbrytningskurvans utseende och eventuell påverkan från testkoncentrationen.

— Resultaten av den slutliga kontrollen av massbalans och av mätningar av fasfördelning (i tillämpliga fall).

— Andelen mineraliserat ^{14}C och, om specifika analyser görs, slutlig grad av primär nedbrytning.

— Identifiering, molaritet och procentandel av tillförda och viktiga nedbrytningsprodukter (se första stycket i avsnitt 1.8.9.5), i tillämpliga fall.

— Föreslagen reaktionsväg för omvandlingen, i tillämpliga fall.

— Diskussion av resultaten.

4. **LITTERATUR**

1. OECD TG 309 (2004). Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592–1 (1999). Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol. 47, 394–401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

11. ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Tillägg 1

Fasfördelning av ^{14}C

För att kontrollera förfarandet bör de rutinmässiga mätningarna av kvarvarande total ^{14}C-aktivitet i organiskt kol (TOA) kompletteras med mätningar av massbalans, inklusive en direkt bestämning av utvecklad $^{14}CO_2$ efter uppfångning i ett absorptionsmedel (se tillägg 3). En positiv bildning av $^{14}CO_2$ är i sig själv ett direkt bevis på biologisk nedbrytning, i motsats till abiotisk nedbrytning och andra förlustmekanismer, exempelvis avdunstning och sorption. Ytterligare värdefull information om den biologiska nedbrytningsprocessen kan erhållas genom mätningar av den totala ^{14}C-aktivitetens fördelning mellan löst tillstånd (^{14}C-aktivitet i löst organiskt kol, DOA) och partikeltillstånd (^{14}C-aktivitet i partikulärt organiskt kol, POA) efter separation av partiklar genom membranfiltrering eller centrifugering. POA utgörs av testsubstans sorberad på den mikrobiella biomassan och på andra partiklar utöver det kol i testsubstansen som har använts för syntes av nytt cellulärt material och därigenom inkorporerats i den partikulära biomassafraktionen. Bildningen av löst organiskt ^{14}C-material kan uppskattas som DOA vid slutet av den biologiska nedbrytningen (platå på kurvan med nedbrytning avsatt mot tiden).

Fasfördelningen av kvarvarande ^{14}C i utvalda prover uppskattas genom filtrering av prov på ett membranfilter med porstorleken 0,22 μm eller 0,45 μm av ett material som inte adsorberar betydande mängder av testsubstansen (polykarbonatfilter kan vara lämpliga). Om testsubstansens sorption på filtret inte är försumbar (kontrolleras före experimentet), kan höghastighetscentrifugering (2 000 g i 10 minuter) användas i stället för filtrering.

Filtratet eller centrifugatet behandlas på det sätt som beskrivs i tillägg 3 för ofiltrerade prover. Lös upp membranfiltret i en lämplig scintillationsvätska och räkna på vanligt sätt. Normalt används metoden med extern standardkvot för att korrigera för quenching, eller också behandlas provet med ett oxidationsmedel. Om centrifugering har använts, resuspenderas den pellet som bildats av partikelfraktionen i 1–2 ml destillerat vatten och överförs till en scintillationsflaska. Därefter sköljs två gånger med 1 ml destillerat vatten och sköljvattnet överförs till flaskan. Vid behov kan suspensionen läggas i en gel för vätske-scintillationsräkning.

▼M1

Tillägg 2

Semikontinuerligt förfarande

En förlängd inkubering upp till flera månader kan krävas för att få en tillräcklig nedbrytning av svårnedbrytbara ämnen. Testet bör normalt inte pågå i mer än 60 dygn om inte det ursprungliga vattenprovets egenskaper bibehålls genom förnyelse av testsuspensionen. Testperioden kan dock utsträckas till högst 90 dygn utan förnyelse av testsuspensionen om testsubstansen har börjat brytas ned under de första 60 dygnen.

Om inkubationen varar lång tid kan mikroorganismsamhällets diversitet minska på grund av olika förlustmekanismer och på grund av att viktiga näringsämnen och primära kolsubstrat i vattenprovet förbrukas. Därför rekommenderas att ett semikontinuerligt test används för att på ett tillfredsställande sätt bestämma nedbrytningshastigheten för ämnen som bryts ned långsamt. Testet bör redan från början göras med ett semikontinuerligt förfarande om, på grundval av tidigare erfarenhet, en inkubationstid på tre månader bedöms vara nödvändig för att uppnå 20 % nedbrytning av ämnet. Alternativt kan ett normalt batchtest ändras till ett semikontinuerligt test, om ingen nedbrytning av testsubstansen kan påvisas under ca 60 dygns test med batchförfarande. Det semikontinuerliga förfarandet kan avbrytas och testet fortsättas som ett batchexperiment när en betydande nedbrytning har registrerats (t.ex. > 20 %).

I det semikontinuerliga testet ersätts varannan vecka ca en tredjedel av testsuspensionen med nytaget vatten med tillsats av testsubstans till initial koncentration. Även sediment tillsätts det nya vattnet till initial koncentration (mellan 0,01 och 1 g/l) om det frivilliga suspenderat sediment-testet görs. Vid utförande av test med suspenderat fast sediment är det viktigt att ett helt suspenderat system upprätthålls även vid förnyelse av vatten, och att uppehållstiden är identisk för fasta ämnen och vatten. I annat fall kan den avsedda likheten med ett homogent vattensystem utan bestämda faser utebli. Av dessa skäl rekommenderas att den initiala koncentrationen av suspenderat sediment ligger i den lägre delen av det angivna intervallet när det semikontinuerliga förfarandet används.

Den föreskrivna tillsatsen av testsubstans innebär att den initiala koncentrationen inte överskrids genom den partiella förnyelsen av testsuspensionen och därigenom undviks den adaptation som ofta ses vid höga koncentrationer av testsubstansen. Eftersom förfarandet innebär både en förnyad ympning och en kompensation av förbrukade näringsämnen och primära substrat, återställs den ursprungliga mikrobiella diversiteten, och testet kan i princip pågå i oändlighet. När det semikontinuerliga förfarandet används är det viktigt att notera att den kvarvarande koncentrationen av testsubstansen måste korrigeras för de mängder testsubstans som tillförs och avlägsnas vid varje förnyelse. För lågsorberande ämnen kan testsubstansens totala koncentration antas vara lika med den lösta koncentrationen. Sorptionen är obetydlig (< 5 %) under angivna förhållanden (0,1–1 g fasta ämnen/l) för ämnen för vilka log K_{ow} < 3 (gäller för neutrala, lipofila föreningar). Detta illustreras av följande beräkningsexempel: 0,1 g/l av fasta ämnen motsvarar ungefär 10 mg kol per liter (andelen kol f_C = 0,01). Antag att

Log K_{ow} (för testsubstansen) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Fördelningskoefficienten $K_d = f_C \times K_{oc}$

Då är den lösta delen av den totala koncentrationen (C-vatten (C_w)/C-total (C_t):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Tillägg 3

Bestämning av $^{14}CO_2$

Indirekt $^{14}CO_2$-bestämning

För rutinmässiga mätningar är i normala fall den indirekta metoden den minst tidskrävande och noggrannaste metoden om testsubstansen är icke-flyktig och inte omvandlas till flyktiga nedbrytningsprodukter. Ofiltrerade prover på t.ex. 5 ml förs över till scintillationsflaskor. Lämplig aktivitet i proverna är 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq) initialt, med en lägsta initial aktivitet på ca 1 000 dpm. CO_2 strippas av efter surgörning till pH 2–3 med 1–2 droppar koncentrerad H_3PO_4 eller HCl. CO_2 kan strippas av genom bubbling med luft i ca ½–1 timme. Alternativt kan flaskorna skakas kraftigt i 1–2 timmar (t.ex. på ett skakbord för mikrotiterplattor) eller mer försiktigt över natten. Effektiviteten vid strippning av CO_2 måste kontrolleras (genom att tiden för luftning eller skakning förlängs). Därefter tillsätts en scintillationsvätska som är lämplig för att räkna vattenprov, provet homogeniseras med en virvelblandare och radioaktiviteten bestäms genom vätske-scintillationsräkning, med avdrag för den bakgrundsaktivitet som uppmäts i blankproverna (F_B). Om testvattnet inte är kraftigt färgat och inte har en hög partikelkoncentration, uppvisar proverna normalt sett en enhetlig quenching, och det räcker då att korrigera för quenching med hjälp av en extern standard. Om testvattnet är kraftigt färgat kan det vara nödvändigt att korrigera för quenching genom tillsats av en intern standard. Om partikelkoncentrationen är hög kan det vara omöjligt att åstadkomma en homogen lösning eller gel, eller också kan det vara stor variation i quenching mellan olika prover. I så fall kan den nedan beskrivna räknemetoden för testslam användas. Om testet utförs som ett suspenderat sediment-test, kan $^{14}CO_2$ mätning göras indirekt genom att ett homogent 10 ml prov av testvatten/suspension tas ut och faserna separeras genom centrifugering vid lämplig hastighet (t.ex. 40 000 m/s^2 i 15 minuter). Vattenfasen behandlas sedan enligt beskrivningen nedan. ^{14}C-aktiviteten i partikelfasen (POA) bestäms genom att sedimentet resuspenderas i en liten volym destillerat vatten, överförs till scintillationsflaskor och tillsätts scintillationsvätska så att en gel bildas (det finns särskilda scintillationsvätskor för det ändamålet). Beroende på partiklarnas karaktär (t.ex. deras innehåll av organiskt material) kan det vara lämpligt att låta provet sönderdelas över natten med ett vävnadsupplösande ämne och sedan homogeniseras med en virvelblandare före tillsats av scintillationsvätska. Alternativt kan POA bestämmas genom förbränning i syreöverskott med hjälp av en provoxiderare. Vid räkning bör interna standarder alltid ingå, och det kan vara nödvändigt att korrigera för quenching genom tillsats av en intern standard i varje enskilt prov.

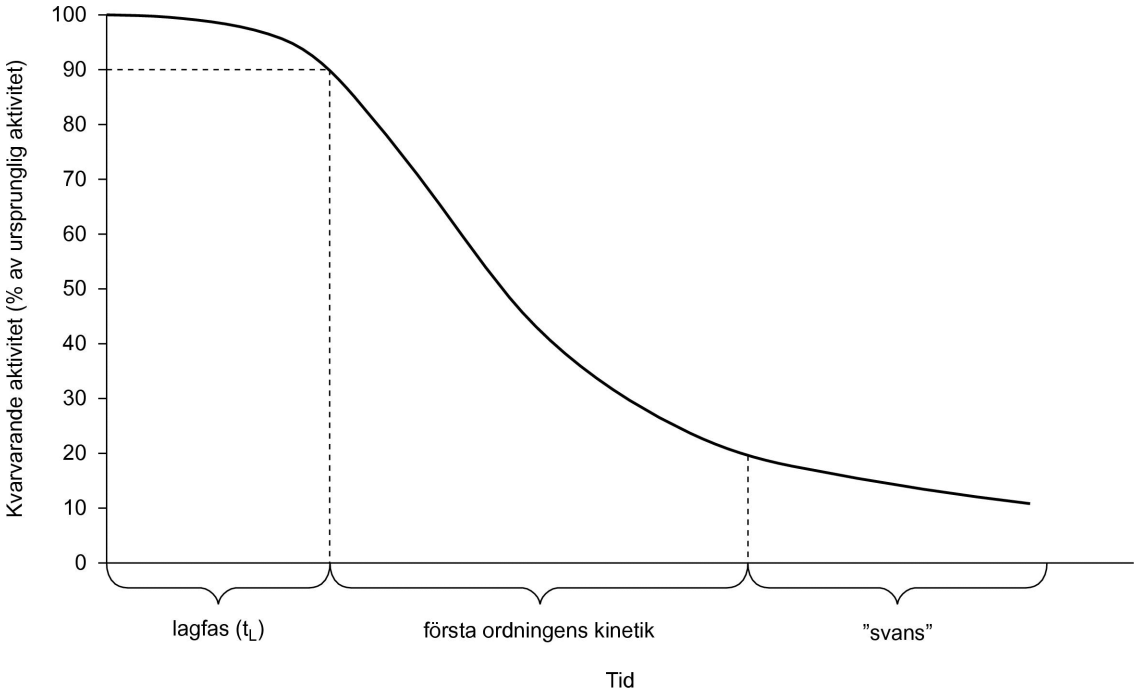
Direkt $^{14}CO_2$-bestämning

Om den utvecklade $^{14}CO_2$ mäts direkt bör detta göras genom att flera flaskor görs i ordning vid testets början, och testflaskorna provtas vid varje mättidpunkt genom att surgöras till pH 2–3 och $^{14}CO_2$ tas upp i ett internt (placerat i varje flaska vid testets början) eller externt absorptionsmedel. Som absorptionsmedel kan användas antingen alkali (t.ex. 1 N NaOH-lösning eller en NaOH-pellet), etanolamin eller ett etanolaminbaserat absorptionsmedel eller kommersiellt tillgängliga absorptionsmedel. För direkt mätning av $^{14}CO_2$, bör flaskorna vara förslutna med exempelvis butylgummimembran.

▼**M1**

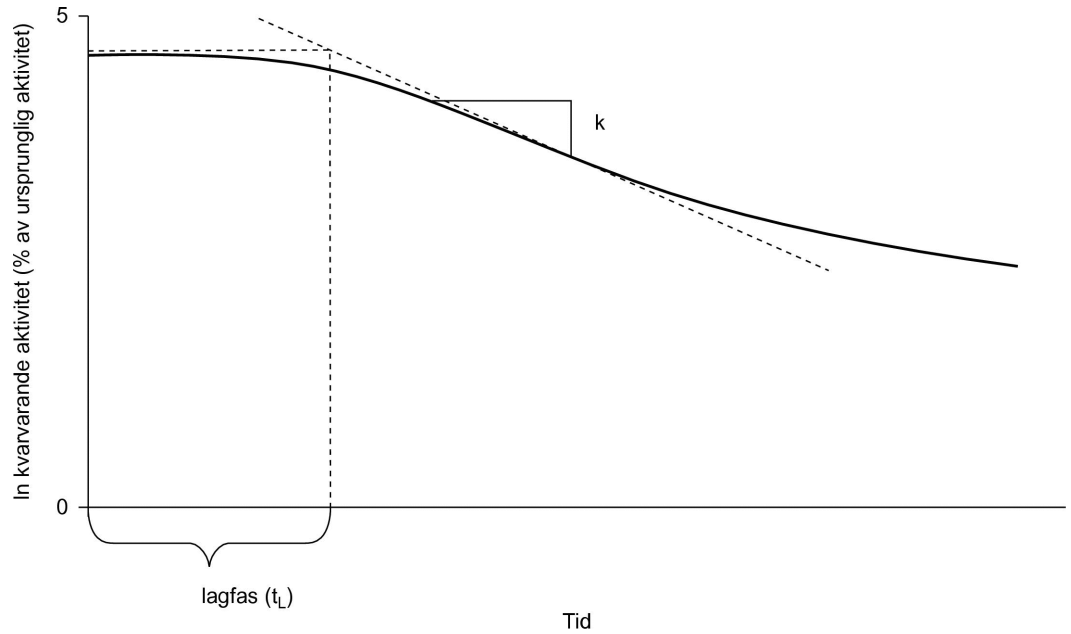
Figur 1a

Exempel på ett aritmetiskt diagram över data (kvarvarande aktivitet avsatt mot tid)



Figur 1b

Exempel på ett halvlogaritmiskt diagram över data (ln kvarvarande aktivitet avsatt mot tid)



▼M1

C.26. BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS FLYTBLADSVÄXTEN *LEMNA* SP. (ANDMAT)

1. METOD

Metoden motsvarar OECD TG 221 (2006) (1). Det finns ett brett samförstånd hos EU:s myndigheter om att *Lemna*-testet är ett lämpligt alternativ till ett algtest för kraftigt färgade substanser (2)(3).

1.1 INLEDNING

Metoden är avsedd för bestämning av substansers toxicitet mätt som tillväxthämning hos sötvattensväxter av släktet *Lemna* (andmat). Metoden bygger på existerande standardmetoder (4, 5, 6, 7, 8 och 9) som har modifierats enligt nya forskningsrön och genom samråd, i regel mellan experter. Den föreslagna metoden har validerats genom ett internationellt ringtest, dvs. en provningsjämförelse mellan olika laboratorier i världen (10).

Metoden används för toxicitetstest med hjälp av *Lemna gibba* och *Lemna minor*. Båda dessa arter har studerats ingående och har använts i test med de standardmetoder som det hänvisas till ovan. Taxonomin för *Lemna* spp. är komplicerad på grund av mångfalden fenotyper. Hos *Lemna* kan responsen på toxiska substanser variera på grund av genetiska skillnader, men för närvarande saknas det tillräckligt med underlag om dessa orsaker för att man ska kunna rekommendera en bestämd klon för användning med den aktuella metoden. Observera att testet inte utförs axeniskt (dvs. med enarts-kultur fri från infektion av mikroorganismer), men åtgärder vidtas i skeden under testets gång för att hålla kontamination från andra organismer så låg som möjligt.

Dokumentet innehåller ingående beskrivningar av semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösningar), statiskt testförfarande (utan förnyelse av testlösningar) och genomflödestest (med kontinuerligt byte av testlösning). Beroende på lagstadgade krav och syftet med testet kan semistatiskt testförfarande eller genomflödestest komma i fråga i vissa fall, t.ex. för substanser som snabbt försvinner ur lösningen genom avdunstning, ljusnedbrytning, utfällning eller biologisk nedbrytning. Närmare riktlinjer finns i (11).

1.2 DEFINITIONER

I denna metodbeskrivning används följande definitioner och förkortningar med de betydelser som här anges:

biomassa: torrvikt av levande materia i en population. I detta test mäts vanligtvis ersättningsmått för vikten, som t.ex. antalet fronder (bladliknande del av planta) eller deras totala area. Termen ”biomassa” hänför sig således även till dessa ersättningsmått.

EC_x: beteckning på den koncentration av testsubstansen som är löst i testmediet och som reducerar tillväxten av *Lemna* med x % (t.ex. 50 %) inom en bestämd exponeringstid, som måste specificeras om den avviker från den fullständiga eller normala tiden för testets genomförande. För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_rC för tillväxthastighet och E_yC för producerad mängd biomassa, åtföljt av mätvariabeln, t.ex. E_rC (n), där n = ”antal fronder”.

effektmått (eng. ”*endpoint*”): den allmänna faktor som genom inverkan av en testsubstans i ett prov förändras jämfört med ett kontrollprov utan testsubstans. I det aktuella testet är effektmåttet tillväxthämning, som kan uttryckas med olika responsvariabler baserade på en eller flera mätvariabler.

fenotyp: observerbara egenskaper hos en organism vilka bestäms av interaktionen mellan organismens gener och dess omgivning.

▼M1

frond: enskild bladliknande del av andmatsplantans struktur. Det är den minsta enhet, dvs. individ, som har förökningsförmåga.

genomflödestest: testlösningen ersätts hela tiden kontinuerligt med färsk lösning.

klon: organism eller cell som uppstått från en enskild individ genom asexuell (vegetativ) förökning. Individer från samma klon är därför genetiskt identiska.

kloros: gulning av bladvävnad.

koloni: samling av moder- och dotterfronder (vanligtvis 2–4 stycken) som sitter fast vid varandra. Ibland används termen ”planta”.

koncentration utan observerad effekt (”NOEC – No Observed Effect Concentration”): koncentration av testsubstansen som ligger omedelbart under LOEC.

lägsta koncentration med observerad effekt (”LOEC – Lowest Observed Effect Concentration”): den lägsta koncentration av testsubstansen vid vilken man kan iaktta att den har en statistiskt signifikant reducerande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med ett kontrollprov (i fortsättningen kortfattat benämnt ”kontroll”). Ytterligare ett villkor är att alla koncentrationer av testsubstansen vilka ligger över LOEC måste ha en skadlig effekt lika med eller större än den effekt som observeras vid LOEC. Om dessa båda dessa villkor inte är uppfyllda, måste en fullständig redogörelse lämnas för hur LOEC (och därmed NOEC) har valts.

monokultur: kultur bestående av en enda art.

mätvariabler: alla slags variabler som mäts för att uttrycka testets effektmått med hjälp av en eller flera responsvariabler. I den aktuella metoden är frondantal, total frondarea, färskvikt och torrvikt mätvariabler.

nekros: död bladvävnad. Syns på att den är vit eller vattenindränkt.

producerad mängd biomassa: storleken på en mätvariabel för biomassa vid exponeringstidens slut minskad med storleken på samma mätvariabel vid exponeringstidens början.

responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att man använder olika beräkningsmetoder på mätvariabler som beskriver biomassa. I den aktuella metoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som beräknas med hjälp av mätvariabler såsom frondantal, total frondarea, färskvikt eller torrvikt.

semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösning): testlösningen byts med bestämda intervall under testet, dvs. förbrukad lösning tas regelbundet bort och ersätts med färsk.

statiskt testförfarande: testlösningen byts inte under testet.

svullen frond: frond med ”buckligt” eller svullet utseende.

▼M1

testmedium: syntetiskt odlingsmedium där testplantorna befinner sig när de exponeras för testsubstansen. Testsubstansen är normalt löst i testmediet.

tillväxt: ökning av en mätvariabel – t.ex. frondantal, torrvikt, våtvikt eller total frondarea – mätt över tiden för testets genomförande.

tillväxthastighet (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): logaritmisk ökning av mängden biomassa under exponeringstiden.

1.3 PRINCIPER

Exponentiellt växande växtkulturer av släktet *Lemna* får växa som monokulturer i olika koncentrationer av testsubstansen under loppet av sju dagar. Syftet är att genom bestämning av mätvariabler kvantifiera testsubstansens effekter på tillväxten under tiden för testets genomförande. Antalet fronder är den primära mätvariabeln. Minst ytterligare en mätvariabel – total frondarea, torrvikt eller färskvikt – mäts, eftersom en del substanser kan påverka andra mätvariabler mer än de påverkar frondantalet. För att kvantifiera testsubstansens effekter jämförs tillväxten i testlösningarna med tillväxten i kontrollerna. Därefter bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning, t.ex. 50 %. Denna koncentration betecknas som EC_x, t.ex. EC_{50} i fallet med 50 % tillväxthämning.

Effektmåttet i testet är tillväxthämningen uttryckt som den logaritmiska ökningen av mätvariabeln – dvs. den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten – under exponeringstiden. Med hjälp av de genomsnittliga specifika tillväxthastigheter som registrerats i en serie testlösningar bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning, t.ex. 50 %. Denna koncentration betecknas som E_rC_x, t.ex. E_rC_{50} i fallet 50 %.

Ytterligare en responsvariabel som används i metoden är den producerade mängden biomassa, en variabel som i vissa länder är föreskriven i lagen. Den definieras som storleken på en mätvariabel för biomassa vid exponeringstidens slut minskad med storleken på samma mätvariabel vid exponeringstidens början. Med hjälp av den producerade mängd biomassa som registrerats i en serie testlösningar bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning, t.ex. 50 %. Denna koncentration betecknas som E_yC_x, t.ex. E_yC_{50} i fallet 50 %.

Utöver detta kan man statistiskt bestämma den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och koncentrationen utan observerad effekt (NOEC).

1.4 TESTSUBSTANS

Man bör ha tillgång till en analysmetod som är tillräckligt känslig för kvantitetsbestämning av testsubstansen i testmediet.

▼M1

Bland annat följande uppgifter om testsubstansen kan vara av värde när man fastställer testbetingelserna: strukturformel, renhetsgrad, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a, K_{ow}, ångtryck och biologisk nedbrytbarhet. Löslighet i vatten och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant. Storleken på denna konstant visar om det är sannolikt att förlusterna av testsubstansen under tiden för testets genomförande kommer att vara betydande, och om man behöver vidta åtgärder för att behärska dessa förluster. Om uppgifterna om testsubstansens löslighet och stabilitet är osäkra, bör man bedöma dessa egenskaper under testbetingelserna, dvs. i det odlingsmedium, vid den temperatur och under de belysningsförhållanden som används i testet.

När det är särskilt viktigt att reglera testmediets pH, t.ex. vid test av hydrolytiskt instabila metaller eller substanser (dvs. sådana som bryts ned i vatten), bör man tillsätta en buffert i odlingsmediet (se första stycket i avsnitt 1.7.4). Ytterligare vägledning för test av substanser med fysikalisk-kemiska egenskaper som gör dem besvärliga att testa finns i (11).

1.5 REFERENSSUBSTANS

En eller flera referenssubstanser – t.ex. 3,5-diklorfenol som används i det internationella ringtestet (10) – bör testas för att kontrollera testresultatens giltighet. En referenssubstans bör testas minst två gånger per år. Om testen utförs mer sällan bör referenssubstansen testas direkt i samband med respektive test.

1.6 KRITERIER FÖR TESTRESULTATENS GILTIGHET

För att testresultaten ska vara giltiga måste fördubblingstiden för frondantalet i kontrollen vara mindre än 2,5 dagar (60 timmar). Det motsvarar en ökning på ca 700 % på 7 dagar och en genomsnittlig specifik tillväxthastighet på 0,275 d^{-1}. Med de testmedier och testbetingelser som beskrivs för den aktuella metoden kan detta kriterium uppfyllas med statiskt testförfarande (8). Kriteriet bör också kunna uppfyllas vid semistatiskt testförfarande och genomflödestest. Beräkningen av fördubblingstiden beskrivs i avsnitt 2.1.

1.7 METODBESKRIVNING

1.7.1 **Utrustning**

All utrustning som befinner sig i kontakt med testmedier ska vara av glas eller annat kemiskt inert material. Glasutrustning, som används för odling och test, ska vara rengjord från kemiska föroreningar som kan läcka in i testmediet, och glaset ska vara sterilt. Provkärlen ska vara så vida att fronderna från de olika kolonierna i kontrollerna kan växa utan att de täcker varandra i slutet av testet. Det gör inget om rötterna vidrör botten av provkärlen, men alla provkärl bör vara minst 20 mm djupa och ha en volym på minst 100 ml. Så länge dessa krav är uppfyllda har valet av provkärl ingen avgörande betydelse. Glasbägare och kristalliseringsskålar samt Petriskålar av glas – alla med passande storlekar – har alla visat sig vara lämpliga. Provkärlen måste vara tillslutna för att avdunstning och oavsiktlig kontamination ska hållas så låg som möjlig, samtidigt som erforderlig luftväxling ska vara möjlig. Provkärlen – framför allt lock, proppar eller andra typer av förslutningar – måste vara sådana att det inte förekommer någon skuggverkan eller förändringar av ljusets spektrala egenskaper.

▼M1

Odlingar och provkärl får inte förvaras tillsammans. Bäst är att använda separata klimatkammare, inkubatorer eller klimatrum. Belysning och temperatur måste kunna regleras och hållas på konstant nivå (se avsnitt 1.7.8).

1.7.2 **Testorganism**

Som organism för testet används *Lemna gibba* eller *Lemna minor*. Tillägg 1 innehåller kortfattade beskrivningar av andmatsarter som har använts för toxicitetstest. Växtmaterial kan tas från en kultursamling, införskaffas från ett annat laboratorium eller samlas in i naturen. Plantor som samlas in i naturen ska under minst 8 veckor hållas i samma medium som används för testet. Det får inte finnas några uppenbara kontaminationskällor på platser som används för insamling i naturen. Växtmaterial som införskaffas från andra laboratorier eller från kultursamlingar ska förvaras under minst 3 veckor på samma sätt som för plantor från naturen. Man ska alltid redovisa ursprunget – om det är känt – för växtmaterialet, de arter och den klon som används för testet.

Man ska använda monokulturer utan synliga föroreningar i form av andra organismer såsom alger och protozoer. Friska plantor av *L. minor* består av kolonier med 2–5 fronder, medan friska kolonier av *L. gibba* kan omfatta upp till 7 fronder.

Kvaliteten och enhetligheten hos plantorna som används för testet har ett stort inflytande på testresultatet, och de bör därför väljas ut med omsorg. Unga, snabbväxande plantor utan synliga skador eller missfärgningar (på grund av kloros) ska användas. Att en kultur är högvärdig syns på att den har en stor andel kolonier med minst 2 fronder. Ett stort antal enstaka fronder är ett tecken på miljöstress, t.ex. på grund av näringsbrist. Använd inte växtmaterial från sådana kulturer för test.

1.7.3 **Odling**

För att göra odlingen mindre arbetskrävande – t.ex. när inga test av *Lemna* är inplanerade under en längre tid – kan kulturerna förvaras under reducerad belysning och temperatur (4–10 °C). Närmare uppgifter om detta och andra uppgifter om behandling av stamkulturer finns i tillägg 2. Om det märks tydliga tecken på föroreningar i form av alger eller andra organismer krävs ytsterilisering av ett delprov av fronder från *Lemna*. Det förs sedan över till färskt medium (se tillägg 2). I detta fall måste den återstående delen av den kontaminerade kulturen kasseras.

Minst 7 dagar före testet förs en tillräcklig mängd kolonier aseptiskt över till färskt medium och odlas under 7–10 dagar under testbetingelser.

1.7.4 **Testmedier**

För *Lemna minor* och *Lemna gibba*, rekommenderas olika medier (se nedan). Man bör noggrant överväga om man ska tillsätta en pH-buffert i testmediet: MOPS [(4-morfolino)propansulfonsyra, CAS-nr 1132–61–2; Einecs-nr 214–478–5] i mediet för *L. minor* och $NaHCO_3$ i mediet för *L. gibba* när man misstänker att mediet kan reagera med testsubstansen och påverka dess toxicitetseffekt. Steinbergs medium (12) kan också användas förutsatt att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

▼M1

En modifierad form av det odlingsmedium för *Lemna* som är standardiserat av det svenska standardiseringsorganet SIS rekommenderas för odling och test med *L. minor*. Sammansättningen av detta medium återfinns i tillägg 3.

Odlingsmediet 20X-AAP, som beskrivs i tillägg 3, rekommenderas för odling och test med *L. gibba*.

Steinbergs medium, som beskrivs i tillägg 3, passar också för *L. minor* men kan också användas för *L. gibba* så länge kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

1.7.5 **Testlösningar**

Testlösningarna bereds vanligtvis genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningar av testsubstansen bereds normalt genom att substansen löses i ett odlingsmedium.

Den högsta koncentrationen av testsubstansen bör normalt inte överskrida dess vattenlöslighet under testbetingelserna. Observera dock att *Lemna* spp. flyter på vätskeytan och kan exponeras för substanser som samlas i gränsytan mellan vatten och luft, t.ex. hydrofoba substanser och substanser med låg vattenlöslighet. Under sådana omständigheter kommer plantan att exponeras för andra koncentrationer av substansen än de som förekommer i lösningen. Koncentrationerna kan därför – beroende på testsubstansens egenskaper – överskrida vattenlösligheten. För testsubstanser med låg vattenlöslighet kan det bli nödvändigt att bereda en koncentrerad stamlösning eller en dispersion med hjälp av ett organiskt lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att underlätta tillsatsen av exakta mängder testsubstans i testmediet och bidra till dispergeringen och upplösningen av substansen. Man ska därför så långt som möjligt undvika att använda sådana substanser. Det får inte uppstå fytotoxicitet genom att man tvingas använda lösnings- eller dispergeringsmedel för att bereda testlösningen. Exempel på vanliga lösningsmedel, som inte förorsakar fytotoxicitet vid koncentrationer upp till 100 µl/l, är aceton och dimetylformamid. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används, bör dess slutkoncentration redovisas och hållas så låg som möjligt (≤ 100 µl/l). Alla test- och kontrollösningar bör ha samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedel. Mer information om användningen av dispergeringsmedel finns i (11).

1.7.6 **Test- och kontrollgrupper**

Förkunskap om testsubstansens toxicitet för *Lemna*, t.ex. erhållen genom ett förberedande test av koncentrationsintervallet för toxiciteten, underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer. I det slutliga toxicitetstestet ska det normalt finnas minst 5 koncentrationer ordnade i geometrisk serie. Separationsfaktorn mellan testkoncentrationerna bör inte överskrida 3,2, men om dos-respons-kurvan är flack, kan en större separationsfaktor användas. Om färre än 5 koncentrationer används ska en motivering lämnas. Minst 3 replikat ska användas för respektive testkoncentration.

När man fastställer intervallet av testkoncentrationer (för det förberedande testet eller för det slutliga toxicitetstestet), ska man beakta följande:

▼M1

— För att bestämma en EC_x-koncentration ska värdet på EC_x ligga innanför intervallet av testkoncentrationer för att man ska uppnå en lämplig konfidensgrad. Om man t.ex. ska bestämma EC_{50}, ska den högsta testkoncentrationen vara högre än värdet på EC_{50}. Om värdet på EC_{50} ligger utanför intervallet av testkoncentrationerna, blir motsvarande konfidensintervall stora, och då är det svårt att bedöma om modellen är statistiskt lämplig.

— Om syftet är att bestämma LOEC eller NOEC, ska den lägsta testkoncentrationen vara så låg att tillväxten inte är märkbart mindre än tillväxten i kontrollen. Den högsta testkoncentrationen ska vara så hög att tillväxten är märkbart lägre än i kontrollen. Om dessa villkor inte är uppfyllda måste testet göras om med ett annat koncentrationsintervall (såvida inte den högsta koncentrationen ligger på löslighetsgränsen eller är lika med den högsta erforderliga gränskoncentrationen, t.ex. 100 mg/l).

I varje test ska ingå kontroller med samma näringsmedium, frondantal, antal kolonier, miljöbetingelser och förfaranden som för provkärlen, men utan testsubstans. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används som hjälpmedel i testet, krävs ytterligare ett kontrollprov, nu med samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedlet som i provkärlen med testsubstansen. Antalet replikatkärl med kontroller – och i tillämpliga fall kärl med lösnings- eller dispergeringsmedel – ska vara minst lika med – eller helst dubbelt så många som – antalet kärl som används för respektive testkoncentration.

Om NOEC inte behöver bestämmas, får testförfarandet modifieras genom att öka antalet koncentrationer och minska antalet replikat per koncentration. Antalet kontrollreplikat måste dock vara minst tre.

1.7.7 **Exponering**

Kolonier med 2–4 synliga fronder förs över från ympkulturen och fördelas slumpmässigt i provkärlen under aseptiska förhållanden. Alla provkärl ska vardera innehålla sammanlagt 9–12 fronder. Antalet fronder och kolonier ska vara detsamma i alla provkärl. Erfarenheter från användning av denna metod och resultat från ringtest har visat att 3 replikat per testlösning (testkoncentration), där alla replikat från början innehåller 9–12 fronder, är tillräckligt för att man ska upptäcka skillnader i tillväxt mellan testlösningarna på cirka 4–7 procents tillväxthämning (beräknad enligt tillväxthastighet) och 10–15 procents tillväxthämning (beräknad enligt producerad mängd biomassa) (10).

Provkärlen måste placeras slumpmässigt i inkubatorn för att minimera inflytandet av rumsbetingade skillnader i ljusintensitet och temperatur. Det krävs också blockvis fördelning eller slumpmässig omplacering av kärlen vid varje mättillfälle, eller oftare.

▼M1

Om ett förberedande stabilitetstest visar att koncentrationen av testsubstansen inte kan upprätthållas under tiden för testets genomförande (7 dagar) – dvs. den uppmätta koncentrationen sjunker under 80 % av det uppmätta startvärdet – bör semistatiskt testförfarande användas. I det fallet exponeras kolonierna för nyberedda test- och kontrollösningar vid minst 2 tillfällen under testet, t.ex. på dag 3 och 5. Intervallen för byte till färskt medium beror på stabiliteten hos testsubstansen – det kan krävas kortare intervall för att upprätthålla nära nog konstanta koncentrationer av mycket instabila eller flyktiga substanser. I visa fall måste man använda genomflödestest (se 11 och 13).

Exponering genom besprutning av fronderna ingår inte i denna testmetod. Besprutningsmetoden beskrivs i 14.

1.7.8 **Inkubationsbetingelser**

Kontinuerlig belysning med varmt eller kallt vitt ljus från lysrör används för att åstadkomma en ljusintensitet i intervallet 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, varvid intensiteten ska mätas inom ett fotosyntetiskt aktivt våglängdsområde (400–700 nm) i punkter på samma avstånd från ljuskällan som *Lemna*-fronderna (denna intensitet motsvarar en belysningsstyrka på 6 500–10 000 lux). Ljusintensiteten får inte variera mer än ± 15 % över testytan. Metoden för detektering och mätning av ljuset – framför allt typen av ljussensor – påverkar mätvärdet. Sfäriska sensorer – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför och under mätplanet – och sensorer av solsensortyp (med cosinuskoefficient för infallsvinkeln) – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför mätplanet – är att föredra framför riktade sensorer. De förstnämnda sensorerna ger större mätutslag för en diffus ljuskälla av den typ som beskrivits här.

Temperaturen i provkärlen ska vara 24 ±2 °C. pH i kontrollmediet får inte öka mer än 1,5 under testets gång. En avvikelse på mer än 1,5 gör dock inte testresultaten ogiltiga om det kan visas att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda. I speciella fall – t.ex. vid test av instabila substanser eller metaller – måste förskjutningen av pH kontrolleras extra noggrant. Se vidare (11).

1.7.9 **Tid för testets genomförande**

Testet ska avslutas 7 dagar efter det att plantorna har placerats i provkärlen.

1.7.10 **Mätningar och analytiska bestämningar**

Räkna och registrera frondantalet i provkärlen vid testets början. Se noga till att ta med alla uppstickande, väl synliga fronder. Bestäm antalet fronder – både sådana som framstår som normala och sådana som framstår som onormala – vid början av testet och därefter minst var tredje dag under exponeringstiden (dvs. vid minst 2 tillfällen under 7-dagarsperioden), samt vid slutet av testet. Registrera förändringar i plantutvecklingen. Det kan t.ex. gälla frondstorlek; utseende; tecken på nekros, kloros eller svullna fronder; kollaps av kolonier eller försämrad flytförmåga; rötternas längd och utseende. Registrera också betydelsefulla inslag i testmediet, t.ex. förekomst av oupplöst material och algtillväxt i provkärlet.

▼**M1**

Utöver bestämningar av frondantalet under testet ska de effekter testsubstansen har på en eller flera av följande mätvariabler bestämmas:

i) Total frondarea.

ii) Torrvikt.

iii) Färskvikt.

Fördelen med variabeln ”total frondarea” är att den kan bestämmas för alla prov- och kontrollkärl vid början, under och vid slutet av testet. Torr- eller färskvikt måste bestämmas vid början av testet med hjälp av ett prov från ympkulturen som är representativt för vad som används för att starta testet, och vid slutet av testet med hjälp av växtmaterial från alla prov- och kontrollkärl. Om frondarean inte bestäms, är mätning av torrvikten att föredra framför mätning av färskvikten.

Total frondarea, torrvikt och färskvikt kan bestämmas på följande sätt:

i) *Total frondarea*: Den sammanlagda frondarean hos alla kolonier bestäms genom bildanalys. Med en videokamera registrerar man en silhuett av provkärlet och plantorna (kärlet kan t.ex. vara placerat på en ljuslåda). Därefter digitaliseras bilderna. Genom kalibrering med plana former med känd area kan man sedan bestämma den totala frondarean i kärlet. Fel orsakade av inverkan av provkärlets överkant måste undvikas. En annan, mer arbetskrävande metod är att ta en fotokopia av provkärlet och plantorna, klippa ut den silhuett som kolonierna bildar och sedan bestämma deras area med hjälp av en bladytemätare eller millimeterpapper. Andra metoder – t.ex. bestämning av viktsförhållandet mellan koloniernas silhuettyta och en ytenhet – kan också vara ändamålsenliga.

ii) *Torrvikt*: Alla kolonier samlas in från respektive provkärl och sköljs med destillerat eller avjoniserat vatten. Överskottsvattnet avlägsnas från kolonierna, t.ex. genom uppsugning med filterpapper, och de torkas sedan vid 60 °C tills vikten inte längre minskar. Även rotfragment måste tas med. Torrvikten bestäms med en noggrannhet på minst 0,1 mg.

iii) *Färskvikt*: Alla kolonier förs över till förvägda provrör av polystyren (eller annat inert material) med små (1 mm) hål i de rundade bottnarna. Provrören centrifugeras vid 3 000 varv/minut under 10 minuter vid rumstemperatur. Provrören, som nu innehåller torra kolonier, vägs på nytt. Färskvikten fås fram genom att subtrahera det tomma provrörets vikt.

1.7.10.1 *Mätfrekvens och analytiska bestämningar*

Vid statiskt testförfarande mäts pH i alla testlösningar (testkoncentrationer) vid början och slutet av testet. Vid semistatiskt testförfarande mäts pH i varje färsk testlösning och motsvarande förbrukade lösning.

▼M1

Ljusintensiteten ska mätas i klimatkammaren, inkubatorn eller klimatrummet i punkter på samma avstånd från ljuskällan som *Lemna*-fronderna har. Mätningar ska göras minst 1 gång under testets genomförande. Temperaturen hos mediet i ett särskilt kärl med enbart testmedium, som hålls under samma betingelser i klimatkammaren, inkubatorn eller klimatrummet, ska registreras minst 1 gång per dag.

Under testets gång bestäms koncentrationerna av testsubstansen med lämpliga intervall. Vid statiskt testförfarande är minimikravet att koncentrationerna ska bestämmas vid början och slutet av testet.

Om man vid semistatiskt testförfarande bedömer att koncentrationen av testsubstansen inte kommer att ligga kvar inom ± 20 % av den nominella koncentrationen, måste man analysera alla nyberedda testlösningar liksom alla förbrukade lösningar efter byte till ny färsk lösning (se tredje stycket i avsnitt 1.7.7). För test, där den uppmätta startkoncentrationen av testsubstansen inte ligger inom ± 20 % av det nominella värdet – dvs. det värde som bestäms vid beredningen – men där det på ett tillfredsställande sätt kan påvisas att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila – dvs. att de ligger inom intervallet 80–120 % av startkoncentrationen – räcker det med att kemiska bestämningar utförs enbart för de högsta och lägsta testkoncentrationerna. I samtliga fall behöver bestämning av testsubstansens koncentrationer före byte till färsk testlösning bara utföras på ett enda replikatkärl för varje testkoncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat för respektive testkoncentration).

Vid genomflödestest kan man använda ett liknande förfarande som vid semistatiskt testförfarande – inklusive analys vid början, halvvägs igenom testet och vid slutet av testet – men i detta fall har mätning av förbrukade lösningar inte relevans. Vid genomflödestest ska daglig kontroll göras av flödeshastigheten hos spädningsmedlet och testsubstansen, eller stamlösningen av testsubstansen.

Om man kan påvisa att koncentrationen av testsubstansen under hela testets gång på ett tillfredsställande sätt har hållit sig inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen, kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen är större än ± 20 %, ska analysen av resultaten baseras på det geometriska medelvärdet av koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver den avtagande koncentrationen av testsubstansen (11).

1.7.11 **Gränstest**

Under vissa omständigheter – t.ex. när ett förberedande test tyder på att testsubstansen inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l – eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet om den gränsen är lägre – kan man utföra ett gränstest. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller lika med löslighetsgränsen). Jämförelsen måste underbyggas med en analys av exponeringskoncentrationen, dvs. den verkliga koncentrationen som kan variera över tiden för testets genomförande. Det gör man för att se till att den nominella koncentrationen är lika med den faktiska testkoncentrationen. Alla testbetingelser samt kriterier för testresultatens giltighet som beskrivits tidigare gäller även för gränstest, med undantaget att antalet testreplikat ska vara dubbelt så stort. Tillväxten i kontrollgruppen och testgruppen kan analyseras med en statistisk metod för jämförelse av medelvärden, t.ex. t-test (”Students t-test”).

▼M1

2. BERÄKNINGAR OCH STATISTISKA METODER

2.1 FÖRDUBBLINGSTID

Fördubblingstiden (T_d) för frondantalet är ett kriterium på testresultatens giltighet (se avsnitt 1.6). Den bestäms med hjälp av värdet på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten i kontrollkärlen (μ):

$$T_d = \ln 2/\mu$$

Bestämningen av μ beskrivs i första och andra styckena i avsnitt 2.2.1 nedan.

2.2 RESPONSVARIABLER

Syftet med testet är att bestämma testsubstansens effekter på tillväxten av *Lemna*. Två responsvariabler används eftersom lagbestämmelser och etablerade variabler skiljer sig åt mellan medlemsstaterna. För att testresultaten ska kunna godtas i samtliga medlemsstater ska effekterna bedömas med hjälp av båda de responsvariabler (a och b) som beskrivs nedan.

a) *Genomsnittlig specifik tillväxthastighet.* Beräknas med hjälp av två tillväxtvariabler: 1) den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av frondantalet, och 2) den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av en andra variabel, som kan vara total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Variablerna bestäms i kontrollerna och respektive testgrupp, dvs. grupp av provkärl med samma testkoncentration. Tiden uttrycks i dagar. Denna responsvariabel kallas ibland relativ tillväxthastighet (15).

b) *Producerad mängd biomassa*. Beräknas med hjälp av förändringarna av frondantalet och förändringarna av en andra variabel, som kan vara total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Förändringarna bestäms i kontrollerna och respektive testgrupp ända till slutet av testet.

Observera att de värden på toxiciteten som beräknas med hjälp av dessa två responsvariabler inte är jämförbara, och man måste ha denna skillnad i åtanke när man använder resultaten från testet. EC_x-värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten (E_rC_x) är i allmänhet högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa (E_yC_x) om de föreskrivna testbetingelserna är uppfyllda. Detta ska inte tolkas som en skillnad i mätkänslighet mellan de två responsvariablerna – skillnaden beror bara på att värdena erhållits på två olika sätt. Responsvariabeln ”genomsnittlig specifik tillväxthastighet” grundar sig på den allmänna exponentiella tillväxtutvecklingen hos andmat i obegränsade kulturer, där toxiciteten bestäms på basis av testsubstansens inverkan på tillväxthastigheten, oberoende av den absoluta nivån på den specifika tillväxthastigheten i kontrollen, responskurvans lutning och tiden för testets genomförande. Responsvariabeln ”producerad mängd biomassa” är däremot beroende av alla de tre sistnämnda variablerna. E_yC_x är beroende både av den specifika tillväxthastigheten hos de andmatsarter som används i de enskilda testen och av den maximala specifika tillväxthastigheten, som kan variera mellan olika arter, och till och med mellan olika kloner. Responsvariabeln ”producerad mängd biomassa” får inte användas för jämförelser av känsligheten för toxiska substanser mellan olika andmatsarter, inte ens mellan olika kloner. Ur vetenskaplig synpunkt är värdet på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten att föredra för bestämning av toxiciteten. Toxicitetsbestämning med hjälp av värdet på producerad mängd biomassa har tagits med i testmetoden för att tillgodose vissa länders nuvarande lagstiftningskrav.

▼M1

Toxiciteten bestäms med hjälp av två tillväxtvariabler: 1) frondantal, och 2) total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Att två variabler används beror på att vissa substanser kan ha mycket större effekt på andra mätvariabler än på frondantalet. Om man bara höll sig till frondantalet skulle man inte märka detta förhållande.

Frondantal samt övriga registrerade mätvariabler för respektive mättillfälle – t.ex. total frondarea, torrvikt eller färskvikt – förs in i en tabell tillsammans med koncentrationerna av testsubstansen. De efterföljande beräkningarna, för att bestämma t.ex. LOEC, NOEC eller EC_x, ska grundas på värdena för de enskilda replikaten, inte på beräknade medelvärden för respektive testgrupp.

2.2.1 **Genomsnittlig specifik tillväxthastighet**

Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för en given tidsperiod beräknas som den logaritmiska ökningen av två tillväxtvariabler: frondantal och ytterligare en variabel (total frondarea, torrvikt eller färskvikt). Använd nedanstående formel för alla replikat av kontroll- och testlösningar:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

där:

– μ_{i-j} är genomsnittlig specifik tillväxthastighet från tidpunkten i till tidpunkten j,

– N_i är värdet på tillväxtvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten i,

– N_j är värdet på tillväxtvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten j,

– t är tidslängden mellan tidpunkterna i och j.

Beräkna ett medelvärde av tillväxthastigheten för varje testgrupp och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.

Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ska beräknas för hela tiden för testets genomförande – ”i” i formeln betecknar början av tiden för testets genomförande, och ”j” slutet. Beräkna ett medelvärde av den genomsnittliga tillväxthastigheten för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Bestäm dessutom tillväxthastigheten för flera intervall av exponeringstiden för att kunna bedöma testsubstansens tidsberoende effekt, t.ex. genom analys av logaritmiska tillväxtkurvor. Stora skillnader mellan tillväxthastigheten i respektive intervall och genomsnittsvärdet tyder på en avvikelse från exponentiell tillväxt, och att tillväxtkurvorna måste studeras närmare. Vid en konservativ bedömning kan man i detta fall jämföra testlösningarnas specifika tillväxthastigheter under det tidsintervall som har den största tillväxthämningen med tillväxthastigheterna för kontrollerna under samma tidsintervall.

▼M1

Den procentuella tillväxthämningen (I_r) beräknas sedan för varje testkoncentration (testgrupp) med formeln

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

där:

– % I_r är den procentuella reduktionen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,

– μ_C är medelvärdet av μ i kontrollgruppen,

– μ_T är medelvärdet av μ i testgruppen.

2.2.2 **Producerad mängd biomassa**

Effekterna på den producerade mängden biomassa bestäms med hjälp av två mätvariabler, varav den ena är frondantalet, och den andra någon av variablerna total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Mätningarna görs vid början och slutet av testet. För torrvikt och färskvikt bestäms den initiala biomassan med hjälp av ett prov bestående av fronder från samma kultur som används för att ympa provkärlen (se andra stycket i avsnitt 1.7.3). Beräkna ett medelvärde av den producerade mängden biomassa för varje testkoncentration och kontroll tillsammans med variansskattningar. Den genomsnittliga procentuella reduktionen av den producerade mängden biomassa (% I_y) beräknas för varje testgrupp med formeln

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

där:

– % I_y är den procentuella reduktionen av den producerade mängden biomassa,

– b_C är slutlig biomassa minus initial biomassa för kontrollgruppen,

– b_T är slutlig biomassa minus initial biomassa för testgruppen.

2.2.3 **Plottning av dos-respons-kurvor**

Dos-respons-kurvor ska plottas med den genomsnittliga procentuella hämningen av responsvariabeln (I_r eller I_y) längs y-axeln och logaritmen av testsubstansens koncentration längs x-axeln. (I_r och I_y beräknas enligt avsnitt 2.2.1 respektive 2.2.2 ovan.)

2.2.4 **Bestämning av EC_x**

Bestämningar av EC_x – t.ex. EC_{50} – ska baseras både på genomsnittlig specifik tillväxthastighet (E_rC_x) och på producerad mängd biomassa (E_yC_x). De sistnämnda två responsvariablerna ska i sin tur bestämmas med hjälp av frondantal och en ytterligare mätvariabel (total frondarea, torrvikt eller färskvikt). Orsaken till att man ska använda två mätvariabler är att det finns testsubstanser vars inverkan på frondantalet skiljer sig åt från inverkan på andra mätvariabler. Toxicitetsparametrarna bör därför vara 4 EC_x-värden för varje beräknad tillväxthämningsnivå x: E_rC_x (frondantal), E_rC_x (total frondarea, torrvikt eller färskvikt), E_yC_x (frondantal) samt E_yC_x (total frondarea, torrvikt eller färskvikt).

▼M1

2.3 STATISTISK BEHANDLING

Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (16). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera sådana oregelbundenheter i data som inte går att undvika, liksom de hanterar avvikelser från jämna fördelningskurvor bättre. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli felaktigt uppförstorade genom linearisering och därigenom störa analysen (16). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, t.ex. dödlighet–överlevnad) och därför måste modifieras för att kunna användas för data om tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (17), (18) och (19).

För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och responsvärde för att beräkna punktskattningar av EC_x-värden. Om möjligt ska det 95-procentiga konfidensintervallet bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas, antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalys ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper.

När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50}-värden och konfidensintervall också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrap (20).

För skattning av LOEC (och därmed även av NOEC) jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för respektive koncentration jämförs sedan med medelvärdet av kontrollvärdena med hjälp av en passande metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (21, 22, 23 och 24). Man måste avgöra om ANOVA-antagandet om varianshomogenitet är uppfyllt. Det kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (25), t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle antagandet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga användning av analys med metoder som t.ex. Jonckheeres trendtest av ”step-down”-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (19).

Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värdet. Det ska ersättas med punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta *Lemna*-test har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} bör redovisas.

3. **REDOVISNING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testsubstans:

— Fysiskt tillstånd (gas, vätska eller fast form) och fysikalisk-kemiska egenskaper, inklusive löslighetsgränsen i vatten.

▼M1

— Kemiska beteckningsuppgifter (t.ex. CAS-nummer), inklusive renhetsgrad.

Testarter:

— Vetenskapligt namn (om det är känt) och ursprung.

Testbetingelser:

— Typ av test (statiskt, semistatiskt eller genomflöde).

— Startdatum och tid för testets genomförande.

— Testmedium.

— Beskrivning av uppställning av testet: provkärl och lock eller proppar (eller annan typ av förslutning); lösningsvolymer; antal kolonier och fronder per provkärl vid testets början.

— Testkoncentrationer (nominella respektive uppmätta värden) och antal replikat per koncentration.

— Metoder för beredning av stam- och testlösningar, med uppgift om användning av lösnings- eller dispergeringsmedel.

— Temperatur under testets gång.

— Ljuskälla, ljusintensitet och ljushomogenitet.

— pH i test- och kontrollmedier.

— Testsubstansens koncentrationer och analysmetod med relevanta uppgifter för kvalitetsbedömning (kontroll av testresultatens giltighet, standardavvikelser eller konfidensintervall för analyserna).

— Metoder för bestämning av frondantal och andra mätvariabler, t.ex. torrvikt, färskvikt eller frondarea.

— Alla avvikelser från den här beskrivna testmetoden.

Resultat:

— Rådata: frondantal och andra mätvariabler i alla test- och kontrollprov vid respektive observation och analystillfälle.

— Medelvärde och standardavvikelse för respektive mätvariabel.

— Tillväxtkurvor för respektive koncentration. (Bör plottas med logaritmen av mätvariabeln. Se andra stycket i avsnitt 2.2.1.)

— Fördubblingstid och tillväxthastighet i kontrollen beräknade med hjälp av frondantal.

— Beräknade responsvariabler för respektive testreplikat, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten.

— Diagram över förhållandet mellan koncentration och tillväxthämmande effekt.

— Bestämningar av effektmått för toxicitet – t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20} – och motsvarande konfidensintervall. Värden på LOEC och NOEC – såvida de har bestämts – och de statistiska metoder som använts för att bestämma dem.

▼M1

— Om ANOVA har använts: storleken på märkbar effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad).

— Tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningar.

— Synliga tecken på fytotoxicitet samt observationer avseende testlösningarna.

— Diskussion av resultaten. Ta även upp sådan inverkan på testresultatet som kan bero på avvikelser från den här beskrivna testmetoden.

4. **LITTERATUR**

1. OECD TG 221 (2006). *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

2. I avsnitt 13.5.3 i EU:s Manual of Decisions från juli 2006 redogörs närmare för användningen av *Lemna*-undersökningar för färgade substanser. Se http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

3. Guidance on information requirements and chemical safety assessment – Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues. Se

   http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

4. ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Förnyat godkännande 1998). s. 733–742. Återfinns i Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA, USA.

5. USEPA – United States Environmental Protection Agency (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96–156. 8 s.

6. AFNOR – Association Française de Normalisation (1996). XP T 90–337: Détermination de l’inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

7. SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna mino*r, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

8. Environment Canada (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37–120 s.

9. Environment Canada (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

10. Sims I., Whitehouse P. och Lacey R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

11. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

12. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

13. Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3–77 108. September 1977.

14. Lockhart W. L., Billeck B. N. och Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, s. 353–359.

15. Huebert, D.B. och Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, s. 481–483.

16. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, s. 713–718.

17. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. och Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, s. 157–167.

18. Bruce R.D. och Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, s. 1485–1494.

19. OECD (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

20. Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN, USA.

21. Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, s. 1096–1121.

22. Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

23. Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27, s. 103–117.

24. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, s. 510–531.

25. Brain P. och Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, s. 93–96.

▼M1

Tillägg 1

Beskrivning av *Lemna* spp.

Den vattenväxt som i allmänt språkbruk kallas andmat – *Lemna* spp. – tillhör familjen *Lemnaceae* som förekommer över hela världen i ett antal arter av fyra släkten. Deras olika utseenden och taxonomi har beskrivits ingående (1, 2). *Lemna gibba* och *L. minor* är arter som är vanliga i tempererade zoner och som ofta används i toxicitetstest. Bägge arterna lever i vatten med flytande eller nedsänkt skivlik stam (frond) utan blad. Från mitten av den undre ytan på varje frond utgår en hårfin rot. *Lemna* spp. blommar sällan – plantorna förökar sig i stället vegetativt genom avsnörning av fronder (3). I jämförelse med äldre plantor tenderar de yngre att vara blekare, ha kortare rötter och bestå av 2–3 fronder av olika storlek. Egenskaperna hos *Lemna* – enkel uppbyggnad, vegetativ förökning och kort generationstid – gör plantor av detta släkte mycket lämpliga för laboratorietest (4, 5).

Eftersom känsligheten för toxisk påverkan sannolikt varierar mellan arterna, godtas enbart jämförelser av känsligheten inom en och samma art.

Litteratur – exempel på *Lemna*-arter som har använts vid test

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiatavhandling 1996:2. Institutionen för systemekologi, Stockholms universitet.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29, s. 935–941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 s.

Association Française de Normalisation (AFNOR) (1996). XP T 90–337: Détermination de l’inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten Lemna minor, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

Lemna gibba: ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Förnyat godkännande 1998). S. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96–156. 8 s.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10, s. 1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. m.fl. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5, s. 87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12, s. 481–483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19, s. 2102–2111.

***Lemna*-arter för test kan erhållas från följande institutioner:**

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, KANADA, M5S 3 B2
Tfn +1 4169783641
Fax +1 4169785878
E-post: jacreman@botany.utoronto.ca
Internet: http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695–8002
FÖRENTA STATERNA
Tfn +1 9195157572
E-post: astomp@unity.ncsu.edu

Institutionen före tillämpad miljövetenskap (ITM) Stockholms universitet
SE-106 91 Stockholm
SVERIGE
Tfn +46 86747240
Fax +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
TYSKLAND
E-post: lemna@uba.de
Internet: http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Litteratur

1. Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27, s. 221–287.

2. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Schweiz.

3. Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. Norges lantbruksvetenskapliga forskningsråd, Universitetet i Oslo.

4. Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11, s. 1–14.

5. Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52, s. 7–22.

▼M1

Tillägg 2

Behandling av stamkulturer

Stamkulturer kan förvaras vid låga temperaturer (4–10 °C) under lång tid utan de behöver startas på nytt. Odlingsmediet för *Lemna* kan vara samma som det som används för testen, men för stamkulturer kan andra näringsrika medier användas.

Med jämna mellanrum flyttas ett bestämt antal unga, ljusgröna plantor över aseptiskt till nya odlingskärl med färskt medium. Under de kalla betingelser som här rekommenderas kan subodling utföras i upp till tre månader långa intervall, eftersom det tar längre tid än normalt innan det uppstår överpopulation i kulturen. Man kan alltså vänta längre med att flytta över plantorna till nya odlingskärl för att starta en ny subkultur.

Använd kemiskt rena (syratvättade) och sterila odlingskärl av glas. Hanteringen ska ske med aseptiska metoder. Om stamkulturen kontamineras av t.ex. alger eller svamp, måste man vidta åtgärder för att avlägsna de kontaminerande organismerna. För alger och de flesta andra kontaminerande organismer kan detta åstadkommas genom ytsterilisering. Ett prov tas ur det kontaminerade växtmaterialet och rötterna skärs av. Materialet skakas om kraftigt i rent vatten och hålls sedan nedsänkt i en lösning med 0,5 volymprocent natriumhypoklorit i mellan 30 sekunder och 5 minuter. Växtmaterialet sköljs sedan med sterilt vatten och flyttas över satsvis till odlingskärl med färskt odlingsmedium. Många fronder dör av denna behandling, särskilt om exponeringstiderna är långa, men en del av de överlevande fronderna bör vara fria från kontamination. Dessa kan sedan användas för att ympa nya kulturer.

▼M1

Tillägg 3

Odlingsmedier

Olika odlingsmedier bör användas för *L. minor* och *L. gibba*. För *L. minor*, bör ett medium enligt modifierad svensk standard (SS) användas, och för *L. gibba* bör 20X-AAP användas. Sammansättningarna av respektive medium visas i nedanstående tabell. Vid beredning av medierna ska kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet användas, och vattnet ska vara avjoniserat.

Odlingsmedium enligt modifierad svensk standard (SIS)

— Sterilisera stamlösningarna I–V i autoklav (120 °C, 15 minuter) eller genom membranfiltrering (porstorlek ca 0,2 μm).

— Sterilisera stamlösning VI (och i tillämpliga fall VII) genom membranfiltrering (använd inte autoklav).

— Förvara de sterila stamlösningarna kallt och mörkt. Kassera stamlösningarna I–V efter 6 månader. Kassera stamlösningarna 1–V efter 6 månader. Stamlösning VI (och i tillämpliga fall VII) kan lagras i 1 månad.

Stamlösning	Kemikalie	Koncentration i stamlösning (g/l)	Koncentration i testmedium (mg/l)	Testmedium	
				Grundämne	Koncentration (mg/l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 . 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 . 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 . 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 . 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 . 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA. $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffert)	490	490	—	—

— Tillsätt följande mängder stamlösningar i 900 ml avjoniserat vatten för beredning av 1 liter medium:

— 10 ml I

— 5 ml II

— 5 ml III

— 5 ml IV

▼M1

— 1 ml V

— 5 ml VI

— 1 ml VII (i tillämpliga fall)

Obs! Stamlösning VII (MOPS-buffert) kan behövas för vissa testsubstanser (se sista stycket i avsnitt 1.4).

— Justera pH till 6,5 ± 0,2 med 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH (beroende på utgångsvärdet). Tillsätt sedan avjoniserat vatten så att volymen blir 1 liter.

Odlingsmedium 20Z-AAP

Bered stamlösningar i sterilt destillerat eller avjoniserat vatten.

Förvara de sterila stamlösningarna kallt och mörkt. Då kan de lagras i minst 6–8 veckor.

Bered 5 näringsstamlösningar (A1, A2, A3, B och C) med kemikalier av reagenskvalitet. Tillsätt 20 ml av varje lösning i ca 850 ml avjoniserat vatten. Justera pH till 7,5 ± 0,1 med 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH (beroende på utgångsvärdet). Tillsätt avjoniserat vatten så att volymen blir 1 liter. Filtrera sedan mediet genom ett membranfilter med porstorlek ca 0,2 µm ner i en steril behållare.

Bered odlingsmediet 1–2 dagar före testets genomförande så att pH hinner stabiliseras. Mät pH före testet och justera vid behov genom tillsats av 0,1 M eller 1 M NaOH eller HCl (beroende på utgångsvärdet).

Stamlösning	Kemikalie	Koncentration i stamlösning (g/l) (*)	Koncentration i testmedium (mg/l) (*)	Testmedium	
				Grundämne	Koncentration (mg/l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 . 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 . 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 . 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 . 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 . 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 . 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA . 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 . 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 . 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Om inget annat anges särskilt.

▼M1

Fotnot: Den teoretiskt ideala slutkoncentrationen av bikarbonat ($NaHCO_3$) – som gör att endast en smärre justering av pH krävs – är 15 mg/l, inte 300 mg/l som anges i tabellen ovan. I 20X-AAP, liksom i ringtestet för denna metod, är koncentrationen 300 mg/l etablerad. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey [1999]: The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Steinbergs medium (enligt ISO 20079)

Koncentrationer och stamlösningar

— Det modifierade Steinbergs medium används i ISO 20079 uteslutande för *Lemna minor* (eftersom enbart denna art är tillåten i denna standard). Test har dock visat att goda resultat kan uppnås även med *Lemna gibba*.

— Använd kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet och avjoniserat vatten.

— Bered näringsmediet från stamlösningar eller från ett medium med 10 gånger högre koncentration än testmediet så att mediet får högsta möjliga koncentration utan utfällning.

Tabell 1

pH-stabiliserat Steinbergmedium (modifierat enligt Altenburger)

Kemikalie		Näringsmedium	
Makroelement	Molvikt	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 . 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroelement	Molvikt	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 . 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 . 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 . 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinatriumdihydrat	372,24	1 500,00	4,03

▼M1

Tabell 2

Stamlösningar (makroelement)

1. **Makroelement (koncentrerat 50 ggr)**	g/l
Stamlösning 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Stamlösning 2:	
$MgSO_4 . 7H_2O$	5,00
Stamlösning 3:	
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	14,75

Tabell 3

Stamlösningar (mikroelement)

2. **Mikroelement (koncentrerat 1 000 ggr)**	mg/l
Stamlösning 4:	
H_3BO_3	120,0
Stamlösning 5:	
$ZnSO_4 . 7H_2O$	180,0
Stamlösning 6:	
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	44,0
Stamlösning 7:	
$MnCl_2 . 4H_2O$	180,0
Stamlösning 8:	
$FeCl_3 . 6H_2O$	760,00
EDTA-dinatriumdihydrat	1 500,00

— Stamlösningarna 2 och 3 kan slås samman, liksom 4–7 (se då till att de fastställda koncentrationerna hålls).

— Sterilisera stamlösningarna i autoklav (121 °C, 20 minuter) eller gör en sterilfiltrering med porstorlek 0,2 μm, så kan de lagras längre. Stamlösning 8 bör behandlas genom sterilfiltrering med porstorlek 0,2 μm.

Beredning av slutkoncentrationen av Steinbergs modifierade medium

— Tillsätt 20 ml av stamlösningarna 1, 2 och 3 (tabell 2) i ca 900 ml avjoniserat vatten för att undvika utfällning.

— Tillsätt 1,0 ml av stamlösningarna 4, 5, 6, 7 och 8 (tabell 3).

— pH ska vara 5,5 ± 0,2 (justera genom tillsats av minsta möjliga volym NaOH-lösning eller HCl).

▼M1

— Justera volymen med vatten till 1 000 ml.

— Om stamlösningarna är steriliserade och föreskrivet vatten använts, behövs ingen ytterligare sterilisering. Om slutmediet steriliseras, ska stamlösning 8 tillsättas efter autoklavering (121 °C, 20 minuter).

Beredning av 10 ggr koncentrerat modifierat Steinbergmedium för temporär lagring

— Tillsätt 20 ml av stamlösningarna 1, 2 och 3 (tabell 2) i ca 30 ml vatten för att undvika utfällning.

— Tillsätt 1,0 ml av stamlösningarna 4, 5, 6, 7 och 8 (tabell 3). Justera med vatten till 100 ml.

— Om stamlösningarna är steriliserade och föreskrivet vatten använts behövs ingen ytterligare sterilisering. Om slutmediet steriliseras, ska stamlösning 8 tillsättas efter autoklavering (121 °C, 20 minuter).

— pH (vid slutkoncentration) ska vara 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMIDLARVER MED SPIKAT SEDIMENT

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 218 (2004). Syftet med testmetoden är att bedöma effekterna av långvarig kemikalieexponering på sedimentlevande larver i sötvatten av fjädermyggor *Chironomus* sp. Metoden är baserad på befintliga toxicitetstestprotokoll för *Chironomus riparius och Chironomus tentans* som har tagits fram i Europa (1) (2) (3) och Förenta staterna (4) (5) (6) (7) (8) samt ringtestats (1) (6) (9). Även övriga väldokumenterade chironomider kan användas, t.ex. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Exponeringsscenariot i denna testmetod går ut på att spika sediment med testämnet. Valet av lämpligt exponeringsscenario beror på den avsedda tillämpningen för testet. Scenariot med spikning av sediment är avsett att simulera ackumulerade nivåer av kemikalier som finns kvar i sedimentet. Detta exponeringssystem innebär spikning av sediment i ett testsystem med sediment- och vattenfas.

3. Ämnen som behöver testas på sedimentlevande organismer är sådana som i allmänhet blir kvar i sedimentet under långa tidsperioder. De sedimentlevande organismerna kan exponeras via ett antal rutter. Den relativa betydelsen av varje exponeringsrutt och den tid det tar för var och en av dem att bidra till de totala toxiska effekterna beror på den berörda kemikaliens fysikalkemiska egenskaper. För starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller för ämnen som binds kovalent till sedimentet, kan förtäring av förorenad föda vara en betydande exponeringsrutt. För att toxiciteten hos starkt lipofila ämnen inte ska underskattas kan tillsättning av föda till sedimentet före applicering av testämnet övervägas. För att alla potentiella exponeringsrutter ska beaktas har denna testmetod fokus på långvarig exponering. Testets längd är 20–28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 28–65 dagar för C. *tentans*. Om korttidsdata krävs för ett specifikt ändamål, t.ex. för att undersöka effekterna av en instabil kemikalie, kan tilläggsreplikat avlägsnas efter tio dagar.

4. De endpoints som mäts är det totala antalet kläckta vuxna exemplar och utvecklingstiden fram till kläckning. Det rekommenderas att mätningar av larvernas överlevnad och tillväxt endast görs efter en tiodagarsperiod i fall där ytterligare korttidsdata krävs, med användning av ytterligare replikat enligt vad som är lämpligt.

5. För detta test rekommenderas syntetiskt sediment. Syntetiskt sediment har flera fördelar jämfört med naturliga sediment:

   — Variationen mellan experiment reduceras eftersom syntetiskt sediment bildar en reproducerbar ”standardmatris”, och behovet av att få fram oförorenade och rena sediment elimineras.

   — Testningen kan inledas när som helst utan att beakta säsongvariationer i testsedimentet och det behövs ingen förbehandling av sediment för att få bort naturligt förekommande fauna. När syntetiskt sediment används uppstår heller inte kostnader för insamling på fältet av tillräckliga mängder sediment för rutintestning.

   — Användning av syntetiskt sediment ger möjlighet till jämförelser av toxicitet och därmed klassificering av ämnen.

6. Definitioner finns i tillägg 1.

▼M4

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Chironomidlarver i första larvstadiet exponeras för ett urval koncentrationer av testkemikalien i sediment-vattensystem. Testämnet spikas i sedimentet och därefter tillförs larverna i testkärlen som har stabiliserade sediment- och vattenkoncentrationer. Kläckning av fullbildade myggor och utvecklingshastighet mäts i slutet av testet. Överlevande larver och deras vikt kan också mätas efter tio dagar om så krävs (med användning av ytterligare replikat enligt det som är lämpligt). Dessa data analyseras med användning av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka × % minskning av antalet fullbildade myggor eller av larvernas överlevnad eller tillväxt (t.ex. EC_{15}, EC_{50} osv.) eller genom användning av statistisk hypotesprövning för att bestämma NOEC/LOEC. Hypotesprövningen kräver en jämförelse mellan effektvärden och kontrollvärden med användning av statistiska test.

INFORMATION OM TESTÄMNET

8. Testämnets vattenlöslighet, ångtryck, uppmätta eller beräknade fördelning i sedimentet samt stabilitet i vatten och sediment bör vara kända. Det bör finnas en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testämnet i överliggande vatten, porvatten och sediment med känd och rapporterad exakthet och detektionsgräns. Det är också bra att känna till testämnets strukturformel och renhet. Hur testämnet agerar kemiskt (t.ex. upplösning, abiotisk och biotisk nedbrytning osv.) hör också till den information som är användbar. Närmare vägledning för testning av ämnen vars fysikalkemiska egenskaper försvårar detta test finns i (12).

REFERENSKEMIKALIER

9. Referenskemikalier kan testas periodiskt för att säkerställa att testprotokollet och testbetingelserna är tillförlitliga. Exempel på toxiska referensämnen som med framgång har använts i ringtest och valideringsstudier är lindan, trifluranid, pentaklorfenol, kadmiumklorid och kaliumklorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTETS GILTIGHET

10. För att testet ska vara giltigt gäller följande villkor:

— Kläckningen av vuxna exemplar i kontrollkärlen måste vara minst 70 % i slutet av testet (1) (6).

— Kläckningen av vuxna exemplar av *C. riparius* och *C. yoshimatsui* i kontrollkärlen bör inträffa 12–24 dagar efter att de har införts i kärlen, för *C. tentans* krävs en period på 20–65 dagar.

— Vid slutet av testet bör pH och koncentrationen upplöst syre mätas i varje kärl. Syrekoncentrationen bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) vid den använda temperaturen och pH i överliggande vatten bör vara 6–9 i alla testkärl.

— Variationen i vattentemperatur får inte vara större än ± 1,0 °C. Vattentemperaturen kan hållas under kontroll genom att göra testningen i ett isotermiskt utrymme, varvid rumstemperaturen bör kontrolleras med lämpliga tidsintervall.

▼M4

METODBESKRIVNING

Testkärl

11. Testet görs i 600 ml-glasbägare med 8 cm i diameter. Även andra slags kärl kan användas, men då måste det gå att garantera att överliggande vatten och sediment har lämpliga djup. Sedimentytan bör vara tillräckligt stor för att ge 2–3 cm^2 per larv. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och överliggande vattnets djup bör vara 1:4. Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testsystemet bör vara gjorda av glas eller annat kemiskt inert material (t.ex. teflon).

Val av arter

12. Den art som används i testet ska helst vara *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan också vara lämplig, men den är svårare att hantera och kräver en längre testperiod. Även *Chironomus yohimatsui* kan användas. I tillägg 2 finns närmare uppgifter om odlingsmetoder för *Chironomus riparius*. Information om odlingsbetingelser finns också för andra arter, t.ex. *Chironomus tentans* (4) och *Chironomus yoshimatsui* (11). Arternas identifiering måste bekräftas före testningen men är inte nödvändig före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Sediment

13. Helst ska syntetisk sediment användas. Om naturligt sediment används bör dess egenskaper bestämmas (minst pH, halten organiskt kol, och gärna även andra parametrar såsom förhållandet C/N och granulometri). Sedimentet måste även vara fritt från föroreningar och andra organismer som kan konkurrera med eller konsumera chironomiderna. Dessutom rekommenderas att naturligt sediment som är avsett att användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Följande syntetiska sediment, baserat på den syntetiska jord som används i testmetod C.8 (14), rekommenderas för detta test (1) (15) (16):

a) 4–5 % (torrvikt) torv så nära pH 5,5–6 som möjligt; det är viktigt att använda endast lufttorkad och finmalen torv i pulverform (partikelstorlek ≤ 1 mm).

b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).

c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största delen bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm).

d) Avjoniserat vatten tillsätt så att blandningen får en slutlig fukthalt på 30–50 %.

e) Kemiskt rent kalciumkarbonat $CaCO_3$) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till 7,0 ± 0,5. Den slutliga blandningens kolhalt bör vara 2 % ± 0,5 % och kan justeras med hjälp av lämpliga mängder torv och sand, enligt punkterna a och c.

14. Torv, kaolinlera och sand ska härröra från kända källor. Sedimentkomponenterna bör kontrolleras för att bekräfta avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar osv.) Ett exempel på hur syntetiskt sediment kan tillredas beskrivs i tillägg 3. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att demonstrera att tillsats av överliggande vatten inte leder till att sedimentets beståndsdelar separerar (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditioneras tillräckligt.

▼M4

Vatten

15. Allt vatten som uppfyller de kemiska kriterierna för godtagbart utspädningsvatten (se tilläggen 2 och 4) är lämpligt som testvatten. Allt lämpligt vatten, naturligt vatten (ytvatten eller grundvatten), rekonstituerat vatten (se tillägg 2) och avklorerat kranvatten är godtagbart som odlings- och testvatten om chironomiderna överlever i det under odling, acklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vid teststart ska testvattnets pH vara mellan 6 och 9 och totalhårdheten får inte vara högre än 400 mg/l uttryckt som $CaCO_3$. Om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas). Samma typ av vatten bör användas under hela testningen. De vattenkvalitetsegenskaper som förtecknas i tillägg 4 bör mätas minst två gånger om året eller om man misstänker att egenskaperna har ändrats betydligt.

Stamlösningar – spikat sediment

16. Spikat sediment med vald koncentration bereds i regel genom tillsättning av en lösning av testämnet direkt i sedimentet. En stamlösning av testämnet upplöst i avjoniserat vatten blandas med det syntetiska sedimentet i en rullkvarn, matningsblandare eller manuellt. Om testämnet har låg löslighet i vatten kan det lösas upp i minsta möjliga volym lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform). Denna lösning blandas sedan med 10 g fin kvartssand för ett testkärl. Lösningsmedlet får avdunsta och måste vara helt avlägsnat ur sanden, och därefter blandas sanden med lämplig mängd sediment per testbägare. Endast ämnen som avdunstar lätt får användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testämnet. Här bör noteras att den sand som följer med testämnet och sandblandningen måste beaktas när sedimentet förbereds (dvs. sedimentet ska ha mindre mängd sand). Det är viktigt att se till att testämnet som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt inom sedimentet. Vid behov kan delprover analyseras för att bestämma homogeniteten.

TESTETS UTFORMNING

17. Testets utformning avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet larver per kärl. Här beskrivs utformningar för uppskattning av effektkoncentration, uppskattning av NOEC och för gränstest.

Utformning för regressionsanalys

18. Effektkoncentrationen (t.ex. EC_{15}, EC_{50}) och det koncentrationsområde som är relevant för testämnet bör omfattas av de koncentrationer som ingår i testet. Allmänt taget gäller att exaktheten och särskilt giltigheten för uppskattningar av effektkoncentrationer (EC_x) förbättras när effektkoncentrationen ligger inom området för de koncentrationer som testas. Extrapolering under lägsta positiva koncentration eller över högsta koncentration bör undvikas. Preliminära test kan användas för att hitta rätt koncentrationsområde (se punkt 27).

▼M4

19. Om EC_x ska uppskattas bör testet omfatta minst fem koncentrationer och tre replikat för varje koncentration. Det är under alla omständigheter tillrådligt att använda tillräckligt många testkoncentrationer för att få en god modell-uppskattning. Faktorn mellan koncentrationer bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-responskurvan har liten lutning). Antalet replikat per behandling kan minskas om antalet testkoncentrationer med olika respons ökas. En ökning av antalet replikat eller minskning av test-koncentrationsintervall tenderar att leda till ett smalare konfidensintervall för testet. Ytterligare replikat krävs om en uppskattning ska göras av larvernas överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod.

Upplägg för uppskattning av NOEC/NOEC

20. Om LOEC eller NOEC ska uppskattas bör fem testkoncentrationer med minst fyra replikat användas och faktorn mellan koncentrationerna bör inte vara större än två. Antalet replikat bör vara tillräckligt för att säkerställa tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). För uppskattning av utvecklingshastighet är det i regel lämpligt med variansanalys (ANOVA), såsom Dunnets eller Williams test (17) (18) (19) (20). För kläckningsfrekvens kan ett Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (med Bonferroni-korrigering) eller ett Mantel-Haenszel-test användas.

Gränstest

21. Gränstest kan göras (en testkoncentration och kontroll) om inga effekter framkommit vid det preliminära testet för att fastställa testområde. Syftet med gränstest är att genomföra ett test vid en koncentration som är tillräckligt hög för att man ska kunna utesluta eventuella toxiska effekter av testämnet, och gränsen sätts vid en koncentration som inte förväntas förekomma i någon situation. 1 000 mg/kg (torrvikt) rekommenderas. I regel krävs minst sex replikat både för behandling och kontroll. Man måste kunna demonstrera tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). Eftersom t-test ger kvantitativ respons (utvecklingshastighet och vikt) är t-test en lämplig statistisk metod förutsatt att data uppfyller testkraven (normalitet, homogena varianser osv.). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians eller ett icke-parametriskt test, såsom Wilcoxon-Mann-Whitneys test. För kläckningsfrekvens är det lämpligt att använda Fischers exakta test.

FÖRFARANDE

Exponeringsbetingelser

Beredning av systemet med spikat sediment och vatten

22. Det förfarande för spikning som beskrivs i testmetod C.8 (Toxicitet för daggmaskar) rekommenderas för applicering av testämnet (14). Spikade sediment placeras i kärlen och överliggande vatten tillsätts så att förhållandet mellan sediment och vatten är 1:4 (se punkterna 11 och 15). Sedimentets djup bör vara 1,5–3 cm. För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen, kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts, varefter plattan avlägsnas omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga.

23. Testkärlen bör vara täckta (t.ex. med glasplattor). Vid behov fylls under testets gång vatten på till ursprunglig volym för att kompensera för avdunstning. Detta bör göras med destillerat eller avjoniserat vatten för att förebygga ackumulering av salter.

▼M4

Stabilisering

24. Efter beredning av spikat sediment och överliggande vatten rekommenderas att testämnet får fördelas från vattenfasen till sediment (3) (4) (6) (13). Detta bör helst göras med samma temperatur- och luftningsbetingelser som används vid testningen. Stabiliseringstiden beror på sedimentet och kemikalien, och kan variera mellan några timmar och flera dagar, i sällsynta fall upp till flera veckor (4–5 veckor). Eftersom en lång stabiliseringstid kan leda till att vissa kemikalier sönderfaller, eftersträvas här inte jämvikt; i stället rekommenderas en stabiliseringstid på 48 timmar. I slutet av denna jämviktsperiod ska testämnets koncentration mätas i det överliggande vattnet, porvattnet och sediment, åtminstone för den högsta koncentrationen och en lägre koncentration (se punkt 38). Dessa analytiska bestämningar av testämnet gör det möjligt att beräkna massbalans och uttrycka resultaten på grundval av uppmätta koncentrationer.

Tillförsel av testorganismer

25. Fyra till fem dagar innan testorganismerna tillförs testkärlen ska äggmassorna avlägsnas från odlingarna och placeras i små kärl i odlingsmedium. Åldrat medium från stamodling eller färskt berett medium kan användas. Om färskt medium används bör en liten mängd föda, t.ex. grönalger och/eller några droppar filtrat från en finmald suspension av fiskfoder i flingform tillsättas odlingsmediet (se tillägg 2). Endast färska äggmassor får användas. I regel börjar larverna kläckas några dagar efter att äggen har lagts (2–3 dagar för *Chironomus riparius* vid 20 °C och 1–4 dagar för *Chironomus tentans* vid 23 °C och *Chironomus yoshimatsui* vid 25 °C), och larvernas tillväxt sker i fyra stadier på 4–8 dagar per stadium. För testet ska första stadiets larver användas (2–3 eller 1–4 dagar efter kläckningen). Bestämning av larvstadium kan möjligen göras genom mätning av huvudkapseldiameter (6).

26. Tjugo första stadiets larver fördelas slumpvis till varje testkärl som innehåller spikat sediment och vatten, med användning av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet måste stoppas medan larverna tillsätts testkärlen och hållas stoppad i ytterligare 24 timmar efter tillsättningen (se punkterna 25 och 32). Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 60 för uppskattning av EC-punkt och 80 för bestämning av NOEC.

Testkoncentrationer

27. Ett preliminärt test kan användas för att fastställa koncentrationerna för det definitiva testet. För detta ändamål används en serie brett spridda koncentrationer av testämnet. För att få samma ytdensitet per chironomid som ska användas för det slutliga testet, exponeras chironomiderna för varje koncentration av testämnet under en period som ger möjlighet att uppskatta lämpliga testkoncentrationer. Inga replikat krävs.

28. Testkoncentrationerna för det definitiva testet baseras på resultaten från det preliminära testet. Det ska finnas minst fem testkoncentrationer som väljs enligt beskrivningen i punkterna 18–20.

▼M4

Kontrollkärl

29. Kontrollkärl som inte innehåller testämne utan enbart sediment bör ingå i testet med lämpligt antal replikat (se punkterna 19 och 20). Om lösningsmedel har använts för applicering av testämnet (se punkt 16) bör det också finnas kontrollkärl med sediment och lösningsmedel.

Testsystem

30. De system som används är statiska. Semistatiska system eller genomflödessystem med intermittent eller kontinuerlig förnyelse av överliggande vatten kan användas i undantagsfall, t.ex. om vattenkvalitetspecifikationerna inte är lämpliga för testorganismen eller påverkar den kemiska jämvikten (t.ex. om syrenivåerna blir för låga, koncentrationen av utsöndrade produkter blir för hög eller om mineraler släpps ut från sedimentet och påverkar pH och/eller vattenhårdheten). I regel är det dock tillräckligt och rekommendabelt att använda andra metoder för kompensering av kvaliteten på överliggande vatten, såsom luftning.

Foder

31. Larverna bör ges foder helst dagligen eller minst tre gånger per vecka. Fiskfoder (suspension i vatten eller finmalt foder, t.ex. Tetra-Min eller Tetra-Phyll, se närmare i tillägg 2) i mängder om 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg för C. *yoshimatsui*) per larv per dag anses vara lämpligt för unga larver under de tio första dagarna. För äldre larver kan det krävas lite större mängd: 0,5–1 mg per larv och dag bör vara tillräckligt för återstoden av testet. Mängden bör minskas för alla behandlingar och kontroller om det uppstår svamptillväxt eller mortalitet observeras i kontrollerna. Om svamptillväxten inte kan stoppas måste testet upprepas. Vid testning av starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller ämnen som är kovalent bundna till sedimentet, kan mängden foder som krävs för att säkerställa överlevnad och naturlig tillväxt för organismerna tillsättas i det syntetiska sedimentet före stabiliseringsperioden. Då ska växtmaterial användas i stället för fiskfoder, t.ex. 0,5 % (torrvikt) finmalda löv från t.ex. brännässla (*Urtica dioica*), mullbär (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller annat växtmaterial (*Cerophyl* eller alfacellulosa).

Inkubationsbetingelser

32. Skonsam luftning av överliggande vatten i testkärlen införs helst 24 timmar efter tillsättning av larverna och får pågå genom hela testet (se till att halten upplöst syre inte faller under 60 % av luftmättnadsvärdet ASV). Luftningen görs med hjälp av en Pasteur-glaspipett som är fäst 2–3 cm ovanför sedimentskiktet (en eller ett fåtal bubblor per sekund). Vid testning av flyktiga kemikalier kan man överväga att utesluta luftning av sediment-vattensystemet.

33. Testet genomförs vid konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). För C. *tentans* och C. *yoshimatsui* rekommenderas temperaturer på 23 °C respektive 25 °C (± 2 °C). En ljusperiod på 16 timmar används och ljusintensiteten ska vara 500–1 000 lux.

▼M4

Exponeringstid

34. Exponeringen inleds när larver tillsätts i spikade kärl och kontrollkärl. Den maximala exponeringstiden är 28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 65 dagar för C. *tentans*. Om myggor kläcks tidigare, kan testet avslutas efter minst fem dagar efter att det sista vuxna exemplaret har kläckts i kontrollen.

Observationer

Kläckning

35. Utvecklingstiden och totalantalet fullbildade han- och honmyggor bestäms. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

36. Testkärlen bör granskas visuellt minst tre gånger i veckan för att bedöma förekomsten av onormalt beteende (t.ex. exemplar som lämnar sedimentet, ovanligt simmande) jämfört med kontrollen. Under perioden för förväntad kläckning är det nödvändigt att dagligen räkna antalet kläckta exemplar. Kön och antal fullbildade exemplar registreras dagligen. Efter identifiering avlägsnas myggorna från kärlen. Ägg som har deponerats före testets slutförande bör registreras och därefter avlägsnas för att förhindra att larver på nytt introduceras i sedimentet. Likaså ska registrering göras av antalet synliga puppor som inte har kläckts. Vägledning om övervakning av kläckning finns i tillägg 5.

Tillväxt och överlevnad

37. Om det krävs data om överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod bör ytterligare testkärl införlivas från början, så att dessa därefter kan användas. Larverna i sedimentet från dessa tilläggskärl tillvaratas genom sållning med ett 250 μm-såll. Kriterierna för död är orörlighet eller utebliven reaktion på mekanisk stimulans. Larver som inte tillvaratas bör räknas som döda (larver som har dött i början av testet kan ha sönderdelats av mikrober). Torrvikten (askfri) för överlevande larver per testkärl bestäms och den genomsnittliga individuella torrvikten per kärl beräknas. Det är bra att bestämma vilket stadium överlevande larver tillhör, och för detta kan mätning av huvudkapselns bredd användas.

Analytiska mätningar

Testämnets koncentration

38. Innan testet inleds, dvs. före tillsättning av larver, tas prover av bulksediment från minst ett kärl per behandling för analytisk bestämning av testämnets koncentration i sedimentet. Man bör åtminstone analysera prover av överliggande vatten, porvatten och sediment i början (se punkt 24) och i slutet av testet, för den högsta koncentrationen och en lägre koncentration. Dessa bestämningar av testämneskoncentrationen ger information om testämnets beteende/fördelning i vatten-sedimentsystemet.

39. Om mellanliggande mätningar görs (t.ex. dag 7) och om det för analysen krävs stora prover som inte kan tas från testkärlen utan att testsystemet påverkas, bör de analytiska bestämningarna göras på prover som tas från extra testkärl som behandlas på samma sätt (inklusive förekomst av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer.

▼M4

40. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4 °C i 30 minuter är det rekommenderade förfarandet för att isolera porvatten. Om det har demonstrerats att testämnet inte adsorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet därför att provet är för litet.

Fysikalkemiska parametrar

41. Testkärlens pH och temperatur bör mätas på lämpligt sätt (se punkt 10). Hårdhet och ammonium bör mätas i kontrollerna och ett testkärl vid den högsta koncentrationen i början och slutet av testet.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Syftet med detta test är att bestämma testämnets effekt på utvecklingshastigheten och totalantalet fullbildade han- och honmyggor eller, om det gäller ett tiodagarstest, effekterna på larvernas överlevnad och vikt. Om det inte finns indikationer på statistiskt avvikande känslighet för hanar och honor, kan resultaten poolas för statistiska analyser. Känslighetsskillnaderna mellan hanar och honor kan bedömas statistiskt, t.ex. genom ett ”χ^2-r × 2 table test”. Larvernas överlevnad och genomsnittlig individuell torrvikt per kärl måste bestämmas efter tio dagar där detta krävs.

43. Effektkoncentrationerna uttryckta och baserade på torrvikt beräknas helst på grundval av uppmätta sedimentkoncentrationer vid testets början (se punkt 38).

44. För att beräkna en punktvis uppskattning av EC_{50} eller något annat EC_x-värde, kan statistiken per kärl användas som äkta replikat. Vid beräkning av konfidensintervallet för ett EC_x-värde bör variansen mellan kärl beaktas, eller så bör man påvisa att variansen är så liten att den kan ignoreras. Om modellen anpassas med minsta kvadratmetoden bör transformation tillämpas på den kärlvisa statistiken i syfte att förbättra variansens homogenitet. EC_x-värdena bör dock beräknas när responsen har transformerats tillbaka till det ursprungliga värdet.

45. När syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC genom hypotestestning, måste variansen mellan kärl beaktas, t.ex. genom nästad ANOVA. Alternativt kan mer robust testning (21) vara lämplig i situationer där de vanliga ANOVA-antagandena inte gäller.

Kläckningsfrekvens

46. Kläckningsfrekvenser är dikotoma (tvåpunktsfördelade) data och kan analyseras genom Cochran-Armitage test som tillämpas på step-down-grund där monoton dos-respons förväntas och dessa data stämmer överens med förväntningen. Om inte, kan Fishers exakta test eller ett Mantel-Haenszel-test med Bonferroni-Holm-korrigerade p-värden användas. Om det finns bevis på större variation mellan replikat inom samma koncentration än det som en binomial fördelning skulle indikera (ofta kallad extra-binomial fördelning), bör ett robust Cochran-Armitage-test eller Fischers exakta test användas, enligt det som föreslås i punkt 21.

▼M4

Det totala antalet myggor som kläckts per kärl, n_e, bestäms och divideras med antalet tillsatta larver, n_a enligt följande:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

där:

ER = kläckningsfrekvens

n_e = antalet myggor som kläckts per kärl

n_a = antalet larver som tillsatts per kärl

47. Ett alternativ som bäst lämpar sig för stora provstorlekar, när det finns extra-binomial varians, är att behandla kläckningsfrekvensen som en kontinuerlig respons och använda förfaranden såsom William-test när monoton dos-respons förväntas och stämmer överens med dessa data för kläckningsfrekvens. Dunnett-test är lämpligt i fall där det inte är hållbart med monotonicitet. I detta sammanhang definieras begreppet ”stort prov” som ett prov där antalet kläckta och antalet inte kläckta överstiger fem, per replikatkärl.

48. Vid användning av ANOVA-metoder bör värdena för kläckningsfrekvens först transformeras genom arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukeytransformation för att få en ungefärlig normalfördelning och jämna ut varianserna. Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (Bonferroni) eller Mantel-Haenszel-test kan användas när absoluta frekvenser används. För att göra arcsin-sqrt-transformation tar man inverterad sinus (sin^{-1}) av kvadratroten av kläckningsfrekvensen.

49. EC_x-värden för kläckningsfrekvenser beräknas med regressionsanalys (t.ex. probit (22), logit, Weibull, lämplig kommersiell mjukvara eller dylikt). Om regressionsanalysen inte lyckas (om det t.ex. finns mindre än två partiella responser) används andra icke-parametriska metoder såsom glidande medelvärde eller enkel interpolering.

Utvecklingshastighet

50. Med genomsnittlig utvecklingstid avses den genomsnittliga tidsomfattningen mellan tillsättning av larver (testdag 0) och kläckningen av den experimentella kohorten myggor (för beräkning av den faktiska utvecklingstiden bör man beakta larvernas ålder vid tillsättningstidpunkten). Värdet för utvecklingshastighet är det reciproka värdet av tidsenheten för utveckling (enhet: 1/dag) och representerar den andel larvutveckling som sker per dag. Utvecklingshastigheten är det mått som helst ska användas för utvärdering av dessa sedimenttoxicitetsstudier eftersom variansen är lägre och homogenare samt närmare normalfördelningen i jämförelse med utvecklingstiden. Kraftfulla parametriska testförfaranden kan alltså användas baserade på utvecklingshastighet hellre än på utvecklingstid. För utvecklingshastighet som en kontinuerlig respons kan EC_x-värden uppskattas med hjälp av regressionsanalys (t.ex. (23), (24)).

51. För efterföljande statistiska test antas antalet myggor observerade på inspektionsdag × ha kläckts i mitten av tidsintervallet mellan dag × och dag x-1 (l är inspektionsintervallets längd, i regel 1 dag). Genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl (x) beräknas enligt följande:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

där:

$\bar{x}$: genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl

i: index för inspektionsintervall

m: maximiantalet inspektionsintervall

f_i: antalet myggor som kläckts under inspektionsintervallet i

n_e: totalantalet myggor som kläckts i slutet av experimentet (= $\sum f_i$)

x_i: utvecklingshastigheten för myggor som kläckts under intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

där:

dag_i: inspektionsdag (dagar från appliceringen)

l_i: inspektionsintervallets längd i (dagar, i regel 1 dag)

Testrapport

52. Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter:

Testämne:

— Fysikalisk natur och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (vattenlöslighet, ångtryck, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om tillgänglig), stabilitet i vatten osv.).

— Kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) samt renhet och analysmetod för kvantifiering av testämnet.

Testarter:

— Organismer som använts för testet: art, vetenskapligt namn, ursprung och odlingsbetingelser.

— Information om hantering av äggmassor och larver.

— Organismernas ålder när de tillförs testkärlen.

Testbetingelser:

— Sediment som använts (naturligt eller syntetiskt).

— För naturligt sediment, insamlingsplatsens belägenhet och beskrivning av sedimentet, inbegripet i mån av möjlighet föroreningshistoria och egenskaper: pH, halten organiskt kol, C/N-kvot och granulometri (om lämpligt).

— Beredning av syntetiskt sediment: beståndsdelar och egenskaper (halten organiskt kol, pH, fukthalt osv. vid testets början).

— Beredning av testvatten (om rekonstituerat vatten används) och egenskaper (syrehalt, pH, konduktivitet, hårdhet osv. vid testets början).

— Sedimentets och överliggande vattnets djup.

— Volymen för överliggande vatten och porvatten, vikten för vått sediment med och utan porvatten.

▼M4

— Testkärl (material och storlek).

— Metod för spikning av sediment: testkoncentrationer, antalet replikat och, i förekommande fall, använt lösningsmedel.

— Fasen för stabilisering av jämvikt i systemet med spikat sediment och vatten: varaktighet och betingelser.

— Inkubationsbetingelser: temperatur, ljuscykel och intensitet samt luftning (frekvens och intensitet).

— Detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringsschema.

Resultat:

— Nominella testkoncentrationer, uppmätta testkoncentrationer och resultaten av alla analyser för bestämning av testämnets koncentration i testkärl.

— Vattenkvaliteten i testkärlen – pH, temperatur, upplöst syre, hårdhet och ammonium.

— Ersättning av avdunstat testvatten, i förekommande fall.

— Antalet kläckta hon- och hanmyggor per kärl och dag.

— Antalet larver som inte utvecklats till myggor, per kärl.

— Genomsnittlig individuell torrvikt för larver per kärl och per stadium, om lämpligt.

— Procentandel kläckta exemplar per replikat- och testkoncentration (han- och honmyggor poolade).

— Genomsnittlig utvecklingshastighet för fullbildade myggor per replikat och behandlingsnivå (han- och honmyggor poolade).

— Uppskattning av toxiska endpoints t.ex. EC_x (och associerade konfidensintervall), NOEC och/eller LOEC och de statistiska metoder som använts för bestämning av dem.

— Diskussion av resultaten, inbegripet inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) BBA (1995), ”Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system”, redigerat av M. Streloke och H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. m.fl. 1994), ”Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances”, Slutlig rapport till Europeiska kommissionen, rapport nr EC 3738, augusti 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), ”Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments”, WOSTA Workshop, Nederländerna.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), ”Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates”, s. 1125–1241, *ASTM International 2002 Annual Book of Standards*, vol. 11.05, ”Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides”, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (1997), ”Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method”, *Report SPE 1/RM/32*, december 1997.

▼**M4**

(6) US-EPA (2000), ”Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates”, andra utgåvan, *EPA 600/R-99/064*, mars 2000, revidering av första utgåvan juni 1994.

(7) *US-EPA/OPPTS 850.1735* (1996), ”Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates”.

(8) *US-EPA/OPPTS 850.1790* (1996), ”Chironomid Sediment toxicity Test”.

(9) Milani D., Day K. E., McLeay D. J. och Kirby R. S. (1996), ”Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada’s biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*” Technical Report, Environment Kanada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y. (1997), ”Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*”, *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4), s. 345–350.

(11) Kawai K. (1986), ”Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera)”, *Jp. J. Sanit. Zool.* 37 (1), s. 47–57.

(12) OECD, 2000, ”Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, Nr 23.

(13) Environment Kanada (1995), ”Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant”, *Report EPS 1/RM/30, september 1995*.

(14) Testmetod C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

(15) Suedel B. C. och Rodgers J. H. (1994), ”Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing”, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 1163–1175.

(16) Naylor C. och Rodrigues C., (1995), ”Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment”, *Chemosphere* 31, s. 3291–3303.

(17) Dunnett C. W. (1964), ”A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control”, *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50, s. 1096–1121.

(18) Dunnett C. W. (1964), ”New tables for multiple comparisons with a control”, *Biometrics*, 20, s. 482–491.

(19) Williams D. A. (1971), ”A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control”, *Biometrics*, 27, s. 103–117.

(20) Williams D. A. (1972), ”The comparison of several dose levels with a zero dose control”, *Biometrics*, 28, s. 510–531.

(21) Rao J. N. K. och Scott A. J. (1992), ”A simple method for the analysis of clustered binary data”, *Biometrics*, 48, s. 577–585.

(22) Christensen E. R. (1984), ”Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model”, *Water Research* 18, s. 213–221.

(23) Bruce och Versteeg (1992), ”A statistical procedure for modelling continuous toxicity data”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, s. 1485–1494.

(24) Slob W. (2002), ”Dose-response modelling of continuous endpoints”, *Toxicol. Sci.* 66, s. 298–312.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

syntetiskt sediment: rekonstituerat, konstgjort sediment som är en blandning av material avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

överliggande vatten: det vatten som hålls ovanför sedimentet i testkärlet.

porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- och jordpartiklar.

spikat sediment: sediment med tillsatt testämne.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Rekommendationer för odling av *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larver kan odlas i kristalliseringskärl eller stora behållare. Fin kvartssand sprids som ett tunt skikt på cirka 5–10 mm på behållarens botten. Även kiselgur (t.ex. Merck, Art. 8117) har visat sig vara ett lämpligt substrat (det räcker med ett tunt lager på några mm). Lämpligt vatten tillsätts till ett djup på flera cm. Vattennivåerna bör fyllas på efter behov för att ersätta avdunstning och förebygga uttorkning. Vattnet kan vid behov ersättas. Det bör finnas en skonsam luftning. De kärl som innehåller larver bör hållas i en lämplig bur som hindrar vuxna exemplar från att rymma. Buren bör vara tillräckligt stor för att de vuxna exemplaren ska kunna svärma, annars kan kopulation utebli (minimum är cirka 30 × 30 × 30 cm).

2. Burarna ska hållas i rumstemperatur eller ett tempererat utrymme vid 20 ± 2 °C med en ljusperiod på 16 timmar (intensitet ca 1 000 lux) och 8 timmar mörker. Det har rapporterats att luftfuktighet under 60 % RH kan hämma reproduktion.

Utspädningsvatten

3. Allt lämpligt naturligt eller syntetiskt vatten kan användas. Ofta används källvatten, avklorerat kranvatten och artificiella medier (t.ex. Elendt M4 eller M7, se nedan). Vattnet måste luftas före användningen. Vid behov kan odlingsvattnet förnyas genom att försiktigt hälla eller sifonera använt vatten från odlingskärlen utan att förstöra larvrören.

Utfodring av larver

4. *Chironomus*-larverna ges fiskfoder i flingform (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller motsvarande patenterat märke), cirka 250 mg per kärl och dag. Fodret kan ges i form av torrt malet pulver eller som suspension i vatten: 1,0 g flingfoder blandas med 20 ml utspädningsvatten till en homogen blandning. Beredningen kan ges med en dosering på cirka 5 ml per kärl och dag (skaka om före användning). Äldre larver kan få en större dos.

5. Utfodringen justeras enligt vattenkvaliteten. Om odlingsmediet blir grumligt bör dosen sänkas. Foderdoseringen måste övervakas noggrant. För liten mängd leder till att larverna emigrerar mot vattenkolumnen och för stor mängd leder till ökad mikrobiell aktivitet och lägre syrekoncentrationer. Båda omständigheterna kan leda till minskad tillväxt.

6. Även celler av vissa grönalger (t.ex. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kan tillsättas när nya odlingskärl läggs upp.

Utfodring av vuxna exemplar

7. Vissa testutövare har föreslagit att bomullskompresser indränkta i mättad sukroslösning kan användas som foder för vuxna exemplar.

▼M4

Kläckning

8. Vid 20 ± 2 °C börjar vuxna exemplar kläckas i odlingskärlen efter cirka 13–15 dagar. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

Äggmassor

9. När vuxna exemplar finns i odlingsburen bör alla larver i odlingskärlen kontrolleras tre gånger per vecka för att se om gelatinösa äggmassor har deponerats. Om sådana upptäcks, bör de avlägsnas försiktigt. Äggmassorna överförs till ett litet kärl som innehåller ett prov av odlingsvattnet. De används sedan för att starta nya odlingskärl (t.ex. 2–4 äggmassor per kärl) eller för toxicitetstest.

10. Första stadiets larver bör kläckas efter 2–3 dagar.

Uppläggning av nya odlingskärl

11. När odlingarna är etablerade bör det vara möjligt att lägga upp en färsk larvodling veckovis eller med längre intervall beroende på testningskraven, och avlägsna äldre kärl efter att vuxna myggor har kläckts. På detta sätt fås regelbunden tillgång till vuxna exemplar med minimal insats.

Beredning av testlösningarna M4 och M7

12. M4-mediet upptäcktes av Elendt (1990). M7-mediet bereds på samma sätt som M4-mediet med undantag för de ämnen som anges i tabell 1, för vilka koncentrationerna är fyra gånger lägre i M7 jämfört med M4. En publikation om M7-mediet är under arbete (Elendt, personlig kommunikation). Testlösningen ska inte beredas enligt Elendt och Bias (1990) eftersom de angivna koncentrationerna av $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 och K_2HPO_4 inte är lämpliga.

Beredning av M7-medium

13. Varje stamlösning (I) bereds individuellt och en kombinerad stamlösning (II) bereds av dessa stamlösningar (I) (se tabell 1). 50 ml av den kombinerade stamlösningen (II) och de mängder av varje stamlösning med makronäring som anges i tabell 2 och avjoniserat vatten tillsätts upp till 1 liter för att bereda M7-mediet. En stamlösning med vitaminer bereds genom att tillsätta tre vitaminer till avjoniserat vatten enligt tabell 3, och 0,1 ml av den kombinerade vitaminstamlösningen tillsätts till det slutliga M7-mediet strax före användningen (vitaminstamlösningen förvaras djupfryst i små alikvoter). Mediet luftas och stabiliseras.

LITTERATUR

BBA (1995), ”Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system”, redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabell 1

Stamlösningar av spårelement för M4- och M7-medium

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 2H_6O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dessa ämnen avviker i M4 och M7, såsom anges ovan.
(2) Dessa ämnen bereds individuellt, blandas och autoklaveras omedelbart.

Tabell 2

Stamlösningar med makronäringsämnen för medium M4 och M7

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabell 3

Stamlösningar med vitaminer för medium M4 och M7 Alla tre vitaminlösningar kombineras till en enda vitaminstamlösning.

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med vitaminer som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
Tiaminhydroklorid	750	0,1	0,075
Cyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

Elendt, B. P. (1990), ”Selenium Deficiency in Crustacean”, *Protoplasma* 154, s. 25–33.

Elendt, B. P. och W. R. Bias (1990), ”Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*”, *Water Research* 24 (9), s. 1157–1167.

▼M4

Tillägg 3

BEREDNING AV SYNTETISKT SEDIMENT

Sedimentsammansättning

Syntetiskt sediment ska ha följande sammansättning:

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrvikt
Torv	Sphagnum, så nära pH 5,5–6 som möjligt utan synliga växtrester och finfördelad (partikelstorlek ≤1 mm) och lufttorkad.	4–5
Kvartssand	Partikelstorlek: > 50 % av partiklarna bör ha storlek inom området 50–200 µm	75–76
Kaolinitlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 (± 0,5)
Kalciumkarbonat	$CaCO_3$, pulveriserat, kemiskt rent	0,05–0,1
Vatten	Konduktivitet ≤ 10 µS/m	30–50

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension av behövlig mängd torvpulver i avjoniserat vatten bereds med effektiv homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneras minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C, för att stabilisera pH och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH uppmäts på nytt och bör vara 6,0 ± 0,5. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinlera) och avjoniserat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ger kring 30–50 procent torrvikt av sediment. Därefter mäts den slutliga blandningens pH på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med $CaCO_3$. Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten organiskt kol. Likaså rekommenderas att det syntetiska sediment som ska användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras före användningen i sju dagar i samma betingelser som råder i det efterföljande testet.

Förvaring

De torra beståndsdelarna för beredning av syntetiskt sediment kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Berett (vått) sediment ska inte lagras för användning i test. Det bör användas omedelbart efter den 7 dagar långa konditioneringsperioden i slutet av beredningen.

LITTERATUR

Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), ”Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media”, *Ecotox. and Environ. Safety* 39, s. 10–20.

▼**M4**

Tillägg 4

Krav på kemiska egenskaper hos utspädningsvatten

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhet som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Restklor	< 10 µg/l
Bekämpningsmedel med organiska fosforföreningar, totalt.	< 50 ng/l
Bekämpningsmedel med organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler, totalt.	< 50 ng/l
Totalt organiskt klor	< 25 ng/l

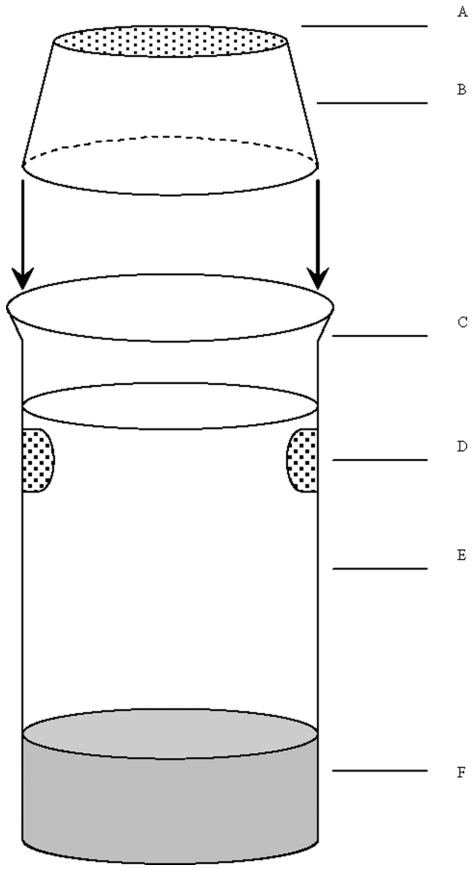
(*) Här bör noteras att om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (och i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas).

▼M4

Tillägg 5

Vägledning för övervakning av kläckning av chironomider

Fällor placeras på testbägarna. Dessa fällor behövs från dag 20 fram till testets slut. Exempel på en fälla visas nedan.



A: nylonnät

B: upp-och-nedvänd plastkopp

C: exponeringskärl utan läpp

D: filterportar för vattenutbyte

E: vatten

F: sediment

▼M4

C. 28 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMID-LARVER MED SPIKAT VATTEN

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 219 (2004). Syftet med testmetoden är att bedöma effekterna av långvarig kemikalieexponering på sedimentlevande larver i sötvatten av fjädermyggor *Chironomus* sp. Den baserar sig i huvudsak på BBA-vägledningen med ett sediment-vatten-testsystem med syntetisk jord och vattenkolumnexponering (1). Metoden beaktar också existerande toxicitetstestprotokoll för *Chironomus riparius* och *Chironomus tentans* som har tagits fram i Europa och Förenta staterna (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) och ringtestats (1) (6) (9). Även övriga väldokumenterade chironomider kan användas, t.ex. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Exponeringen i denna testmetod görs med spikat vatten. Valet av lämpligt exponeringsscenario beror på den avsedda tillämpningen för testet. Vattenexponeringen med spikad vattenkolumn är avsedd att simulera vindavdrift av bekämpningsmedel och täcker den inledande toppkoncentrationen i porvatten. Metoden är också användbar för andra typer av exponering (inklusive kemikaliespill), med undantag för ackumuleringsprocesser som är längre än testperioden.

3. Ämnen som behöver testas på sedimentlevande organismer är sådana som i allmänhet blir kvar i sedimentet under långa tidsperioder. De sedimentlevande organismerna kan exponeras via ett antal rutter. Den relativa betydelsen av varje exponeringsrutt och den tid det tar för var och en av dem att bidra till de totala toxiska effekterna beror på den berörda kemikaliens fysikalkemiska egenskaper. För starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller för ämnen som binds kovalent till sedimentet, kan förtäring av förorenad föda vara en betydande exponeringsrutt. För att toxiciteten hos starkt lipofila ämnen inte ska underskattas kan tillsättning av föda till sedimentet före applicering av testämnet övervägas. För att alla potentiella exponeringsrutter ska beaktas har denna testmetod fokus på långvarig exponering. Testets längd är 20–28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 28–65 dagar för C. *tentans*. Om korttidsdata krävs för ett specifikt ändamål, t.ex. för att undersöka effekterna av instabila kemikalier, kan tilläggsreplikat avlägsnas efter tio dagar.

4. De endpoints som mäts är det totala antalet kläckta vuxna exemplar och utvecklingstiden fram till kläckning. Det rekommenderas att mätningar av larvernas överlevnad och tillväxt endast görs efter en tiodagarsperiod i fall där ytterligare korttidsdata krävs, med användning av ytterligare replikat enligt vad som är lämpligt.

5. För detta test rekommenderas syntetiskt sediment. Syntetiskt sediment har flera fördelar jämfört med naturliga sediment:

— Variationen mellan testningar reduceras eftersom syntetiskt sediment bildar en reproducerbar ”standardmatris”, och behovet av att få fram oförorenade och rena sediment elimineras.

— Testningen kan inledas när som helst utan att beakta säsongvariationer i testsedimentet och det behövs ingen förbehandling av sediment för att få bort naturligt förekommande fauna. När syntetiskt sediment används uppstår heller inte kostnader för insamling på fältet av tillräckliga mängder sediment för rutintestning.

▼M4

— Användning syntetiskt sediment ger möjlighet till jämförelser av toxicitet och därmed klassificering av ämnen. Toxicitetsdata från tester med naturliga och syntetiska sediment har visat sig vara jämförbara för flera kemikalier (2).

6. Definitioner finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Första stadiets chironomidlarver exponeras för ett urval koncentrationer av testämnet i ett sediment-vattensystem. Testet inleds genom att tillsätta första stadiets larver i testbägare som innehåller ett sediment-vatten-system och därefter spika vattnet med testämnet. Kläckning av fullbildade myggor och utvecklingshastighet mäts i slutet av testet. Överlevande larver och deras vikt kan också mätas efter tio dagar om så krävs (med användning av ytterligare replikat enligt det som är lämpligt). Dessa data analyseras med användning av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka × % minskning av antalet fullbildade myggor eller av larvernas överlevnad eller tillväxt (EC_{15}, EC_{50} osv.) eller genom användning av statistisk hypotesprövning för att bestämma NOEC/LOEC. För hypotesprövningen krävs en jämförelse mellan effektvärden och kontrollvärden med användning av statistiska test.

INFORMATION OM TESTÄMNET

8. Testämnets vattenlöslighet, ångtryck, uppmätt eller beräknad fördelning i sedimentet samt stabilitet i vatten och sediment bör vara kända. Det bör finnas en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testämnet i överliggande vatten, porvatten och sediment med känd och rapporterad exakthet och detektionsgräns. Det är också bra att känna till testämnets strukturformel och renhet. Hur testämnet agerar kemiskt (t.ex. upplösning, abiotisk och biotisk nedbrytning osv.) hör också till den information som är användbar. Närmare vägledning för testning av ämnen vars fysikalkemiska egenskaper gör det svårt att genomföra detta test finns i (12).

REFERENSKEMIKALIER

9. Referenskemikalier kan testas periodiskt för att säkerställa att testprotokollet och testbetingelserna är tillförlitliga. Exempel på toxiska referensämnen som med framgång har använts i ringtest och valideringsstudier är lindan, trifluranid, pentaklorfenol, kadmiumklorid och kaliumklorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTETS GILTIGHET

10. För att testet ska vara giltigt gäller följande villkor:

— Kläckningen av vuxna exemplar i kontrollkärlen måste vara minst 70 % i slutet av testet (1) (6).

— Kläckningen av vuxna exemplar av *C. riparius* och *C. yoshimatsui* i kontrollkärlen bör inträffa 12–24 dagar efter att de har införts i kärlen, för *C. tentans* krävs en period på 20–65 dagar.

— Vid slutet av testet bör pH och koncentrationen upplöst syre mätas i varje kärl. Syrekoncentrationen bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) vid den använda temperaturen och pH i överliggande vatten bör vara 6–9 i alla testkärl.

▼M4

— Variationen i vattentemperatur får inte vara större än ± 1,0 °C. Vattentemperaturen kan kontrolleras genom att göra testningen i ett isotermiskt utrymme, varvid rumstemperaturen bör kontrolleras med lämpliga tidsintervall.

METODBESKRIVNING

Testkärl

11. Testet görs i 600 ml-glasbägare med 8 cm i diameter. Även andra slags kärl kan användas, men då måste det gå att garantera att överliggande vatten och sediment har lämpliga djup. Sedimentytan bör vara tillräckligt stor för att ge 2–3 cm^2 per larv. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och överliggande vattnets djup bör vara 1:4. Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testsystemet bör vara gjorda av glas eller annat kemiskt inert material (t.ex. teflon).

Val av arter

12. Den art som används i testet ska helst vara *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan också vara lämplig, men den är svårare att hantera och kräver en längre testperiod. Även *Chironomus yohimatsui* kan användas. I tillägg 2 finns närmare uppgifter om odlingsmetoder för *Chironomus riparius*. Information om odlingsbetingelser finns också för andra arter, t.ex. *Chironomus tentans* (4) och *Chironomus yoshimatsui* (11). Arternas identifiering måste bekräftas före testningen men är inte nödvändig före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Sediment

13. Helst ska syntetiskt sediment användas. Om naturligt sediment används bör dess egenskaper bestämmas (minst pH, halten organiskt kol, och gärna även andra parametrar såsom förhållandet C/N och granulometri). Sedimentet måste även vara fritt från föroreningar och andra organismer som kan konkurrera med eller konsumera chironomiderna. Dessutom rekommenderas att naturligt sediment som är avsett att användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Följande syntetiska sediment, baserat på den syntetiska jord som används i testmetod C.8 (14) rekommenderas för detta test (1) (15) (16):

a) 4–5 % (torrvikt) torv så nära pH 5,5–6 som möjligt; det är viktigt att använda endast lufttorkad och finmalen torv i pulverform (partikelstorlek ≤ 1 mm).

b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).

c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största del bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm).

d) Avjoniserat vatten tillsätt så att blandningen får en slutlig fukthalt på 30–50 %.

e) Kemiskt rent kalciumkarbonat $CaCO_3$) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till 7,0 ± 0,5.

f) Den slutliga blandningens kolhalt bör vara 2 % ± 0,5 % och kan justeras med hjälp av lämpliga mängder torv och sand, enligt punkterna a och c.

▼M4

14. Torv, kaolinlera och sand ska härröra från kända källor. Sedimentkomponenterna bör kontrolleras för att bekräfta avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar osv.) Ett exempel på hur syntetiskt sediment kan tillredas beskrivs i tillägg 3. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att demonstrera att tillsats av överliggande vatten inte leder till att sedimentets beståndsdelar separerar (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditioneras tillräckligt.

Vatten

15. Allt vatten som uppfyller de kemiska kriterierna för godtagbart utspädningsvatten (se tilläggen 2 och 4) är lämpligt som testvatten. Allt lämpligt vatten, naturligt vatten (ytvatten eller grundvatten), rekonstituerat vatten (se tillägg 2) och avklorerat kranvatten är godtagbart som odlings- och testvatten om chironomiderna överlever i det under odling, acklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vid teststart ska testvattnets pH vara mellan 6 och 9 och totalhårdheten får inte vara högre än 400 mg/l uttryckt som $CaCO_3$. Om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas). Samma typ av vatten bör användas under hela testningen. De vattenkvalitetsegenskaper som förtecknas i tillägg 4 bör mätas minst två gånger om året eller om man misstänker att egenskaperna har ändrats betydligt.

Stamlösningar – spikat vatten

16. Testkoncentrationerna beräknas på grundval av vattenkolumnens koncentrationer, dvs. det vatten som ligger över sedimentet. Testlösningar för de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna ska helst beredas genom upplösning av testämnet i ett testmedium. I vissa fall kan det krävas lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Exempel på lämpliga lösningsmedel är aceton, etanol, metanol, etylenglykolmonoetyleter, etylenglykoldimetyleter, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispergeringsmedel som kan användas är Cremofor RH40, Tween 80, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40. Lösningsmedlets koncentration i det slutliga testmediet bör vara minimal (t.ex. $\leq$ 0,1 ml/l) och bör vara samma för alla behandlingar. Om lösningsmedel används, får det inte ha någon betydande effekt på överlevnad eller synliga skadliga effekter på chironomidlarverna, vilket kan verifieras genom en kontroll med enbart lösningsmedel. Man bör dock in i det sista undvika att använda dessa medel.

TESTETS UTFORMNING

17. Testets utformning avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet larver per kärl. Här beskrivs utformningar för uppskattning av effektkoncentration, uppskattning av NOEC och för gränstest. Regressionsanalys rekommenderas för att testa hypotesen.

Utformning för regressionsanalys

18. Effektkoncentrationen (t.ex. EC_{15}, EC_{50}) och det koncentrationsområde som är relevant för testämnet bör omfattas av de koncentrationer som ingår i testet. Allmänt taget gäller att exaktheten och särskilt giltigheten för uppskattningar av effektkoncentrationer (EC_x) förbättras när effektkoncentrationen ligger inom området för de koncentrationer som testas. Extrapolering

▼M4

under lägsta positiva koncentration eller över högsta koncentration bör undvikas. Preliminära test kan användas för att hitta rätt koncentrationsområde (se punkt 27).

19. Om EC_x ska uppskattas bör testet omfatta minst fem koncentrationer och tre replikat för varje koncentration. Det är under alla omständigheter tillrådligt att använda tillräckligt många testkoncentrationer för att få en god modelluppskattning. Faktorn mellan koncentrationer bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-responskurvan har liten lutning). Antalet replikat per behandling kan minskas om antalet testkoncentrationer med olika respons ökas. En ökning av antalet replikat eller minskning av testkoncentrationsintervall tenderar att leda till ett smalare konfidensintervall för testet. Ytterligare replikat krävs om en uppskattning ska göras av larvernas överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod.

Upplägg för uppskattning av NOEC/NOEC

20. Om LOEC eller LOEC ska uppskattas bör det finnas fem testkoncentrationer med minst fyra replikat och faktorn mellan koncentrationerna får inte vara större än två. Antalet replikat bör vara tillräckligt för att säkerställa tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). För uppskattning av utvecklingshastighet är det i regel lämpligt med variansanalys (ANOVA), såsom Dunnets eller Williams test (17) (18) (19) (20). För kläckningsfrekvens kan ett Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (med Bonferroni-korrigering) eller ett Mantel-Haenszel-test användas.

Gränstest

21. Gränstest kan göras (en testkoncentration och kontroll) om inga effekter framkommit vid det preliminära testet för att fastställa testområde. Syftet med gränstest är att få indikation om att testämnets toxiska värde är högre än den testade gränskoncentrationen. Inga förslag på rekommenderade koncentrationer kan ges i denna testmetod, utan frågan måste bedömas av tillsynsmyndigheterna. I regel krävs minst sex replikat både för behandling och kontroll. Man måste kunna demonstrera tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). Eftersom t-test ger kvantitativ respons (utvecklingshastighet och vikt) är t-test en lämplig statistisk metod förutsatt att data uppfyller testkraven (normalitet, homogena varianser osv.). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians eller ett icke-parametriskt test, såsom Wilcoxon-Mann-Whitneys test. För kläckningsfrekvens är det lämpligt att använda Fischers exakta test.

FÖRFARANDE

Exponeringsbetingelser

Beredning av systemet med spikat vatten och sediment

22. Lämpliga mängder syntetiskt sediment (se punkterna 13 och 14 och tillägg 3) tillförs testkärlet så att det bildas ett lager på minst 1,5 cm. Vatten tillsätts till ett djup på 6 cm (se punkt 15). Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och vattenskiktets djup ska inte överskrida 1:4 och sedimentskiktet ska inte vara djupare än 3 cm. Systemet sediment-vatten bör hållas under skonsam luftning i sju dagar före tillsats av testorganismer (se punkt 14 och tillägg 3). För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen, kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts, varefter plattan avlägsnas omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga.

▼M4

23. Testkärlen bör vara täckta (t.ex. med glasplattor). Vid behov fylls under testets gång vatten på till ursprunglig volym för att kompensera för avdunstning. Detta bör göras med destillerat eller avjoniserat vatten för att förebygga ackumulering av salter.

Tillförsel av testorganismer

24. Fyra till fem dagar innan testorganismerna tillförs testkärlen ska äggmassorna avlägsnas från odlingarna och placeras i små kärl i odlingsmedium. Åldrat medium från stamodling eller färskt berett medium kan användas. Om färskt medium används bör en liten mängd föda, t.ex. grönalger och/eller några droppar filtrat från en finmald suspension av fiskfoder i flingform tillsättas odlingsmediet (se tillägg 2). Endast färska äggmassor får användas. I regel börjar larverna kläckas några dagar efter att äggen har lagts (2–3 dagar för *Chironomus riparius* vid 20 °C och 1–4 dagar för *Chironomus tentans* vid 23 °C och *Chironomus yoshimatsui* vid 25 °C), och larvernas tillväxt sker i fyra stadier på 4–8 dagar per stadium. För testet ska första stadiets larver användas (2–3 eller 1–4 dagar efter kläckningen). Bestämning av larvstadium kan möjligen göras genom mätning av huvudkapseldiameter (6).

25. Tjugo första stadiets larver fördelas slumpvis till varje testkärl som innehåller spikat sediment och vatten, med användning av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet måste stoppas medan larverna tillsätts testkärlen och hållas stoppad i ytterligare 24 timmar efter tillsättningen (se punkterna 24 och 32). Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 60 för uppskattning av EC-punkt och 80 för bestämning av NOEC.

26. Tjugofyra timmar efter tillsättning av larverna spikas den överliggande vattenkolumnen med testämnet, och en lätt luftning införs på nytt. Små volymer av testämnet tillsätts under vattenytan med hjälp av en pipett. Därefter görs försiktig omrörning av det överliggande vattnet utan att störa sedimentet.

Testkoncentrationer

27. Ett preliminärt test kan användas för att fastställa koncentrationerna för det definitiva testet. För detta ändamål används en serie brett spridda koncentrationer av testämnet. För att få samma ytdensitet per chironomid som ska användas för det slutliga testet, exponeras chironomiderna för varje koncentration av testämnet under en period som ger möjlighet att uppskatta lämpliga testkoncentrationer. Inga replikat krävs.

28. Testkoncentrationerna för det definitiva testet baseras på resultaten från det preliminära testet. Det ska finnas minst fem testkoncentrationer som väljs enligt beskrivningen i punkterna 18–20.

Kontrollkärl

29. Kontrollkärl som inte innehåller testämne utan enbart sediment bör ingå i testet med lämpligt antal replikat (se punkterna 19–20). Om lösningsmedel har använts för applicering av testämnet (se punkt 16) bör det också finnas kontrollkärl med sediment och lösningsmedel.

▼M4

Testsystem

30. De system som används är statiska. Semistatiska system eller genomflödessystem med intermittent eller kontinuerlig förnyelse av överliggande vatten kan användas i undantagsfall, t.ex. om vattenkvalitetsspecifikationerna inte är lämpliga för testorganismen eller påverkar den kemiska jämvikten (t.ex. om syrenivåerna blir för låga, koncentrationen av utsöndrade produkter blir för hög eller om mineraler som släpps ut från sediment påverkar pH och/eller vattenhårdheten). I regel är det dock tillräckligt och rekommendabelt att använda andra metoder för kompensering av kvaliteten på överliggande vatten, såsom luftning.

Foder

31. Larverna bör ges foder helst dagligen eller minst tre gånger per vecka. Fiskfoder (suspension i vatten eller finmalt foder, t.ex. Tetra-Min eller Tetra-Phyll, se närmare i tillägg 2) i mängder om 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg för C. *yoshimatsui*) per larv per dag anses vara lämpligt för unga larver under de tio första dagarna. För äldre larver kan det krävas lite större mängd: 0,5–1 mg per larv och dag bör vara tillräckligt för återstoden av testet. Mängden bör minskas för alla behandlingar och kontroller om det uppstår svamptillväxt eller mortalitet observeras i kontrollerna. Om svamptillväxten inte kan stoppas måste testet upprepas. Vid testning av starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller ämnen som är kovalent bundna till sedimentet, kan mängden foder som krävs för att säkerställa överlevnad och naturlig tillväxt för organismerna tillsättas i det syntetiska sedimentet före stabiliseringsperioden. Då ska växtmaterial användas i stället för fiskfoder, t.ex. 0,5 % (torrvikt) finmalda löv från t.ex. brännässla (*Urtica dioica*), mullbär (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller annat växtmaterial (*Cerophyl* eller *alfacellulosa*).

Inkubationsbetingelser

32. Skonsam luftning av överliggande vatten i testkärlen införs helst 24 timmar efter tillsättning av larverna och får pågå genom hela testet (se till att halten upplöst syre inte faller under 60 % av luftmättnadsvärdet ASV). Luftningen görs med hjälp av en Pasteur-glaspipett som är fäst 2–3 cm ovanför sedimentskiktet (en eller ett fåtal bubblor per sekund). Vid testning av flyktiga kemikalier kan man överväga att utesluta luftning av sediment-vattensystemet.

33. Testet genomförs vid konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). För C. tentans och C. yoshimatsui rekommenderas temperaturer på 23 °C respektive 25 °C (± 2 °C). En ljusperiod på 16 timmar används och ljusintensiteten ska vara 500–1 000 lux.

Exponeringstid

34. Exponeringen inleds när larver tillsätts i spikade kärl och kontrollkärl. Den maximala exponeringstiden är 28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 65 dagar för C. *tentans*. Om myggor kläcks tidigare, kan testet avslutas efter minst fem dagar efter att det sista vuxna exemplaret har kläckts i kontrollen.

OBSERVATIONER

Kläckning

35. Utvecklingstiden och totalantalet fullbildade han- och honmyggor bestäms. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

▼M4

36. Testkärlen bör granskas visuellt minst tre gånger i veckan för att bedöma förekomsten av onormalt beteende (t.ex. exemplar som lämnar sedimentet, ovanligt simmande) jämfört med kontrollen. Under perioden för förväntad kläckning är det nödvändigt att dagligen räkna antalet kläckta exemplar. Kön och antal fullbildade exemplar registreras dagligen. Efter identifiering avlägsnas myggorna från kärlen. Ägg som har deponerats före testets slutförande bör registreras och därefter avlägsnas för att förhindra att larver på nytt introduceras i sedimentet. Likaså ska registrering göras av antalet synliga puppor som inte har kläckts. Vägledning om övervakning av kläckning finns i tillägg 5.

Tillväxt och överlevnad

37. Om det krävs data om överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod bör ytterligare testkärl införlivas från början, så att dessa därefter kan användas. Larverna i sedimentet från dessa tilläggskärl tillvaratas genom sållning med ett 250 μm-såll. Kriterierna för död är orörlighet eller utebliven reaktion på mekanisk stimulans. Larver som inte tillvaratas bör räknas som döda (larver som har dött i början av testet kan ha sönderdelats av mikrober). Torrvikten (askfri) för överlevande larver per testkärl bestäms och den genomsnittliga individuella torrvikten per kärl beräknas. Det är bra att bestämma vilket stadium överlevande larver tillhör, och för detta kan mätning av huvudkapselns bredd användas.

Analytiska mätningar

Testämnets koncentration

38. Som ett minimum bör prover av överliggande vatten, porvatten och sediment analyseras i början (helst inom en timme från tillsats av testämne) och i slutet av testet, för den högsta koncentrationen och för en lägre koncentration. Dessa bestämningar av testämneskoncentration ger information om testsubstansens beteende/fördelning i vatten-sedimentsystemet. Provtagning av sediment vid testets början kan påverka testsystemet (t.ex. genom att larver avlägsnas) och därför måste ytterligare testkärl användas för analytiska bestämningar vid testets start samt under testets gång om så är lämpligt (se punkt 39). Mätningar i sedimentet är eventuellt inte nödvändiga om fördelningen av testämnet mellan vatten och sediment har fastställts tydligt under motsvarande betingelser (t.ex. förhållandet mellan sediment och vatten, typ av applicering, sedimentets halt av organiskt kol).

39. Om mellanliggande mätningar görs (t.ex. dag 7) och om det för analysen krävs stora prover som inte kan tas från testkärlen utan att testsystemet påverkas, bör de analytiska bestämningarna göras på prover som tas från extra testkärl som behandlas på samma sätt (inklusive förekomst av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer.

40. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4 °C i 30 minuter är det rekommenderade förfarandet för att isolera porvatten. Om det har demonstrerats att testämnet inte adsorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet därför att provet är för litet.

▼M4

Fysikalkemiska parametrar

41. Mätning bör göras av pH, upplöst syre i vattnet och temperatur i testkärlen på lämpligt sätt (se punkt 10). Hårdhet och ammonium bör mätas i kontrollerna och ett testkärl vid den högsta koncentrationen i början och slutet av testet.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Syftet med detta test är att bestämma testämnets effekt på utvecklingshastigheten och totalantalet fullbildade han- och honmyggor eller, om det gäller ett tiodagarstest, effekterna på larvernas överlevnad och vikt. Om det inte finns indikationer på statistiskt avvikande känslighet för hanar och honor, kan resultaten poolas för statistiska analyser. Känslighetsskillnaderna mellan hanar och honor kan bedömas statistiskt t.ex. genom ”χ^2-r × 2 table test”. Larvernas överlevnad och genomsnittlig individuell torrvikt per kärl måste bestämmas efter tio dagar där detta krävs.

43. Effektkoncentrationerna uttryckta som koncentrationer i överliggande vatten beräknas helst på grundval av uppmätta sedimentkoncentrationer vid testets början (se punkt 38).

44. För att beräkna en punktvis uppskattning av EC_{50} eller något annat EC_x-värde, kan statistiken per kärl användas som äkta replikat. Vid beräkning av konfidensintervallet för ett EC_x-värde bör variansen mellan kärl beaktas, eller så bör man påvisa att variansen är så liten att den kan ignoreras. Om modellen anpassas med minsta kvadratmetoden bör transformation tillämpas på den kärlvisa statistiken i syfte att förbättra variansens homogenitet. EC_x-värdena bör dock beräknas när responsen har transformerats tillbaka till det ursprungliga värdet.

45. När syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC genom hypotestestning, måste variansen mellan kärl beaktas, t.ex. genom nästad ANOVA. Alternativt kan mer robust testning (21) vara lämplig i situationer där de vanliga ANOVA-antagandena inte gäller.

Kläckningsfrekvens

46. Kläckningsfrekvenser är dikotoma (tvåpunktsfördelade) data och kan analyseras genom Cochran-Armitage test som tillämpas på step-down-grund där monoton dos-respons förväntas och dessa data stämmer överens med förväntningen. Om inte, kan Fishers exakta test eller ett Mantel-Haenszel-test med Bonferroni-Holm-korrigerade p-värden användas. Om det finns bevis på större variation mellan replikat inom samma koncentration än det som en binomial fördelning skulle indikera (ofta kallad extra-binomial fördelning), bör ett robust Cochran-Armitage-test eller Fischers exakta test användas, enligt det som föreslås i punkt 21.

47. Det totala antalet myggor som kläckts per kärl, n_e, bestäms och divideras med antalet tillsatta larver, n_a enligt följande:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

där:

ER = kläckningsfrekvensen

n_e = antalet myggor som kläckts per kärl

n_a = antalet larver som tillsatts per kärl

48. Ett alternativ som bäst lämpar sig för stora provstorlekar, när det finns extra-binomial varians, är att behandla kläckningsfrekvensen som en kontinuerlig respons och använda förfaranden såsom William-test när monoton dos-respons förväntas och stämmer överens med dessa data för kläckningsfrekvens. Dunnett-test är lämpligt i fall där det inte är hållbart med monotonicitet. I detta sammanhang definieras begreppet ”stort prov” som ett prov där antalet kläckta och antalet inte kläckta överstiger fem, per replikatkärl.

49. Vid användning av ANOVA-metoder bör värdena för kläckningsfrekvens först transformeras genom arcsin-kvadratsrotstransformation eller Freeman-Tukeytransformation för att få en ungefärlig normalfördelning och jämna ut varianserna. Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (Bonferroni) eller Mantel-Haenszel-test kan användas när absoluta frekvenser används. För att göra arcsin-kvadratrotstransformation tar man inverterad sinus (sin^{-1}) av kvadratroten av kläckningsfrekvensen.

50. EC_x-värden för kläckningsfrekvenser beräknas med regressionsanalys (t.ex. probit (22), logit, Weibull, lämplig kommersiell mjukvara eller dylikt). Om regressionsanalysen inte lyckas (om det t.ex. finns mindre än två partiella responser) används andra icke-parametriska metoder såsom glidande medelvärde eller enkel interpolering.

Utvecklingshastighet

51. Med genomsnittlig utvecklingstid avses den genomsnittliga tidsomfattningen mellan tillsättning av larver (testdag 0) och kläckningen av den experimentella kohorten myggor (för beräkning av den faktiska utvecklingstiden bör man beakta larvernas ålder vid tillsättningstidpunkten). Värdet för utvecklingshastighet är det reciproka värdet av tidsenheten för utveckling: (enhet: 1/dag) och representerar den andel larvutveckling som sker per dag. Utvecklingshastigheten är det mått som helst ska användas för utvärdering av dessa sedimenttoxicitetsstudier eftersom variansen är lägre och homogenare samt närmare normalfördelningen i jämförelse med utvecklingstiden. Kraftfulla parametriska testförfaranden kan alltså användas baserade på utvecklingshastighet hellre än på utvecklingstid. För utvecklingshastighet som en kontinuerlig respons kan EC_x-värden uppskattas med hjälp av regressionsanalys (t.ex. (23), (24)).

52. För efterföljande statistiska test antas antalet myggor observerade på inspektionsdag × ha kläckts i mitten av tidsintervallet mellan dag × och dag x-1 (l är inspektionsintervallets längd, i regel 1 dag). Genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl (x) beräknas enligt följande:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

där:

$\bar{x}$: genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl

i: index för inspektionsintervall

m: maximiantalet inspektionsintervall

▼M4

f_i: antalet myggor som kläckts under inspektionsintervallet i

n_e: totalantalet myggor som kläckts i slutet av experimentet (= $\sum f_i$)

x_i: utvecklingshastigheten för myggor som kläckts under intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

där:

dag_i: inspektionsdag (dagar från appliceringen)

l_i: inspektionsintervallets längd i (dagar, i regel 1 dag)

Testrapport

53. *Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter:*

Testämne:

— Fysikalisk natur och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (vattenlöslighet, ångtryck, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om tillgänglig), stabilitet i vatten osv.).

— Kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) samt renhet och analysmetod för kvantifiering av testämnet.

Testarter:

— Organismer som använts för testet: art, vetenskapligt namn, ursprung och odlingsbetingelser.

— Information om hantering av äggmassor och larver.

— Organismernas ålder när de tillförs testkärlen.

Testbetingelser:

— Sediment som använts (naturligt eller syntetiskt).

— För naturligt sediment, insamlingsplatsens belägenhet och beskrivning av sedimentet, inbegripet i mån av möjlighet föroreningshistoria och egenskaper: pH, halten organiskt kol, C/N-kvot och granulometri (om lämpligt).

— Beredning av syntetiskt sediment: beståndsdelar och egenskaper (halten organiskt kol, pH, fukthalt osv. vid testets början).

— Beredning av testvatten (om rekonstituerat vatten används) och egenskaper (syrehalt, pH, konduktivitet, hårdhet osv. vid testets början).

— Sedimentets och överliggande vattnets djup.

— Volymen för överliggande vatten och porvatten, vikten för vått sediment med och utan porvatten.

— Testkärl (material och storlek).

— Metod för beredning av stamlösningar och testkoncentrationer.

▼M4

— Tillsättning av testämne: antalet koncentrationer, antalet replikat och, i förekommande fall, använt lösningsmedel.

— Inkubationsbetingelser: temperatur, ljuscykel och intensitet, luftning (frekvens och intensitet).

— Detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringsschema.

Resultat:

— Nominella testkoncentrationer, uppmätta testkoncentrationer och resultaten av alla analyser för bestämning av testämnets koncentration i testkärl.

— Vattenkvaliteten i testkärlen – pH, temperatur, upplöst syre, hårdhet och ammonium.

— Ersättning av avdunstat testvatten, i förekommande fall.

— Antalet kläckta hon- och hanmyggor per kärl och dag.

— Antalet larver som inte utvecklats till myggor, per kärl.

— Genomsnittlig individuell torrvikt för larver per kärl och per stadium, om lämpligt.

— Procentandel kläckta exemplar per replikat- och testkoncentration (han- och honmyggor poolade).

— Genomsnittlig utvecklingshastighet för fullbildade myggor per replikat och behandlingsnivå (han- och honmyggor poolade).

— Uppskattning av toxiska endpoints t.ex. EC_x (och associerade konfidensintervall), NOEC och/eller LOEC, och statistiska metoder som använts för bestämning av dem.

— Diskussion av resultaten, inbegripet inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) BBA (1995), ”Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system”, redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. m.fl. 1994), ”Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances”, Slutlig rapport till Europeiska kommissionen, rapport nr EC 3738, augusti 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), ”Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments”, WOSTA Workshop, Nederländerna.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), ”Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates”, s. 1125–1241, *ASTM International 2002 Annual Book of Standards*, vol. 11.05, ”Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides”, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (1997), ”Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method”, *Report SPE 1/RM/32*, december 1997.

(6) US-EPA (2000), ”Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates”, andra utgåvan, *EPA 600/R-99/064*, mars 2000, revidering av första utgåvan juni 1994.

▼M4

(7) *US-EPA/OPPTS 850.1735* (1996), ”Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates”.

(8) *US-EPA/OPPTS 850.1790* (1996), ”Chironomid Sediment toxicity Test”.

(9) Milani D., Day K. E., McLeay D. J. och Kirby R. S. (1996), ”Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada’s biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*” Technical Report, Environment Kanada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y. (1997), ”Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*”, *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4), s. 345–350.

(11) Kawai K. (1986), ”Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera)”, *Jp. J. Sanit. Zool.* 37 (1), s. 47–57.

(12) OECD, 2000, ”Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, *OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* Nr 23.

(13) Environment Kanada (1995), ”Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant”, *Report EPS 1/RM/30, september 1995*.

(14) Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

(15) Suedel B. C. och Rodgers J. H. (1994), ”Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing”, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 1163–1175.

(16) Naylor C. och Rodrigues C., (1995), ”Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment”, *Chemosphere* 31, s. 3291–3303.

(17) Dunnett C. W. (1964), ”A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control”, *J. Amer. Statis. Assoc.* 50, s. 1096–1121.

(18) Dunnett C. W. (1964), ”New tables for multiple comparisons with a control”, *Biometrics*, 20, s. 482–491.

(19) Williams D. A. (1971), ”A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control”, *Biometrics*, 27, s. 103–117.

(20) Williams D. A. (1972), ”The comparison of several dose levels with a zero dose control”, *Biometrics*, 28, s. 510–531.

(21) Rao J. N. K. och Scott A. J. (1992), ”A simple method for the analysis of clustered binary data”, *Biometrics* 48, s. 577–585.

(22) Christensen E. R. (1984), ”Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model”, *Water Research* 18, s. 213–221.

(23) Bruce och Versteeg (1992), ”A statistical procedure for modelling continuous toxicity data”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, s. 1485–1494.

(24) Slob W. (2002), ”Dose-response modelling of continuous endpoints”, *Toxicol. Sci.* 66, s. 298–312.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

syntetiskt sediment: rekonstituerat, konstgjort sediment som är en blandning av material avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

överliggande vatten: det vatten som hålls ovanför sedimentet i testkärlet.

porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- och jordpartiklar.

spikat sediment: sediment med tillsatt testämne.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Rekommendationer för odling av *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larver kan odlas i kristalliseringskärl eller stora behållare. Fin kvartssand sprids som ett tunt skikt på cirka 5–10 mm på behållarens botten. Även kiselgur (t.ex. Merck, Art. 8117) har visat sig vara ett lämpligt substrat (det räcker med ett tunt lager på några mm). Lämpligt vatten tillsätts till ett djup på flera cm. Vattennivåerna bör fyllas på efter behov för att ersätta avdunstning och förebygga uttorkning. Vattnet kan vid behov ersättas. Det bör finnas en skonsam luftning. De kärl som innehåller larver bör hållas i en lämplig bur som hindrar vuxna exemplar från att rymma. Buren bör vara tillräckligt stor för att de vuxna exemplaren ska kunna svärma, annars kan kopulation utebli (minimum är cirka 30 × 30 ×30 cm).

2. Burarna ska hållas i rumstemperatur eller ett tempererat utrymme vid 20 ± 2 °C med en ljusperiod på 16 timmar (intensitet ca 1 000 lux) och 8 timmar mörker. Det har rapporterats att luftfuktighet under 60 % RH kan hämma reproduktion.

Utspädningsvatten

3. Allt lämpligt naturligt eller syntetiskt vatten kan användas. Ofta används källvatten, avklorerat kranvatten och artificiella medier (t.ex. Elendt M4 eller M7, se nedan). Vattnet måste luftas före användningen. Vid behov kan odlingsvattnet förnyas genom att försiktigt hälla eller sifonera använt vatten från odlingskärlen utan att förstöra larvrören.

Utfodring av larver

4. *Chironomus*-larverna ges fiskfoder i flingform (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller motsvarande patenterat märke), cirka 250 mg per kärl och dag. Fodret kan ges i form av torrt malet pulver eller som suspension i vatten: 1,0 g flingfoder blandas med 20 ml utspädningsvatten till en homogen blandning. Beredningen kan ges med en dosering på cirka 5 ml per kärl och dag (skaka om före användning). Äldre larver kan få en större dos.

5. Utfodringen justeras enligt vattenkvaliteten. Om odlingsmediet blir grumligt bör dosen sänkas. Foderdoseringen måste övervakas noggrant. För liten mängd leder till att larverna emigrerar mot vattenkolumnen och för stor mängd leder till ökad mikrobiell aktivitet och lägre syrekoncentrationer. Båda omständigheterna kan leda till minskad tillväxt.

6. Även celler av vissa grönalger (t.ex. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kan tillsättas när nya odlingskärl läggs upp.

Utfodring av vuxna exemplar

7. Vissa testutövare har föreslagit att bomullskompresser indränkta i mättad sukroslösning kan användas som foder för vuxna exemplar.

▼M4

Kläckning

8. Vid 20 ± 2 °C börjar vuxna exemplar kläckas i odlingskärlen efter cirka 13–15 dagar. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

Äggmassor

9. När vuxna exemplar finns i odlingsburen bör alla larver i odlingskärlen kontrolleras tre gånger per vecka för att se om gelatinösa äggmassor har deponerats. Om sådana upptäcks, bör de avlägsnas försiktigt. Äggmassorna överförs till ett litet kärl som innehåller ett prov av odlingsvattnet. De används sedan för att starta nya odlingskärl (t.ex. 2–4 äggmassor per kärl) eller för toxicitetstest.

10. Första stadiets larver bör kläckas efter 2–3 dagar.

Uppläggning av nya odlingskärl

11. När odlingarna är etablerade bör det vara möjligt att lägga upp en färsk larvodling veckovis eller med längre intervall beroende på testningskraven, och avlägsna äldre kärl efter att vuxna myggor har kläckts. På detta sätt fås regelbunden tillgång till vuxna exemplar med minimal insats.

Beredning av testlösningarna M4 och M7

12. M4-mediet upptäcktes av Elendt (1990). M7-mediet bereds på samma sätt som M4-mediet med undantag för de ämnen som anges i tabell 1, för vilka koncentrationerna är fyra gånger lägre i M7 jämfört med M4. En publikation om M7-mediet är under arbete (Elendt, personlig kommunikation). Testlösningen ska inte beredas enligt Elendt och Bias (1990) eftersom de angivna koncentrationerna av $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 och K_2HPO_4 inte är lämpliga.

Beredning av M7-medium

13. Varje stamlösning (I) bereds individuellt och en kombinerad stamlösning (II) bereds av dessa stamlösningar (I) (se tabell 1). Femtio ml av den kombinerade stamlösningen (II) och de mängder av varje stamlösning med makronäring som anges i tabell 2 och avjoniserat vatten tillsätts upp till 1 liter för att bereda M7-mediet. En stamlösning med vitaminer bereds genom att tillsätta tre vitaminer till avjoniserat vatten enligt tabell 3, och 0,1 ml av den kombinerade vitaminstamlösningen tillsätts till det slutliga M7-mediet strax före användningen (vitaminstamlösningen förvaras djupfryst i små alikvoter). Mediet luftas och stabiliseras.

Tabell 1

Stamlösningar av spårelement för M4- och M7-medium

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 2H_6O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 · 7H2O (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dessa ämnen avviker i M4 och M7, såsom anges ovan.
(2) Dessa ämnen bereds individuellt, blandas och autoklaveras omedelbart.

Tabell 2

Stamlösningar med makronäringsämnen för medium M4 och M7

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabell 3

Stamlösningar med vitaminer för medium M4 och M7

Alla tre vitaminlösningar kombineras till en enda vitaminstamlösning.

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med vitaminer som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
Tiaminhydroklorid	750	0,1	0,075
Cyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

BBA (1995), ”Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system”, redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt, B. P. (1990), ”Selenium Deficiency in Crustacean”, *Protoplasma* 154, s. 25–33.

Elendt B. P. och Bias W. R.(1990), ”Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*”, *Water Research* 24 (9), s. 1157–1167.

▼M4

Tillägg 3

BEREDNING AV SYNTETISKT SEDIMENT

Sedimentsammansättning

Syntetiskt sediment ska ha följande sammansättning:

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrvikt
Torv	Sphagnum, så nära pH 5,5–6 som möjligt utan synliga växtrester och finfördelad (partikelstorlek ≤1 mm) och lufttorkad.	4–5
Kvartssand	Partikelstorlek: > 50 % av partiklarna bör ha storlek inom området 50–200 μm	75–76
Kaolinitlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 (± 0,5)
Kalciumkarbonat	$CaCO_3$, pulveriserat, kemiskt rent	0,05–0,1
Vatten	Konduktivitet ≤ 10 μS/m	30–50

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension av behövlig mängd torvpulver i avjoniserat vatten bereds med effektiv homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneras minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C, för att stabilisera pH och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH uppmäts på nytt och bör vara 6,0 ± 0,5. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinlera) och avjoniserat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ger kring 30–50 procent torrvikt av sediment. Därefter mäts den slutliga blandningens pH på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med $CaCO_3$. Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten organiskt kol. Likaså rekommenderas att det syntetiska sediment som ska användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras före användningen i sju dagar i samma betingelser som råder i det efterföljande testet.

Förvaring

De torra beståndsdelarna för beredning av syntetiskt sediment kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Berett (vått) sediment ska inte lagras för användning i test. Det bör användas omedelbart efter den 7 dagar långa konditioneringsperioden i slutet av beredningen.

LITTERATUR:

Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), ”Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media”, *Ecotox. and Environ. Safety* 39, s. 10–20.

▼M4

Tillägg 4

Krav på kemiska egenskaper hos utspädningsvatten

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhet som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Restklor	< 10 µg/l
Bekämpningsmedel med organiska fosforföreningar, totalt.	< 50 ng/l
Bekämpningsmedel med organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler, totalt.	< 50 ng/l
Totalt organiskt klor	< 25 ng/l

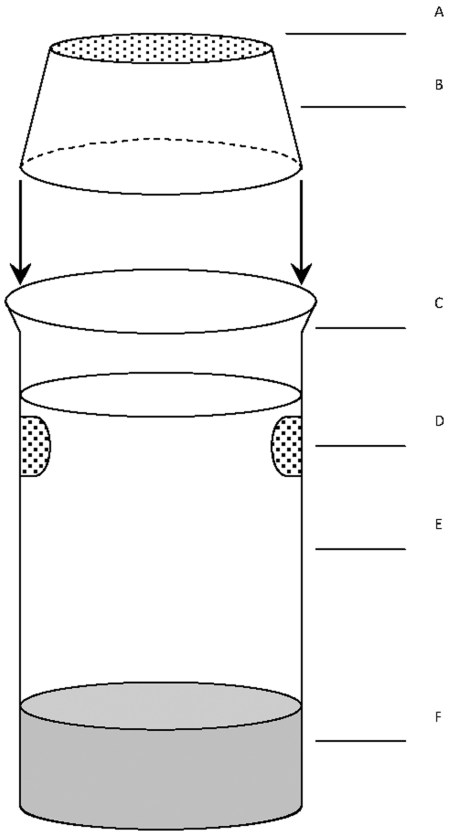
(*) Här bör noteras att om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (och i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas).

▼M4

Tillägg 5

Vägledning för övervakning av kläckning av chironomider

Fällor placeras på testbägarna. Dessa fällor behövs från dag 20 fram till testets slut. Exempel på en fälla visas nedan.



A: nylonnät

B: upp-och-nedvänd plastkopp

C: exponeringskärl utan läpp

D: filterportar för vattenutbyte

E: vatten

F: sediment

▼M4

C.29 LÄTT BIONEDBRYTBARHET – CO_2 I FÖRSLUTNA KÄRL (Headspace-test)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje310 (2006). Denna testmetod är en screeningmetod för utvärdering av kemikaliers lättnedbrytbarhet och ger liknande information som de sex testmetoder som beskrivs i kapitel C.4 i denna bilaga A–F. En kemikalie som ger positiva testresultat med denna metod kan anses vara lätt bionedbrytbar och sönderfaller således snabbt i miljön.

2. Den väletablerade koldioxidmetoden (1) är baserad på Sturms ursprungliga test (2) för bestämning av organiska kemikaliers bionedbrytbarhet, genom mätning av koldioxid (CO_2) som produceras genom mikrobiell verksamhet, har i regel varit det första valet för testning av dåligt lösliga kemikalier och kemikalier med starkt adsorberande egenskaper. Testet väljs också för lösliga (men inte flyktiga) kemikalier, eftersom många anser att utveckling av koldioxid är det enda otvivelaktiga beviset på mikrobiell aktivitet. Avlägsnandet av upplöst organiskt kol kan påverkas av fysikalkemiska processer – adsorption, avdunstning, utfällning, hydrolys – såväl som av mikrobiell aktivitet och många icke-biologiska reaktioner som förbrukar syre; CO_2 produceras sällan från organiska kemikalier på abiotisk väg. I det ursprungliga och modifierade Sturmtestet (1) (2) avlägsnas CO_2 från vätskefasen till de absorberande kärlen genom s.k. sparging (luftbubblor får strömma genom vätskemediet för att avlägsna CO_2), medan Larsons version (3) (4) går ut på att överföra CO_2 från reaktionskärlet till absorberingsenheterna genom att låta CO_2-fri luft passera genom utrymmet ovanför vätskan samtidigt som testkärlet omskakas kontinuerligt. Omskakning av reaktionskärlet används endast i Larson-modifieringen, och omrörning anges endast för olösliga ämnen i ISO 9439 (5) och i den ursprungliga US-versionen (6), enligt vilka sparging rekommenderas hellre än ersättning av gasfasen. I en annan officiell US EPA-metod (8) baserad på Gledhill-metoden (8) hålls reaktionskärlet under omskakning och förseglat från atmosfären, och CO_2 som produceras samlas in i en intern alkalisk fälla direkt från gasfasen, på samma sätt som i klassiska Warburg/Barcroft-respirometerflaskor.

3. Det har dock visat sig att det för ett antal kemikalier ackumuleras oorganiskt kol i mediet vid användning av standard-Sturmtest i modifierad form (9). En koncentration på upp till 8 mg/l oorganiskt kol konstaterades under sönderfall av 20 mg C/l anilin. Uppsamling av CO_2 i alkaliska fällor gav således inte en äkta bild av mängden mikrobiologiskt producerad CO_2 vid mellanliggande tidpunkter under sönderfallet. Det medför att specifikationen om att minst 60 % av teoretisk maximal CO_2-produktion ($ThCO_2$) måste samlas upp inom ett tiodagarsfönster (de tio dagar som följer omedelbart efter att 10 % bionedbrytning har uppnåtts) för att en testkemikalie ska klassificeras som lätt bionedbrytbar, inte uppfylls för vissa kemikalier som skulle ges denna klassificering om man använder eliminering av upplöst organiskt kol (DOC).

4. Om procentandelen sönderdelning är lägre än förväntat, är det möjligt att oorganiskt kol har ackumulerats i testlösningen. Då kan nedbrytbarheten bedömas med andra test för biologisk nedbrytbarhet.

▼M4

5. De övriga nackdelarna med Sturmtest (besvärligt, tidskrävande, högre risk för experimentella fel och kan inte användas för flyktiga kemikalier) har tidigare lett till sökning efter en teknik med förslutet kärl, annan än Gledhill, hellre än gasgenomflöde (10) (11). Boatman m.fl. (12) granskade de tidigare metoderna och valde ett system med slutet utrymme ovan för vätskeytan där CO_2 frigjordes till detta utrymme i slutet av inkubationen genom försurning av mediet. CO_2 uppmättes med gaskromatografi (GC)/IC i automatiskt tagna prover i gasutrymmet, medan upplöst oorganiskt kol (DIC) i vätskefasen inte beaktades. Likaså var de kärl som användes mycket små (20 ml) med endast 10 ml medium, vilket orsakade problem t.ex. vid tillsättning av de mycket små mängderna av olösliga testkemikalier, och/eller eventuellt fanns det inte tillräckliga mängder eller inga mikroorganismer i det inokulerade mediet som kunde sönderbryta testkemikalierna.

6. Dessa svårigheter har lösts genom oberoende studier gjorda av Struijs och Stoltenkamp (13) samt av Birch och Fletcher (14), där de senare byggde på erfarenheter med apparatur använd i test för anaerob biologisk nedbrytning (15). I den tidigare metoden (13) mäts CO_2 i utrymmet ovanför vätskan efter försurning och jämvikt, medan den senare metoden (14) innebär att man mäter DIC i både gas- och vätskefaserna, utan behandling; över 90 % av bildat oorganiskt kol fanns i vätskefasen. Båda metoderna har fördelar jämfört med Sturmtest, i den meningen att testsystemet är mera kompakt och lätthanterligt, flyktiga kemikalier kan testas och man undviker risken för fördröjning vid mätning av producerad CO_2.

7. De två principerna kombinerades i ISO Headspace CO_2 Standard (16) som ringtestades (17) och denna standard utgör grunden för den testmetod som beskrivs här. De två principerna har också använts i US EPA-metoden (18). Två metoder för mätning av CO_2 har rekommenderats – CO_2 i utrymmet ovanför vätskan (headspace) efter försurning (13) och oorganiskt kol i vätskefasen efter tillförsel av överskottsalkali. Den senare metoden infördes av Peterson under CONCAWE-ringtestet (19) av denna headspace-metod som modifierats till att mäta lätt biologisk nedbrytbarhet. De ändringar som gjordes vid 1992 års revidering (20) av metoden i kapitel C.4 i denna bilaga om lätt bionedbrytbarhet har införlivats i denna testmetod, så att betingelserna (medium, tidslängd osv.) för övrigt är desamma som betingelserna i det reviderade Sturmtestet (20). Birch och Fletcher (14) har visat att de resultat som erhölls med detta headspace-test är mycket lika de resultat som erhölls med samma kemikalier i OECD-ringtest (21) av de reviderade testmetoderna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

8. Testkemikalien, i regel 20 mg C/l, såsom enda källa för kol och energi, inkuberas i ett buffert-mineralsaltmedium som har inokulerats med en blandad population mikroorganismer. Testet genomförs i förslutna flaskor med ett luftutrymme ovanför vätskan som syrekälla för aerob biologisk nedbrytning. Utvecklingen av CO_2 till följd av fullständig aerob biologisk nedbrytning av testkemikalien bestäms genom att mäta den mängd oorganiskt kol som produceras i testflaskorna utöver den mängd som produceras i kontrollkärl för bakgrundsvärde som endast innehåller inokulerat medium. Graden av biologisk nedbrytning uttrycks som en procentandel av den teoretiska maximiproduktionen av oorganiskt kol (ThIC), jämfört med den mängd testkemikalie (i form av organiskt kol) som tillfördes i början.

9. DOC-elimineringen och/eller graden av primär biologisk nedbrytning av testkemikalien kan också mätas (20).

▼M4

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

10. Testkemikaliens halt av organiskt kol (viktprocent) måste vara känd, antingen på grundval av den kemiska strukturen eller genom mätning, så att den procentuella nedbrytningen kan beräknas. För flyktiga testkemikalier kan uppmätt eller beräknad Henrys lags konstant användas för beräkning av lämplig kvot mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen. Information om testkemikaliens toxicitet för mikroorganismer kan användas för att välja en lämplig testkoncentration och för tolkning av resultat som tyder på dålig biologisk nedbrytbarhet – inhibitionskontroll rekommenderas om det inte är känt att testkemikalien inte inhiberar mikrobiella aktiviteter (se punkt 24).

METODENS LÄMPLIGHET

11. Testmetoden kan användas för vattenlösliga och olösliga testkemikalier; god dispergering av testkemikalien bör säkerställas. Med användning av den rekommenderade kvoten på 1:2 mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen kan flyktiga kemikalier med en Henrys lags konstant upp till 50 Pa m^3 mol^{-1} testas eftersom andelen testkemikalie i utrymmet ovanför vätskan inte överskrider 1 % (13). Ett mindre utrymme ovanför vätskan kan användas vid testning av kemikalier som är flyktigare, men deras biotillgänglighet kan utgöra en begränsning, särskilt om de har dålig löslighet i vatten. Man bör dock se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen samt testkemikaliens koncentration ger tillgång till tillräckligt med syre för att fullständig aerob bionedbrytning ska kunna ske (t.ex. genom att undvika en hög substratkoncentration och för liten volym ovanför vätskan). Vägledning om detta finns i (13) och (23).

REFERENSKEMIKALIER

12. I syfte att kontrollera testförfarandet bör en testkemikalie med känd biologisk nedbrytbarhet testas parallellt. För detta ändamål kan anilin, natriumbensoat eller etylenglykol användas vid testning av vattenlösliga testkemikalier och 1-oktanol för testkemikalier med dålig löslighet. Referenskemikaliernas biologiska nedbrytbarhet bör nå upp till mer än 60 % av ThIC inom 14 dagar.

REPRODUCERBARHET

13. Vid ISO-ringtest av metoden (17) erhölls följande resultat i rekommenderade betingelser, i vilket ingick 20 mg C testkemikalie/l.

Testkemikalie	Medelvärde för procentuell biologisk nedbrytning (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Variationen mellan tester (replikerbarhet) med användning av anilin var låg, med variationskoefficienter under 5 % för de flesta testningskörningar. I de två fall där replikerbarheten var sämre berodde den större variationen sannolikt på hög produktion av oorganiskt kol i kontrollkärlen för bakgrundsvärde. Replikerbarheten var sämre med 1-oktanol men var fortfarande lägre än 10 % för 79 % av testkörningarna. Denna större variation mellan tester kan ha berott på doseringsfel, eftersom en liten volym (3–4 µl) 1-oktanol måste injiceras i de förslutna testflaskorna. Variationskoefficienterna kan bli högre när lägre koncentrationer av testkemikalie används, särskilt vid koncentrationer under 10 mg C/l. Detta kan delvis lösas genom att sänka koncentrationen totalt oorganiskt kol (TIC) i inokulatet.

▼**M4**

14. I ett EU-ringtest (24) med fem ytaktiva ämnen tillsatta såsom 10 mg C/l erhölls följande testresultat:

Testkemikalie	Medelvärde för procentuell biologisk nedbrytning (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Tetrapropylen Bensensulfonat	17	45	10
Di-iso-oktylsulfo-succinat (anioniskt)	72	22	9
Hexadekyl-trimetyl (*) Ammoniumklorid (katjonisk)	75	13	10
Iso-nonylfenol-$(etoxylat)_9$ (icke-joniskt)	41	32	10
Cocoamidopropylbetain (amfoteriskt)	60	23	11

(*) SiO_2 tillsattes för att neutralisera toxicitet.

Resultaten tyder på att variationen allmänt taget var högre för de ytaktiva ämnen som hade sämre nedbrytning. Variationen mellan tester var mindre än 15 % för över 90 % av fallen, och den högsta variationen var 30–40 %.

ANMÄRKNING: De flesta ytaktiva ämnen har inte enhetlig molekylär struktur utan är blandningar av isomerer, homologer osv. som sönderfaller efter olika långa lagfaser och med olika kinetiska hastigheter, vilket resulterar i lägre kurvor, dvs. gränsvärdet på 60 % kanske inte nås inom tiodagarsfönstret, även om varje enskild molekylär enhet skulle nå detta värde vid testning för sig. Detta kan även observeras med andra komplexa blandningar.

METODBESKRIVNING

Apparatur

15. Normal laboratorieapparatur och följande:

a) Glasserumflaskor, förseglade med butylgummiproppar och kapsyllock av aluminium. Rekommenderad storlek är ”125 ml” som har en total volym på cirka 160 ml (i detta fall bör man försäkra sig om att volymen för var och en flaska är 160 ±1 ml. Mindre kärl kan användas om resultaten uppfyller de villkor som beskrivs i punkterna 66 och 67.

b) Kolanalysator eller annat instrument (t.ex. gaskromatograf) för mätning av oorganiskt kol.

▼M4

c) Högprecisionssprutor för gas- och vätskeformiga prover.

d) Orbitalt skakbord i temperaturkontrollerad omgivning.

e) Tillförsel av CO_2-fri luft – kan ordnas genom att låta luft flöda genom kalk-soda-granulat eller genom att använda en gasblandning av 80 % N_2 och 20 % O_2 (frivilligt) (se punkt 28).

f) Membranfiltreringsutrustning med 0,20–0,45 μm porstorlek (frivilligt).

g) Analysutrustning för organiskt kol (frivilligt).

Reagenser

16. Alla reagenser som används ska vara av analytisk renhetsgrad.

Vatten

17. Destillerat eller avjoniserat vatten ska användas med ≤ 1 mg/l som totalt organiskt kol. Detta representerar ≤ 5 % av det ursprungliga organiska kol som tillförs genom den rekommenderade dosen testkemikalie.

Stamlösningar av mineralsaltmediet

18. Stamlösningar och mineralsaltmedium liknande de i testerna ISO 14593 (16) och C.4 för lätt biologisk nedbrytbarhet (20) ska användas. En högre koncentration av ammoniumklorid (2,0 g/l i stället för 0,5 g/l) är endast nödvändigt i särskilda undantagsfall, t.ex. när koncentrationen testkemikalie överstiger 40 mg C/l. Stamlösningarna bör förvaras i kylskåp och slängas efter sex månader, eller tidigare om det finns tecken på fällning eller mikrobiell tillväxt. Följande stamlösningar ska beredas:

a) Kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

Dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

Dinatriumvätefosfatdihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 33,40 g

Ammoniumklorid (NH_4Cl) 0,50 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter. Lösningens pH bör vara 7,4 (± 0,2). Om inte, bered en ny lösning.

b) Kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 36,40 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter.

c) Magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 22,50 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter.

d) Järn(III)kloridhexahydrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0,25 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter och tillsätt en droppe koncentrerad väteklorid.

Beredning av mineralmedium

19. Blanda 10 ml av lösning a med cirka 800 ml vatten (punkt 17), tillsätt 1 ml av lösningarna b, c och d och fyll upp till 1 liter med vatten (punkt 17).

Övriga reagenser

20. Koncentrerad ortofosforsyra (H_3PO_4) (> 85 % massa per volym).

▼M4

Natriumhydroxidlösning 7 M

21. Lös upp 280 g natriumhydroxid (NaOH) i 1 liter vatten (punkt 17). Bestäm DIC-koncentrationen i denna lösning och beakta värdet vid beräkning av testresultaten (se punkterna 55 och 61), särskilt med tanke på giltighetskriteriet enligt punkt 66 b. Bered en ny, färsk lösning om koncentrationen DIC är för hög.

Testkemikalie

22. Bered en stamlösning av en tillräckligt vattenlöslig kemikalie i vatten (punkt 17) eller i testmedium (punkt 19) i en koncentration som helst är 100-faldig jämförd med den koncentration som ska användas i testet; det kan vara nödvändigt att justera stamlösningens pH. Stamlösning tillförs mineralmediet så att den slutliga halten av organiskt kol blir mellan 2 och 40 mg C/l, helst 20 mg C/l. Om lägre koncentrationer används kan precisionen bli lidande. Lösliga och olösliga vätskeformiga kemikalier kan tillsättas i kärlen direkt med hjälp av högprecisionssprutor. För dåligt lösliga och olösliga testkemikalier kan det krävas specialbehandling (25). Det finns följande alternativ:

a) Direkt tillsättning av kända vägda mängder.

b) Dispergering med ultraljud före tillsättning.

c) Dispergering med hjälp av emulgeringsmedel som krävs för att fastställa huruvida de har inhiberande eller stimulerande effekter på den mikrobiella aktiviteten före tillsättning.

d) Adsorption av vätskeformig testkemikalie eller lösning i ett lämpligt flyktigt lösningsmedel, på ett annat medium eller underlag (t.ex. glasfiberfilter), och därefter avdunstning av lösningsmedlet om sådant använts och direkt tillsättning av kända mängder.

e) Tillsättning av känd mängd av en lösning av testkemikalien i ett lättflyktigt lösningsmedel i ett tomt testkärl, och därefter avdunstning av lösningsmedlet.

Medel eller lösningsmedel som används i c, d och e måste ha testats för stimulerande eller inhiberande effekt på mikrobiell aktivitet (se punkt 42 b).

Referenskemikalie

23. Bered en stamlösning av (löslig) testkemikalie i vatten (punkt 17) i en koncentration som helst är 100-faldig i jämförelse med den slutliga koncentration som ska användas (20 mg C/l) i testet.

Inhibitionskontroll

24. Det händer ofta att testkemikalier inte uppvisar någon betydande nedbrytning under de betingelser som används för bedömning av lätt bionedbrytbarhet. En tänkbar orsak är att testkemikalien fungerar inhiberande på inokulatet vid den koncentration som används i testet. Inhibitionskontroll kan införlivas i testutformningen för att göra det möjligt att (i efterhand) identifiera inhibering som en möjlig orsak eller bidragande faktor. Alternativt kan man med hjälp av inhibitionskontrollen utesluta sådana störningar och påvisa att ingen eller svag nedbrytning endast beror på motstånd mot mikrobiell attack i testbetingelserna. För att få information om testkemikaliens toxicitet för (aeroba) mikroorganismer) bereds en lösning i testmediet med testkemikalien och referenskemikalien (punkt 19), var och en i samma koncentration som tillsatt koncentration (se punkterna 22 och 23).

▼M4

Inokulat

25. Inokulatet kan härröra från ett flertal källor: aktiverat slam, avloppsvatten (oklorerat), ytvatten och jordar eller från en blandning av dessa (20). Källans bionedbrytningsaktivitet bör kontrolleras med hjälp av en referenskemikalie. Oavsett källa bör mikroorganismer som tidigare exponerats för testkemikalien inte användas om förfarandet är avsett att användas som ett test för lätt bionedbrytbarhet.

Varning: Aktiverat slam, avlopp och avloppsutflöde innehåller patogena organismer och måste hanteras försiktigt.

26. Erfarenheter har visat att den optimala volymen för inokulat är en volym som

— är tillräcklig för att ge en tillbörlig bionedbrytningsaktivitet,

— ger tillräcklig nedbrytning av referenskemikalien (se punkt 66),

— ger 10^2 till 10^5 kolonibildande enheter per milliliter i den slutliga blandningen,

— i regel ger en koncentration på 4 mg/l suspenderade fasta ämnen i den slutliga blandningen när aktiverat slam används; koncentrationer upp till 30 mg/l kan användas men då uppstår betydlig ökning av CO_2-produktionen i kontrollkärlen för bakgrundsvärde (26),

— bidrar till mindre än 10 % av ursprungskoncentrationen av organiskt kol som tillförs genom testkemikalien,

— i regel är 1–10 ml inokulat per 1 liter testlösning.

Aktiverat slam

27. Aktiverat slam tas i färsk form från luftningstanken i ett reningsverk eller en enhet i laboratorieskala som i huvudsak behandlar avlopp från hushåll. Vid behov kan grova partiklar avlägsnas genom sållning (t.ex. 1 mm^2) och slammet bör hållas aerobt fram till att det används.

28. Alternativt kan slammet efter eliminering av grova partiklar få sedimentera eller slammet centrifugeras (t.ex. 1 100 × g i 10 minuter). Avlägsna supernatantvätskan. Slammet kan tvättas i mineralösningen. Det koncentrerade slammet suspenderas i mineralmediet till en koncentration på 3–5 g suspenderade fasta ämnen per liter. Detta hålls under luftning tills att det används.

29. Slammet bör tas från ett effektivt fungerande konventionellt reningsverk. Om slam måste tas från ett high rate-reningsverk (högre belastningsgrad och kortare retentionstider) eller kan förmodas innehålla inhibitorer, bör det tvättas. Sedimentera eller centrifugera det återsuspenderade slammet efter grundlig blandning, avlägsna överstående vätska och suspendera tvättat slam på nytt i en ny volym av mineralmedium. Upprepa förfarandet tills att slammet anses vara fritt från överflödigt substrat eller inhibitor.

30. Efter fullständig återsuspension eller, om det gäller obehandlat slam, ta ett prov strax före användning för bestämning av torrvikten för suspenderade fasta ämnen.

31. Ett annat alternativ är att homogenisera aktiverat slam (3–5 g suspenderade fasta ämnen/l). Behandla slammet i en Waring-blandare i 2 minuter på medelhastighet. Låt det blandade slammet sätta sig i 30 minuter eller vid behov längre och dekantera vätskan för användning som inokulat (cirka 10 mg/l mineralmedium).

▼M4

32. Ytterligare minskning av CO_2-utveckling i kontrollprovet för bakgrundsvärde kan fås genom att lufta slammet över natten med CO_2-fri luft. Använd 4 mg/l fasta ämnen från aktiverat slam som koncentration för inokulatet i detta test (13).

Sekundärt avloppsutflöde

33. Alternativt kan inokulat tas från sekundärt utflöde från ett reningsverk eller en enhet i laboratorieskala som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Håll provet under aeroba förhållanden och använd det samma dag som det tagits eller gör vid behov förkonditionering. Utflödet filtreras genom ett grovfilter för att avlägsna stora partiklar och därefter mäts pH.

34. För att minska halten oorganiskt kol gör sparging av filtratet med CO_2-fri luft (punkt 15 e) i 1 timme medan pH hålls på 6,5 med hjälp av ortofosforsyra (punkt 20). Därefter återställs pH-värdet till det ursprungliga med natriumhydroxid (punkt 21) och efter sedimentering cirka 1 timme tas en lämplig volym av supernatanten för inokulering. Genom sparging reduceras inokulatets halt av oorganiskt kol. Om t.ex. den maximala rekommenderade volymen av filtrerat utflöde som genomgått sparging (100 ml) per liter vatten använts som inokulat, är mängden oorganiskt kol i kontrollkärlen för bakgrundsvärde mellan 0,4 till 1,3 mg/l (14), vilket representerar 2–6,5 % av testkemikaliens kol vid 20 mg C/l och 4–13 % vid 10 mg C/l.

Ytvatten

35. Ett prov tas av lämpligt ytvatten. Provet bör hållas i aeroba förhållanden och användas samma dag som det tas. Vid behov bör provet koncentreras genom filtrering eller centrifugering. Den volym inokulat som används i vart och ett testkärl bör bestämmas enligt kriterierna i punkt 26.

Jordar

36. Ett prov tas av lämplig jord på ned till 20 cm djup från jordytan. Stenar, växtrester och invertebrater bör avlägsnas från jordprovet innan det sållas genom 2 mm maskor (vid behov kan provet torkas lite om det är för vått för sållning). Provet bör hållas under aeroba förhållanden och användas samma dag som det tas (om provet transporteras i en löst sluten polyetenpåse kan det förvaras vid 2–4 °C upp till en månad).

Förkonditionering av inokulat

37. Inokulatet kan förkonditioneras för försöksförhållandena men får inte föranpassas till testkemikalien. Genom förkonditionering kan man minska bakgrundsutveckling av CO_2 i kontrollkärlen. Förkonditionering innebär att aktiverat slam luftas efter utspädning i testmediet till 30 mg/l med fuktig CO_2-fri luft upp till 5–7 dagar vid testtemperatur.

TESTFÖRFARANDE

Antal flaskor

38. Antalet flaskor (se punkt 15 a) som behövs för ett test beror på analysfrekvensen och testets tidslängd.

39. Det rekommenderas att ett triplikat flaskor analyseras efter ett tillräckligt antal tidsintervall så att tiodagarsfönstret kan fastställas. Minst fem testflaskor (se punkt 15 a) från uppsättningarna a, b och c (se punkt 42) analyseras i slutet av testet, som grund för beräkning av 95 %-konfidensintervall för den genomsnittliga procentuella biologiska nedbrytningen.

▼M4

Inokulerat medium

40. Inokulatet används vid en koncentration på 4 mg/l aktiverat slam räknat som torrvikt. Bered omedelbart före användning tillräcklig mängd inokulerat medium genom tillsättning av t.ex. 2 ml lämpligt behandlat aktiverat slam (se punkterna 27–32) med 2 000 mg/l till 1 liter mineralsaltmedium (se punkt 19). När sekundärt avloppsutflöde ska användas, tillsätt upp till 100 ml utflöde (se punkt 33) till 900 ml mineralsaltmedium (se punkt 19) och späd till 1 liter med medium.

Beredning av flaskor

41. Alikvoter av inokulerat medium doseras till replikatflaskor så att kvoten mellan ovanförliggande utrymme och vatten är 1:2 (tillsätt t.ex. 107 ml till flaskor med 160 ml kapacitet). Andra kvoter kan användas, men se varningarna i punkt 11. Oavsett vilken typ av inokulat som används är det viktigt att se till att det inokulerade mediet blandas tillräckligt för att säkerställa enhetlig fördelning i testflaskorna.

42. Flaskuppsättningarna (punkt 15 a) bereds enligt följande:

a) Testkärl (betecknade F_T) som innehåller testkemikalie.

b) Kontrollkärl för bakgrundsvärde (betecknade F_B) som endast innehåller testmedium plus inokulat; likaså måste alla eventuella kemikalier, lösningsmedel, agenter eller glasfiberfilter som används för att införa testkemikalien i testkärlen tillsättas.

c) Kärl (betecknade F_C) för kontroll av förfarandet med referenskemikalien.

d) Vid behov, kärl (betecknade F_I) för kontroll av eventuell inhiberande effekt från testkemikalien som innehåller både testkemikalie och referenskemikalie vid samma koncentrationer (punkt 24) som i flaskorna F_T och F_C.

e) Kärl (betecknade F_S) för kontroll av eventuell abiotisk sönderdelning som i led a plus 50 mg/l $HgCl_2$ eller steriliserade på annat sätt (t.ex. i autoklav).

43. Vattenlösliga testkemikalier och referenskemikalier tillsätts som vattenbaserade stamlösningar (punkterna 22, 23 och 24) så att koncentrationer på 10–20 mg C/l erhålls.

44. Olösliga testkemikalier och olösliga referenskemikalier tillsätts flaskorna på olika sätt (se punkt 22 a–e) beroende på testkemikaliens natur, antingen före eller efter tillsättning av inokulerat medium, beroende på metoden för behandling av testkemikalien. Om något av de förfaranden som anges i punkt 22 a–e används ska kontrollflaskorna för bakgrundsvärde F_B (punkt 42 b) behandlas på samma sätt, men testkemikalien och referenskemikalien utesluts.

45. Flyktiga testkemikalier ska injiceras i förslutna flaskor (punkt 47) med användning av mikrospruta. Dosen beräknas utifrån injicerad volym och testkemikaliens densitet.

46. Vid behov bör vatten tillsättas, för att få samma vätskevolym i varje kärl. Det är viktigt att se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätska (i regel 1:2) och koncentrationen testkemikalie är sådana att det finns tillräckligt med syre i utrymmet ovanför vätskan för fullständig biologisk nedbrytning.

▼M4

47. Därefter förseglas alla flaskor med t.ex. butylgummipropp (septum) och kapsyllock av aluminium. Om flyktiga kemikalier testas, tillsätts de i detta skede (punkt 45). Om övervakning ska göras av DOC-koncentrationsminskningen i testlösning och tidpunkt noll-analyser göras för ursprunglig koncentration av oorganiskt kol (sterila kontroller, punkt 43 e) eller andra determinanter, tas ett lämpligt prov från testkärlet. Därefter slängs testkärlet och dess innehåll.

48. De förslutna flaskorna placeras på ett roterande skakbord (punkt 15 d) där skakhastigheten är tillräcklig för att hålla flaskornas innehåll väl blandat och suspenderat (t.ex. 150–200 rpm), och inkuberas i mörker vid 20 °C som bör hållas inom ± 1 °C.

Provtagning

49. Provtagningsschemat beror på lagperioden och den kinetiska hastigheten för testkemikaliens biologiska nedbrytning. Flaskorna tas för analys på provtagningsdagen, och provtagning bör göras minst varje vecka eller oftare (t.ex. två gånger i veckan) om en fullständig nedbrytningskurva önskas. Behövligt antal replikatflaskor tas från skakbordet så att F_T, F_B och F_C representeras, och, i förekommande fall F_I och F_S (se punkt 42). Testperioden är normalt 28 dagar. Om bionedbrytningskurvan tyder på att platåfasen har nåtts tidigare än efter 28 dagar, kan testet avslutas tidigare. Ta prover från de fem flaskor som reserverats för testdag 28 för analys, och använd resultaten för att beräkna konfidensintervall eller variationskoefficient för procentandelen biologisk nedbrytning. Provtagning från flaskor som representerar kontrollerna av inhibering och abiotisk nedbrytning behöver inte göras lika ofta som för de övriga flaskorna – dag 1 och dag 28 är tillräckligt.

Analys av oorganiskt kol

50. CO_2-produktionen i flaskorna bestäms genom att mäta ökningen av koncentrationen oorganiskt kol under inkubationen. Det finns två metoder som rekommenderas för mätning av mängden oorganiskt kol som produceras under testet; dessa beskrivs nedan. Eftersom metoderna kan ge något avvikande resultat, bör endast en av metoderna användas vid en testkörning.

51. Metod a rekommenderas om mediet sannolikt innehåller rester av t.ex. glasfilterpapper och/eller olöslig testkemikalie. Analysen kan göras med gaskromatograf om kolanalysator inte finns att tillgå. Det är viktigt att flaskorna har testtemperatur eller nära testtemperatur när gasen i utrymmet ovanför vätskan analyseras. Metod b kan vara enklare för laboratorier som använder kolanalysatorer för att mäta oorganiskt kol. Det är viktigt att natriumhydroxidlösningen (punkt 21) som används för att omvandla CO_2 till karbonat är antingen nyberedd eller att lösningens halt av oorganiskt kol är känd, så att detta kan beaktas vid beräkning av testresultaten (se punkt 66 b).

Metod a: försurning till pH < 3

52. Före varje analyssats ska analysatorn av oorganiskt kol kalibreras med hjälp av en lämplig standard (t.ex. 1 % w/w CO_2 i N_2). Koncentrerad ortofosforsyra (punkt 20) injiceras genom varje provtagningsflaskas gummipropp för att sänka mediets pH till < 3 (tillsätt t.ex. 1 ml till 107 ml testmedium). Flaskorna sätts tillbaka på skakbordet. Efter en timme på skakbordet i testtemperatur avlägsnas flaskorna, alikvoter (t.ex. 1 ml) av gas dras ur utrymmet ovanför vätskan i varje flaska och injiceras i analysatorn för oorganiskt kol. De uppmätta koncentrationerna oorganiskt kol registreras som mg C/l.

▼M4

53. Principen med denna metod är att efter försurning till pH < 3 och stabilisering vid 20 °C, få en jämviktskonstant för fördelningen av CO_2 mellan vätske- och gasfaserna i testflaskorna som är 1,0 när den uppmäts som en koncentration (13). Detta bör demonstreras för testsystemet minst en gång, enligt följande:

Lägg upp flaskor som innehåller 5 och 10 mg/l oorganiskt kol med användning av vattenfritt natriumkarbonat (Na_2CO_3) i CO_2-fritt vatten som beretts genom försurning av vatten till pH 6,5 med koncentrerad ortofosforsyra (punkt 20), med sparging över natten med CO_2-fri luft och därefter höjning av pH till neutralt med alkali. Se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskans volym är samma som vid testningen (t.ex. 1:2). Försura och stabilisera till jämvikt enligt beskrivningen i punkt 52 och mät koncentrationerna av oorganiskt kol i både gas- och vätskefasen. Kontrollera att båda koncentrationerna är desamma inom gränserna för försöksfel. Om de inte är det, bör förfarandena ses över. Denna kontroll av fördelningen av oorganiskt kol mellan vätske- och gasfasen behöver inte göras varje gång testet utförs, men kan rutinmässigt göras när kalibrering utförs.

54. Om DOC-eliminering ska mätas (endast vattenlösliga testkemikalier) bör proverna tas från vätskefasen i separata (icke-försurade) flaskor, membranfiltreras och injiceras i DOC-analysatorn. Dessa flaskor kan enligt behov användas för andra analyser för mätning av primär bionedbrytning.

Metod b: omvandling av CO_2 till karbonat

55. Före varje analyssats ska analysatorn för oorganiskt kol kalibreras med hjälp av lämplig standard, t.ex. en lösning av natriumbikarbonat ($NaHCO_3$) i CO_2-fritt vatten (se punkt 53) inom området 0–20 mg/l räknat som oorganiskt kol. Natriumhydroxidlösning (7 M, punkt 21) (t.ex. 1 ml till 107 ml medium) injiceras genom varje provtagningsflaskas gummipropp och flaskorna skakas i en timme vid testtemperaturen. Använd samma NaOH-lösning för alla flaskor som tas till provtagning på en viss dag, men inte nödvändigtvis för alla provtagningar under hela testets gång. Om absoluta bakgrundsvärden för oorganiskt kol krävs vid alla provtagningar, måste bestämning av oorganiskt kol göras för NaOH-lösningen varje gång den används. Flaskorna tas ur skakbordet och innehållet får sätta sig. Lämpliga volymer (t.ex. 50–1 000 µl) av vätskefasen i varje kärl dras ut med injektionsspruta. Proverna injiceras i analysatorn för oorganiskt kol och koncentrationerna registreras. Man bör se till att analysatorn är tillbörligt utrustad för att tåla de alkaliska prover som analyseras i denna metod.

56. Principen med metoden är att efter tillsättning av alkali och omskakning, ska koncentrationen av oorganiskt kol i utrymmet ovanför vätskan vara negligerbar. Detta bör kontrolleras för testsystemet minst en gång med användning av standarder för oorganiskt kol, tillsats av alkali, jämviktsstabilisering och mätning av koncentrationen oorganiskt kol både i gas- och vätskefasen (se punkt 53). Koncentrationen i gasfasen bör närma sig noll. Denna kontroll av virtuell fullständig absorption av CO_2 behöver inte göras varje gång testet utförs.

57. Om DOC-eliminering ska mätas (endast vattenlösliga testkemikalier) bör proverna tas från vätskefasen i separata flaskor (som inte innehåller tillsatt alkali), membranfiltreras och injiceras i DOC-analysatorn. Dessa flaskor kan enligt behov användas för andra analyser för mätning av primär bionedbrytning.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Beräkning av resultaten

58. Utifrån ett antagande om 100 % mineralisering av testkemikalie till CO_2, motsvarar det ThIC utöver det som produceras i kontrollkärlen för bakgrundsvärde det TOC som tillfördes till varje testkärl i testets början, vilket betyder att

$$ThIC = TOC$$

Totalmassan (mg) oorganiskt kol (TIC) i varje flaska är då

$$TIC = (\text{mg C i vätskan} + \text{mg C i gasfasen}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Ekvation 1}$$

där:

V_L = volymen vätska i flaskan (liter),

C_L = koncentrationen oorganiskt kol i vätskan (mg/l räknat som kol),

V_H = gasfasens volym (liter),

C_H = koncentrationen oorganiskt kol i gasfasen (mg/l räknat som kol).

Beräkningarna av totalt oorganiskt kol för de två analysmetoderna som används för mätning av oorganiskt kol i detta test beskrivs nedan i punkterna 60 och 61. Den procentuella bionedbrytningen (% D) i vart och ett fall fås genom följande:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Ekvation 2}$$

där:

TIC_t = mg TIC i testflaskan vid tidpunkten t,

TIC_b = genomsnitt för mg TIC i kontrollflaskorna för bakgrundsvärde vid tidpunkten t,

TOC = mg TOC som i början tillfördes testkärlet.

Den procentuella andelen biologisk nedbrytning % D beräknas för flaskorna för test (F_T), referens (F_C) och, om inhibitionsövervakning görs, övervakning (F_I) utifrån de respektive mängder TIC som producerats fram till varje provtagningstidpunkt.

59. Om det har förekommit en betydande ökning av TIC i de sterila kontrollerna (F_S) över testperioden, kan man sannolikt sluta sig till att det har förekommit abiotisk nedbrytning av testkemikalien, och detta måste beaktas vid beräkning av D i ekvation 2.

Försurning till pH < 3

60. Eftersom försurning till pH < 3 och balansering till jämvikt leder till utjämning av TIC-koncentrationen i vätske- och gasfaserna, behöver endast IC-koncentrationen i gasfasen mätas. Från ekvation 1 fås således $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, där V_B = serumflaskans volym.

Omvandling av CO_2 till karbonat

61. I denna metod görs beräkningarna såsom i ekvation 1, men den negligerbara mängden IC i gasfasen ignoreras, dvs. $V_H \times C_H = 0$ och $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Presentation av resultaten

62. En bionedbrytningskurva fås genom att plotta den procentuella biologiska nedbrytningen D mot inkubationstiden och, om möjligt, lagfasen, bionedbrytningsfasen, tiodagarsfönstret och platåfasen (den fas då maximal nedbrytning har uppnåtts och bionedbrytningskurvan fasar ut). Om det finns jämförbara resultat för parallella testkärl F_T (< 20 % skillnad), plottas en genomsnittskurva (se figur 1 i tillägg 2), och om inte, plottas kurvor för varje kärl. Genomsnittsvärdet för den procentuella bionedbrytningen i platåfasen bestäms eller det högsta värdet uppskattas (t.ex. när kurvan går nedåt i platåfasen), men i det senare fallet bör man se upp att det inte handlar om ett utomliggande värde. Ange i testrapporten den maximala nivån av biologisk nedbrytning såsom testkemikaliens grad av bionedbrytning. Om antalet testkärl inte varit tillräckligt för att platåfasen ska framgå, används uppmätta data under testets sista dag för att beräkna ett medelvärde. Detta sista värde, medelvärdet av fem replikat, indikerar den precision med vilken den procentuella biologiska nedbrytningen bestämts. Rapportera också det värde som erhölls i slutet av tiodagarsfönstret.

63. Plotta på samma sätt en kurva för referenskemikalien F_C och, i förekommande fall, för den abiotiska elimineringskontrollen F_S och inhiberingskontrollen F_I.

64. Mängderna TIC i kontrollkärlen (F_B) registreras, liksom mängderna i flaskorna F_S (abiotisk kontroll), om dessa kärl har ingått i testet.

65. Beräkna D för F_I-kärlen, på grundval av teoretiskt IC-värde uppskattat endast från blandningens referenskomponent. Om på dag 28 $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, kan man anta att testkemikalien har inhiberat inokulatets aktivitet och detta kan vara orsaken till lägre värden på D_{FT} som erhållits under testbetingelserna. Då måste testet upprepas med en lägre testkoncentration och helst även med mindre DIC i inokulatet och TIC som bildas i kontrollkärlen, eftersom den lägre koncentrationen annars minskar metodens precision. Alternativt kan ett annat inokulat användas. Om det i flaskorna F_S (abiotiska) observeras en betydande ökning (> 10 %) av mängden TIC, kan abiotiska nedbrytningsprocesser ha inträffat.

Resultatens giltighet

66. Ett test anses vara giltigt om

a) den genomsnittliga procentuella nedbrytningen i F_C-kärl (som innehåller referenskemikalie) är > 60 % senast den 14:e dagen efter inkubation, och

b) den genomsnittliga mängden TIC i kontrollkärlen F_B i slutet av testet är > 3 mg C/l.

Om dessa gränsvärden inte nås, måste testet upprepas med inokulat från en annan källa och/eller testförfarandena bör ses över. Om t.ex. en hög produktion av IC i kontrollkärlen är ett problem, bör förfarandet enligt punkterna 27–32 användas.

(1) Procentuell nedbrytning i F_C-kärl (som innehåller referensämne).
(2) Procentuell nedbrytning i F_I-kärl.

▼M4

67. Om testkemikalien inte når upp till 60 % ThIC och inte visat sig vara inhiberande (punkt 65) kan testet upprepas med ökad koncentration av inokulat (upp till 30 mg/l) aktiverat slam och 100 ml utflöde/l) eller inokulat från andra källor, särskilt om nedbrytningen har legat inom området 20–60 %.

Tolkning av resultaten

68. Biologisk nedbrytning > 60 % inom tiodagarsfönstret demonstrerar i detta test att testkemikalien är biologiskt lättnedbrytbar i aeroba betingelser.

69. Om gränsvärdet på 60 % ThIC inte uppnås, bestäm pH-värdet i mediet i flaskor som inte har försurats eller alkaliserats – ett värde lägre än 6,5 kan tyda på att nitrifikation har inträffat. Upprepa i så fall testet med en buffertlösning med högre koncentration.

Testrapport

70. Sammanställ en tabell med % D för varje flaska med testkemikalie (F_T), referenskemikalie (F_C) och, i förekommande fall, inhibitionskontroll (F_I) för varje provtagningsdag. Om jämförbara resultat erhålls för replikatflaskor, plotta en kurva med genomsnittet av % D mot tiden. Registrera mängden TIC i kontrollerna (F_B) och i de sterila kontrollerna (F_S) DOC och/eller andra determinanter och den procentuella elimineringen.

71. Bestäm genomsnittsvärdet för % D för platåfasen eller använd det högsta värdet om bionedbrytningskurvan går nedåt i platåfasen, och rapportera detta som graden bionedbrytning för testkemikalien. Det är viktigt att se till att i det senare fallet se till att det högsta värdet inte är ett utanförliggande värde.

72. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Trivialnamn, kemisk beteckning, CAS-nummer, strukturformel och relevanta fysikalkemiska egenskaper.

— Testkemikaliens renhet (orenheter).

Testbetingelser:

— Hänvisning till denna testmetod.

— Beskrivning av testsystemet (t.ex. kärlvolym, kvoten mellan volymen gasfas och volymen vätskefas, omrörningsmetod osv.).

— Applicering av testkemikalie och referenskemikalie till testsystemet, testkoncentration och mängd kol som doserats till var och en testflaska, eventuell användning av lösningsmedel.

— Uppgifter om inokulat, eventuell förbehandling och förkonditionering.

— Inkubationstemperatur.

— Validering av IC-analysens princip.

— Huvudegenskaper för IC-analysatorn (och alla andra analysmetoder som använts).

— Antalet replikat.

Resultat:

— Rådata och beräknade värden för biologisk nedbrytning i tabellform.

▼M4

— Kurva över procentuell nedbrytning av test- och referenskemikalierna mot tiden, lagfas, nedbrytningsfas, tiodagarsfönster och lutning.

— Procentandelen eliminering vid platåfasen, vid testets slut och efter tiodagarsfönstret.

— Motiveringar för eventuella förkastade testresultat

— Övriga fakta som är relevanta för de förfaranden som har använts.

— Diskussion om resultaten.

LITTERATUR

(1) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet – CO_2-utveckling (metod C.4-C).

(2) Sturm R. N. (1973), ”Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation”, *J.A,.Oil Chem Soc.* 50, s. 159–167.

(3) Larson R. J. (1979), ”Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals”, *Appl Env. Microbiol.* 38, s. 1153–1161.

(4) Larson R. J., Hansmann M. A. och Bookland E. A. (1996), ”Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants”, *Chemosphere* 33, s. 1195–1210.

(5) ISO 9439 (1990; reviderad 1999), *Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm)*.

(6) US EPA (1996), ”Fate, Transport and Transformation Test Guideline”, 835, ”3110 Carbon dioxide evolution test”, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

(7) US EPA (1996), ”Fate, Transport and Transformation Test Guideline”, 835, 3100, ”Aerobic aquatic biodegradation”, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

(8) Gledhill W. E., (1975), ”Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate”, *Appl Microbiol.* 30, s. 922–929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I. och Painter H. A. (1994), ”The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability”, *Chemosphere* 28, s. 801–812.

(10) Ennis D. M. och Kramer A. (1975), ”A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides”, *J. Food Sci.* 40, s. 181–185.

(11) Ennis D. M., Kramer A., Jameson C. W., Mazzoccki P. H. och Bailey P. H. (1978), *Appl. Env. Microbiol.* 35, s. 51–53.

(12) Boatman R. J., Cunningham S. L. och Ziegler D. A. (1986), ”A method for measuring the biodegradation of organic chemicals”, *Env. Toxicol. Chem.* 5, s. 233–243.

(13) Struijs J. och Stoltenkamp J. (1990), ”Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test”, *Ecotox. Env. Safety* 19, s. 204–211.

(14) Birch R. R. och Fletcher R. J. (1991), ”The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability”, *Chemosphere* 23, s. 507–524.

(15) Birch R. R., Biver C., Campagna R., Gledhill W. E., Pagga U., Steber J., Reust H. och Bontinck W. J. (1989), ”Screening of chemicals for anaerobic biodegradation”, *Chemosphere* 19, s. 1527–1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999), *Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test)*.

(17) Battersby N. S. (1997), ”The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test”, *Chemosphere* 34: s. 1813–1822.

(18) US EPA (1996), ”Fate, Transport and Transportation”, Series 835, 3120, ”Sealed vessel carbon dioxide production test”, Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby N. S., Ciccognani D., Evans M. R., King D., Painter H.A., Peterson D. R. och Starkey M. (1999), ”An ’inherent’ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test”, *Chemosphere* 38, s. 3219–3235.

(20) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(21) OECD, 1988, ”OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman’s report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI)”, Paris.

(22) Kapitel C.11 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – Respirationshämningstest.

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M. J. och Dekkers A. L. M. (1995), ”A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests”, *Biodegradation* 6, s. 319–327.

(24) EU (1999), ”Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697”, Water Research Centre, maj 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) *Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium*.

▼M4

Tillägg 1

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

IC: oorganiskt kol.

$ThCO_2$: teoretisk koldioxid (mg) är den mängd koldioxid som enligt beräkningar produceras från känd eller beräknad kolhalt i testkemikalien vid fullständig mineralisering, också uttryckt som mg koldioxid som utvecklas per mg testkemikalie.

DOC: upplöst organiskt kol är den mängd organiskt kol som finns i lösningen eller som passerar ett 0,45-mikrometers filter eller som blir kvar i centrifugatet efter centrifugering vid cirka 4 000 g (cirka 40 000 m s^{-2}) i 15 minuter.

DIC: upplöst oorganiskt kol.

ThIC: teoretiskt oorganiskt kol.

TIC: totalt oorganiskt kol.

lätt bionedbrytbar: en godtycklig klass kemikalier som har klarat vissa specifika screeningtester för fullständig bionedbrytning; dessa tester är så krävande att man antar att kemikalierna snabbt bryts ned fullständigt i vattenmiljö i aeroba betingelser.

tiodagarsfönster: de 10 dagar som följer omedelbart efter att 10 % biologisk nedbrytning har uppnåtts.

lätt biologisk nedbrytbarhet: en klassificering för en kemikalie för vilken det finns otvetydiga belägg för biologisk nedbrytbarhet (primär eller fullständig) i alla tester för biologisk nedbrytbarhet.

fullständig aerob biologisk nedbrytning: den nivå av nedbrytning som nås när testkemikalien har förbrukats totalt av mikroorganismer under utveckling av koldioxid, vatten, mineralsalter och nya mikrobiella celler (biomassa).

mineralisering: mineralisering är en fullständig nedbrytning av en organisk kemikalie till CO_2 och H_2O i aeroba förhållanden, och till CH_4, CO_2 och H_2O i anaeroba förhållanden.

lagfas: tiden från teststart fram till acklimatisering och/eller anpassning av de nedbrytande mikroorganismerna och när nivån för biologisk nedbrytning av en testkemikalie eller organiskt material har nått upp till en detekterbar nivå (t.ex. 10 % teoretisk biologisk nedbrytning, eller lägre, beroende på mätningsteknikens precision).

nedbrytningsfas: tiden från lagfasens slut fram till den tidpunkt då 90 % av maximinivån för nedbrytning har nåtts.

platåfas: platåfasen inträffar när maximal nedbrytning har uppnåtts och bionedbrytningskurvan fasar ut.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

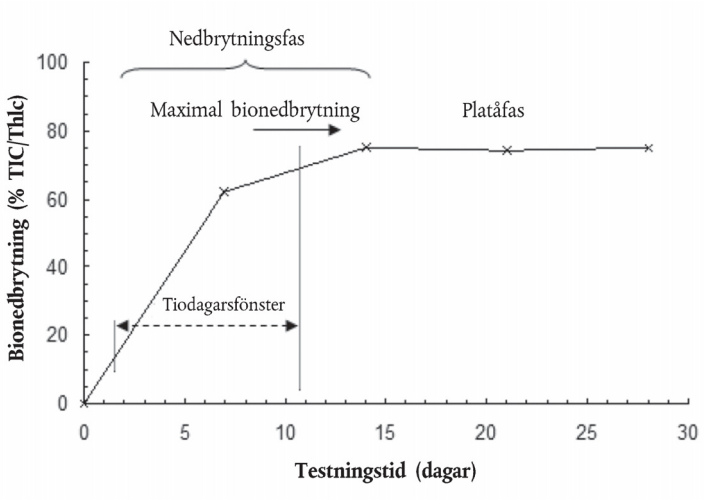
▼M4

Tillägg 2

Exempel på en bionedbrytningskurva

Figur 1

Biologisk nedbrytning av 1-oktanol i CO_2 Headspace-test



Ordlista:

Bionedbrytning

Nedbrytningsfas

Maximal bionedbrytning

Platåfas

Tiodagarsfönster

Testningstid (dagar)

▼M4

C.30 BIOACKUMULERING I JORDLEVANDE OLIGOCHAETER (FÅBORSTMASKAR)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 317 (2010). Bland testmetoderna rörande omvandling, spridning och nedbrytning i miljön publicerades Biokoncentration: Genomflödestest med fisk (kapitel C.13 i denna bilaga (49)) och bioackumulering i sedimentlevande bottenlevande oligochaeter (53) 1996 respektive 2008. Att extrapolera data om bioackumulering i vattenlevande organismer till jordlevande organismer såsom daggmaskar är svårt eller omöjligt. Modellberäkningar baserade på en testkemikalies lipofilicitet, t.ex. (14) (37), används för närvarande för bedömning av bioackumulering av kemikalier i jord, såsom t.ex. i EU:s tekniska vägledningsdokument (19). Behovet av en miljöspecifik testmetod har redan tagits upp, t.ex. (55). En sådan metod är särskilt viktig för utvärdering av sekundär förgiftning i livsmedelskedjan för jordlevande organismer (4). Det finns flera nationella testmetoder som behandlar bioackumulering i andra organismer än fisk, t.ex. (2) och (72). En metod för mätning av bioackumulering från förorenade jordar i daggmaskar (*Eisenia fetida,* Savigny) och ringmaskar har utvecklats av American Society for Testing and Materials (3). Genom en internationellt accepterad metod för bestämning av bioackumulering i spikad jord förbättras riskbedömningen av kemikalier i ekosystem i jordar, t.ex. (25) (29).

2. Jordätande invertebrater utsätts för jordbundna kemikalier. Bland dessa spelar jordlevande oligochaeter (fåborstmaskar) en viktig roll för jordarnas struktur och funktion (15) (20). Jordlevande oligochaeter lever i jorden och delvis på jordytan (särskilt i förnaskiktet) och de representerar ofta de vanligaste arterna i termer av biomassa (54). Genom att dessa sköter bioturbation av jorden och även utgör byte kan de ha en stark inverkan på kemikaliers biotillgänglighet för andra organismer såsom invertebrater (t.ex. jagande kvalster och skalbaggar, t.ex. (64)) eller jagande ryggradsdjur (t.ex. rävar och måsar) (18) (62). Vissa arter av jordlevande oligochaeter som för närvarande används för ekotoxikologisk testning beskrivs i tillägg 5.

3. I ASTM:s Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) finns många väsentliga och användbara uppgifter för hur man kan genomföra denna testmetod för bioackumulering. Övriga dokument som det hänvisas till inom den här testmetoden är kapitel C.13 i denna bilaga, Biokoncentration: Genomflödestest med fisk (49) och OECD:s testriktlinje 315: bioackumulering i sedimentlevande bottenlevande oligochaeter (53). Testmetoden bygger också i hög grad på praktisk erfarenhet från studier om bioackumulering i jordar och publicerad litteratur, t.ex. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Testmetoden lämpar sig bäst för stabila, neutrala organiska kemikalier som tenderar att adsorberas till jordar. Testning av bioackumulering av stabila metallorganiska föreningar som binds till jord kan göras med denna testmetod. Testet kan också användas för metaller och andra spårelement.

FÖRUTSÄTTNINGAR

5. Tester för mätning av bioackumulering av en kemikalie i jordlevande oligochaeter har gjorts med tungmetaller (se t.ex. (63)) och långlivade organiska kemikalier med log K_{ow}-värden mellan 3,0 och 6,0, t.ex. (40). Sådana tester kan också användas för

— kemikalier som har log K_{ow} på 6,0 eller högre (superhydrofoba kemikalier),

▼M4

— kemikalier som tillhör en klass av organiska kemikalier som är kända för att ha potential att bioackumuleras i levande organismer, t.ex. ytaktiva eller mycket adsorptiva kemikalier,

— kemikalier vars strukturella egenskaper indikerar potential för bioackumulering, t.ex. analoger till kemikalier med känd bioackumuleringspotential,

— metaller.

6. Information om testkemikalien, såsom trivialnamn, kemiskt namn (helst enligt IUPAC), strukturformel, CAS-nummer, renhet, säkerhetsåtgärder, lämpliga lagringsförhållanden och analysmetoder bör inhämtas innan studien inleds. Därutöver bör det finnas information om

a) vattenlöslighet,

b) fördelningskoefficient oktanol-vatten, K_{ow},

c) fördelningskoefficient jord-vatten, K_{oc},

d) ångtryck,

e) nedbrytbarhet (t.ex. i jord, vatten),

f) kända metaboliter.

7. Radioaktivmärkta eller inte radioaktivmärkta testkemikalier kan användas. För att underlätta analysen rekommenderas dock radioaktivmärkta testkemikalier. Beslutet bör baseras på detektionsgränser eller krav på att mäta ursprunglig kemikalie och metaboliter. Om en radioaktivmärkt testkemikalie används och totala radioaktiva rester mäts, är det viktigt att de radioaktivmärkta resterna både i jorden och i testorganismerna analyseras för procentandelar av ursprunglig testkemikalie och radioaktivmärkta metaboliter, t.ex. i prover som tas i stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen, för att göra det möjligt att beräkna bioackumuleringsfaktor (BAF) för den ursprungliga testkemikalien och berörda metaboliter i jorden (se punkt 50). Den metod som beskrivs här måste eventuellt modifieras, t.ex. för att ge tillräcklig biomassa för mätning av organiska testkemikalier som inte är radioaktivmärkta eller metaller. När totalmängden radioaktiva rester har uppmätts (genom vätskescintillationsräkning efter extraktion, förbränning eller vävnadsupplösning), baserar sig bioackumuleringsfaktorn på den ursprungliga kemikalien och metaboliterna. Beräkningen av bioackumuleringsfaktorn bör helst baseras på den ursprungliga testkemikaliens koncentration i organismerna och totalmängden radioaktiva rester. Ackumuleringsfaktorn biota-jord (BSAF), normaliserad till maskens fettinnehåll och jordens halt organiskt kol (OC) ska alltså beräknas utifrån BAF, med tanke på jämförbarhet mellan resultat från olika bioackumuleringstest.

8. Testkemikaliens toxicitet för de arter som används i testet bör vara känd, t.ex. en effektkoncentration (EC_x) eller en dödlig koncentration (LC_x) vid tidpunkten för upptagningsfasen, t.ex. (19). Den valda koncentrationen för testkemikalien bör helst vara 1 % av akut asymptotiskt LC_{50} och bör vara minst tiofaldig jämfört med detektionsgränsen i jord med den analysmetod som används. Helst bör toxicitetsvärden, om sådana finns, från långvariga studier om subletala endpoints användas (51) (52). Om sådana uppgifter inte finns kan test om akut toxicitet ge värdefull information (se t.ex. (23)).

▼M4

9. Det bör finnas en lämplig analysmetod med känd exakthet, precision och känslighet för kvantifiering av kemikalien i testlösningarna, i jorden och i det biologiska materialet, tillsammans med uppgifter om beredning och lagring av såväl prover som säkerhetsdatablad. De analytiska detektionsgränserna för testkemikalien i jord och maskvävnad bör också vara kända. Om en ^{14}C-märkt testkemikalie används, bör den specifika radioaktiviteten (Bq mol^{-1}) och den procentuella andelen radioaktivitet associerad med orenheter vara kända. Testkemikaliens specifika radioaktivitet bör vara tillräckligt hög för att möjliggöra analys, och de testkoncentrationer som används får inte framkalla toxiska effekter.

10. Testet kan genomföras med syntetiska eller naturliga jordar. Information om egenskaper hos naturlig jord som används, t.ex. ursprung eller beståndsdelar, pH, halten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procentandel sand, dy och lera) och vattenhållningskapacitet (WHC), bör vara känd innan testet inleds (3) (48).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. Till de parametrar som karakteriserar en testkemikalies bioackumulering hör bioackumuleringsfaktorn (BAF), upptagningskonstanten (k_s) och elimineringskonstanten (k_e). Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

12. Testet består av två faser: upptagningsfasen (exponering) och elimineringsfasen (efter exponering). Under upptagningsfasen exponeras replikerade grupper av maskar för jord som har spikats med testkemikalien. I tillägg till testdjuren hålls kontrollgrupper av maskar under identiska förhållanden utan testkemikalie. Testorganismernas torrvikt och fettinnehåll mäts. Detta kan göras med maskarna i kontrollgruppen. Analytiska bakgrundsvärden kan fås genom att analysera prover av kontrollmaskarna och kontrolljorden. För elimineringsfasen flyttas maskarna till en jord som inte innehåller testkemikalie. En elimineringsfas krävs alltid, med undantag för om upptaget av testkemikalie under exponeringen har varit obetydligt. Elimineringsfasen ger information om den hastighet med vilken testkemikalien utsöndras av testorganismerna (se t.ex. (27)). Om stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen bör bestämningen av de kinetiska parametrarna – kinetisk bioackumuleringsfaktor BAF_k, upptagnings- och elimineringskonstanterna – helst baseras på simultan anpassning av resultaten från upptagnings- och elimineringsfaserna. Koncentrationen av testkemikalie i/på maskarna kontrolleras under testets båda faser.

13. Under upptagningsfasen görs mätningar vid provtagningstidpunkterna upp till 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar) tills stabilt tillstånd uppnås (11) (12) (67). Stabilt tillstånd uppnås när en kurva som plottas för koncentrationen i maskarna mot tiden blir parallell med tidsaxeln, och tre på varandra följande koncentrationsanalyser på prover som tas med minst två dagars mellanrum inte varierar med mer än ± 20 % sinsemellan baserat på statistiska jämförelser (t.ex. variansanalys, regressionsanalys).

14. För elimineringsfasen överförs testorganismerna till kärl som innehåller samma substrat men ingen testkemikalie. Under elimineringsfasen görs mätningar vid provtagningstidpunkterna under 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar), utom om tidigare analytisk bestämning visar en minskning på 90 % av testkemikalierester i maskarna. Koncentrationen av testkemikalie i maskarna i slutet av elimineringsfasen rapporteras som

▼M4

icke-eliminerade rester. Bioackumuleringsfaktorn vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}) beräknas helst både som kvoten mellan koncentrationen i maskarna (Ca) och i jorden (Cs) vid uppenbar klart fastställt stabilt tillstånd, och som en kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAFK) som kvoten mellan upptagningsfaktorn (k_s) och elimineringskonstanten (k_e) (för definitioner, se tillägg 1) utifrån ett antagande om första ordningens kinetik (för beräkningar, se tillägg 2). Om första ordningens kinetik uppenbart inte kan tillämpas, bör andra modeller användas.

15. Upptagningskonstanten, elimineringskonstanten (eller konstanterna, om andra modeller ingår), den kinetiska bioackumuleringsfaktorn (BAFK) och, där det är möjligt, konfidensgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas utifrån datoriserade modellekvationer (se vägledning i tillägg 2). Anpassningens kvalitet (Goodness of fit) för valfri modell kan göras t.ex. utifrån korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter nära ett tyder på god kvalitet) eller testas med chi-två-test. Även värdet på medelfelet eller konfidensgränsen kring de uppskattade parametrarna kan ge indikation på anpassningens kvalitet för modellen.

16. För att minska testresultatens variation för testkemikalier med hög lipofilicitet bör bioackumuleringsfaktorerna uttryckas i förhållande till fettinnehållet och halten organiskt kol (kg organiskt kol i jorden per kg fett i mask). Denna princip är baserad på att det för vissa kemiska klasser finns ett klart samband mellan potentialen för bioackumulering och lipofilicitet, vilket har klart etablerats för fisk (47). Det finns ett förhållande mellan fettinnehållet i fisk och bioackumulering av sådana kemikalier. För bottenlevande (bentiska) organismer har man funnit liknande korrelationer (se t.ex. (30) (44)). Denna korrelation har även påvisats för jordlevande oligochaeter (se t.ex. (5), (6), (7) (14)). Om tillräcklig mängd maskvävnad finns att tillgå, kan testdjurens fettinnehåll bestämmas på samma biologiska material som används för bestämning av koncentrationen testkemikalie. Alternativt kan kontrolldjur användas för mätning av fettinnehållet.

TESTETS GILTIGHET

17. För att ett test ska vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för både kontroll- och behandlingsgrupperna:

— Vid slutet av testet får den totala dödligheten under upptagnings- och elimineringsfaserna inte överskrida 10 % (daggmaskar) eller 20 % (enchytraeider) av det totala antalet tillförda maskar.

— För *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* får medelförlusten uppmätt vid slutet av upptagningsfasen och vid slutet av elimineringsfasen inte överskrida 20 % jämfört med den ursprungliga färskvikten vid start av varje fas.

METODBESKRIVNING

Testarter

18. Det finns flera arter av jordlevande oligochaeter som rekommenderas för testning av bioackumulering. De oftast använda arterna *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* (Lumbricidae), *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* eller *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae) beskrivs i tillägg 5.

▼M4

Apparatur

19. Uppmärksamhet bör fästas vid att undvika användning av material (gäller alla delar av utrustningen) som kan upplösas, adsorbera testkemikalien eller läcka andra kemikalier och som kan ha negativa effekter på testdjuren. Standardmässiga rektangulära eller cylindriska kärl gjorda av kemiskt inert material kan användas, av lämplig storlek för antalet testmaskar. Rostfritt stål, plast eller glas kan användas för utrustning som är i kontakt med testmediet. Testkärlen ska vara tillbörligen täckta så att maskarna inte kan komma ut, samtidigt som tillräcklig lufttillförsel säkerställs. För kemikalier med höga adsorptionskoefficienter, såsom syntetiska pyretroider, kan det vara nödvändigt med silaniserat glas. I sådana situationer måste utrustningen kasseras efter användning (49). Det är viktigt att se till att radioaktivmärkta testämnen och flyktiga kemikalier inte kan läcka ut. Det bör finnas fällor (t.ex. gastvättflaskor av glas) som innehåller lämpliga adsorbenter som håller kvar eventuella rester som avdunstar från testkärlen.

Jord

20. Testjorden bör ha en kvalitet som ger testorganismerna möjlighet att överleva och helst föröka sig under acklimatiserings- och testperioderna utan avvikelser från normalt utseende och beteende. Maskarna bör vara inne i jorden.

21. Den syntetiska jord som beskrivs i kapitel C.8 i denna bilaga (48) rekommenderas som substrat för testningarna. Beredning av syntetisk jord för användning i bioackumuleringstest och rekommendationer för hur denna jord ska lagras beskrivs i tillägg 4. Lufttorkad syntetisk jord kan förvaras i rumstemperatur fram till användningen.

22. Även naturliga jordar från oförorenade platser kan användas som test- och/eller odlingsjord. För naturjordar bör minst anges ursprung (insamlingsplats), pH, halten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procentandel sand, dy och lera), maximal vattenhållningskapacitet (WHC_{max}) och procentuell andel vatten (3). Analys av jorden eller dess beståndsdelar med avseende på mikroföroreningar bör ge användbar information. Om fältjord från odlingsmark används, får den inte ha behandlats med växtskyddsprodukter eller gödsel från behandlade djur under minst ett år eller med organiska gödselmedel under minst sex månader innan jordprovet tas (50). De förfaranden som används för hantering av naturjordar innan dessa jordar används i ekotoxikologiska test med oligochaeter i laboratoriet beskrivs i (3). För naturjordar bör förvaringstiden i laboratoriet minimeras.

Applicering av testkemikalien

23. Testkemikalien blandas in i jorden. Testkemikaliens fysikalkemiska egenskaper bör beaktas. En vattenlöslig testkemikalie bör upplösas fullständigt i vatten innan den blandas med jorden. Det rekommenderade spikningsförfarandet för dåligt vattenlösliga kemikalier är att en eller flera beståndsdelar i (den syntetiska) jorden beläggs med testkemikalien. Till exempel kan kvartssand eller en del av den dränkas in med en lösning av testkemikalien i lämpligt organiskt lösningsmedel som får avdunsta långsamt tills det torkat bort. Därefter kan den belagda jordfraktionen blandas i den våta jorden. En viktig fördel med detta förfarande är att inget lösningsmedel tillförs jorden.

▼M4

När naturjord används kan testkemikalien tillsättas genom att spika en lufttorkad del av jorden enligt det som beskrivs ovan för syntetisk jord, eller genom att blanda in testkemikalien i våt jord, med ett efterföljande avdunstningssteg om ett solubiliseringsmedel används. Allmänt taget bör man så långt som möjligt undvika kontakt mellan våt jord och lösningsmedel. Följande bör beaktas (3):

— Om annat lösningsmedel än vatten används, bör det vara blandningsbart med vatten och/eller kunna avlägsnas (t.ex. genom avdunstning) så att endast testkemikalien blir kvar i jorden.

— Om lösningsmedelskontroll används behövs ingen negativ kontroll. Lösningsmedelskontrollen bör ha den högsta koncentrationen av lösningsmedel som tillförs jorden och lösningsmedlet bör härstamma från samma sats som används för beredning av stamlösningen. Lösningsmedlets toxicitet och flyktighet och testkemikaliens löslighet i det valda lösningsmedlet bör vara de huvudsakliga kriterierna vid valet av lämpligt solubiliseringsmedel.

24. För kemikalier med dålig löslighet i vatten och organiska lösningsmedel kan 2,0–2,5 g finmald kvartssand per testkärl blandas med mängden testkemikalie, t.ex. genom mortling, för att få önskad testkoncentration. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den förhandsfuktade jorden och blandas omsorgsfullt med lämplig mängd avjoniserat vatten för att få önskad fukthalt. Den slutliga blandningen fördelas i testkärlen. Förfarandet upprepas för varje testkoncentration och likaså bereds en lämplig kontroll med 2,0–2,5 g finmald kvartssand per testkärl.

25. Koncentrationen av testkemikalie i jorden bör fastställas efter spikning. Innan testorganismerna tillförs jorden bör det kontrolleras att testkemikalien är homogent fördelad i jorden. Metoden för spikning och motivering för valet av ett visst spikningsförfarande bör rapporteras (24).

26. Jämvikten mellan jorden och porvattenfasen bör idealiskt sett etableras innan organismerna tillförs; en tidsperiod på fyra dagar vid 20 °C rekommenderas. För ett antal dåligt vattenlösliga organiska kemikalier kan tiden för att nå faktisk jämvikt mellan adsorberade och upplösta fraktioner räknas i dagar eller månader. Beroende på studiens ändamål, t.ex. om man vill efterlikna vissa miljöförhållanden, kan den spikade jorden få ”åldras” för en längre period, t.ex. för metaller i tre veckor vid 20 °C (22).

Odling av testorganismer

27. Maskarna bör helst hållas i en permanent laboratorieodling. Vägledning om laboratorieodlingsmetoder för *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* och arter av enchytraeider finns i tillägg 5 (se också (48) (51) (52)).

28. Maskarna som används för testet bör vara fria från synliga sjukdomar, abnormaliteter och parasiter.

TESTFÖRFARANDE

29. Testorganismerna exponeras för testkemikalien under upptagningsfasen. Upptagningsfasen ska pågå i 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar) utom om det kan påvisas att stabilt stadium har uppnåtts.

▼M4

30. För elimineringsfasen flyttas maskarna till en jord som inte innehåller testkemikalie. Den första provtagningen bör göras 4–24 timmar efter elimineringsfasens början. Exempel på provtagningsschema för en 21-dagars upptagningsfas och en 21-dagars elimineringsfas finns i tillägg 3.

Testorganismer

31. Många arter av jordlevande enchytraeider har en mycket låg individuell vikt (t.ex. 5–10 mg våtvikt per individ för *Enchytraeus albidus* och mindre för *Enchytraeus crypticus* eller *Enchytraeus luxuriosus*). För vägning och kemisk analys kan det vara nödvändigt att poola maskarna i replikattestkärlen (dvs. alla maskar i ett replikatkärl för att få de analytiska vävnadsresultaten). Tjugo individer enchytraeider tillförs varje replikat, och antalet replikat bör vara minst tre. Om testkemikaliens analytiska detektionsgräns är hög kan det krävas flera maskar. För testarter med högre individuell vikt (*Eisenia fetida* och *Eisenia andrei*) kan replikatkärl med en enda individ användas.

32. Daggmaskar som används i ett test bör ha liknande vikt (t.ex. *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* bör ha en individuell vikt på 250–600 mg). Enchytraeider (t.ex. *Enchytraeus albidus*) bör ha en längd på cirka 1 cm. Alla maskar som används i ett visst test bör komma från samma källa och vara vuxna individer med clitellum (gördel) (se tillägg 5). Eftersom ett djurs vikt och ålder kan påverka BAF-värdena (t.ex. beroende på varierande fettinnehåll och/eller förekomsten av ägg), bör dessa parametrar registreras noggrant och beaktas vid tolkningen av resultaten. Dessutom kan kokonger deponeras under exponeringsperioden, vilket också påverkar BAF-värdena. Det rekommenderas att ett delprov av testmaskarna vägs före testet för att få en uppskattning av våt och torr medelvikt.

33. Förhållandet mellan jord och maskar bör vara högt för att minimera sjunkande koncentration av testkemikalien i jorden under upptagningsfasen. För *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* bör det finnas en minimimängd på 50 g jord (torrvikt) per mask och för enchytraeider rekommenderas en minimimängd på 10–20 g jord (torrvikt) per testkärl. Jordlagret i kärlen bör vara 2–3 cm (enchytraeider) eller 4–5 cm (daggmaskar).

34. Testmaskarna tas bort ur odlingen (t.ex. enchytraeider med användning av guldsmedstång). Vuxna exemplar överförs till obehandlad testjord för acklimatisering och ges föda (se punkt 36). Om testbetingelserna avviker från odlingsbetingelserna bör en acklimatiseringsfas på 24–72 timmar vara tillräcklig för att maskarna ska anpassa sig till testbetingelserna. Efter acklimatiseringen sköljs maskarna genom att överföras till glaskärl (t.ex. petriskålar) som innehåller rent vatten, och därefter vägs maskarna innan de överförs till testjorden. Före vägningen ska överskottsvatten avlägsnas från maskarna genom att försiktigt stryka av dem längs skålens kant eller försiktigt torka av dem med en lätt fuktad pappersduk.

35. Testorganismernas nedgrävningsbeteende bör observeras och registreras. I test med daggmaskar gräver sig djuren (kontroll och behandling) in i jorden inom några timmar; detta bör kontrolleras senast 24 timmar efter att maskarna har placerats i testkärlen. Om maskarna inte gräver in sig i jorden (t.ex. över 10 % mer än hälften av maskarna i upptagningsfasen), tyder

▼M4

detta på att testbetingelserna är olämpliga eller att testorganismerna inte är friska. Då bör testet stoppas och göras på nytt. Enchytraeiderna vistas i huvudsak i jordens håligheter och det är vanligt att deras integument inte alltid kommer i kontakt med omgivande substrat; exponeringen av grävande och icke-grävande enchytraeider antas vara ekvivalent och om enchytraeiderna inte gräver in sig i jorden betyder detta inte nödvändigtvis att testet måste upprepas.

Utfodring

36. Utfodring rekommenderas om jorden har låg halt totalt organiskt kol. Om syntetisk jord används rekommenderas veckovis utfodring (dvs. maskarna får föda en gång i veckan) med 7 mg torr dynga per g torrvikt jord för daggmaskar och en veckovis mängd på 2–2,5 mg malda havreflingor per g torrvikt jord för enchytraeider (11). Den första portionen föda bör blandas med jorden omedelbart innan testorganismerna tillförs. Helst ska samma typ av föda som i odlingarna användas (tillägg 5).

Ljus och temperatur

37. Testningarna bör genomföras med en kontrollerad ljus/mörker-cykel på 16/8 timmar, helst med 400–800 lx i området där testkärlen finns (3). Testtemperaturen bör vara 20 ± 2 °C under hela testet.

Testkoncentrationer

38. En enda koncentration används. Om ytterligare koncentrationer används måste detta motiveras. Om testkemikaliens toxicitet (ECx) ligger nära den analytiska detektionsgränsen rekommenderas användning av radioaktivmärkt testkemikalie med hög specifik radioaktivitet. För metaller bör koncentrationen ligga över bakgrundsnivåerna i vävnad och jord.

Replikat

39. För kinetikmätningar (upptagnings- och elimineringsfaserna) bör det finnas minst tre behandlade replikatkärl per provtagningspunkt. Totalantalet replikat som bereds bör vara tillräckligt för att täcka alla provtagningstidpunkter under upptagnings- och elimineringsfaserna.

40. För biologiska observationer och mätningar (t.ex. förhållandet mellan torrvikt och våtvikt, fettinnehåll) samt för analys av bakgrundskoncentrationerna i maskar och jord, bör minst 12 replikatkärl med negativ kontroll (fyra provtagningar vid start, fyra vid slutet av upptagningen och fyra vid slutet av elimineringen) beredas om inget annat lösningsmedel än vatten används. Om solubiliseringsmedel används för applicering av testkemikalien bör det finnas en lösningsmedelskontroll (fyra replikatkärl för provtagningen vid start, fyra vid slutet av upptagningen och fyra vid slutet av eliminering-en) som innehåller alla beståndsdelar utom testämnet och som körs i tillägg till de behandlade replikaten. I detta fall kan fyra ytterligare replikatkärl med negativ kontroll (inget lösningsmedel) även användas för frivillig provtagning i slutet av upptagningsfasen. Dessa replikat kan jämföras biologiskt med lösningsmedelskontrollen för att få information om eventuella effekter av lösningsmedlet på testorganismerna. Likaså rekommenderas ett tillräckligt antal ytterligare reservreplikatkärl (t.ex. åtta) för behandling och kontroll(er).

▼M4

Frekvens för kvalitetsmätning av jord

41. Vid start och slut av upptagnings- och elimineringsfaserna bör jordens pH, fukthalt och temperatur mätas (kontinuerligt). En gång per vecka bör jordens fukthalt kontrolleras genom att väga testkärlen och jämföra de vikterna med vikterna vid testets början. Vattenförlust bör kompenseras genom tillförsel av avjoniserat vatten.

Provtagning och analys av maskar och jord

42. Exempel på ett schema för upptagnings- och eliminationsfaserna i bioackumuleringstest för daggmaskar och enchytraeider finns i tillägg 3.

43. Jordprover tas från testkärlen för bestämning av koncentrationen testkemikalie innan maskarna tillförs, samt under upptagnings- och elimineringsfaserna. Under testet bestäms koncentrationerna testkemikalie i maskarna och jorden. I regel mäts de totala koncentrationerna i jorden. Alternativt kan koncentrationerna i porvatten mätas, och då bör motivering och lämpliga metoder fastställas innan studien inleds, och inkluderas i rapporten.

44. Prover av maskar och jord tas minst sex gånger under upptagnings- och elimineringsfaserna. Om man kan påvisa att testkemikalien är stabil, kan antalet jordanalyser reduceras. Det rekommenderas att minst tre replikat analyseras i början och slutet av upptagningsfasen. Om koncentrationen i jord uppmätt i slutet av upptagningsfasen avviker från den ursprungliga koncentrationen med mer än 30 %, bör även jordprover som tagits andra dagar analyseras.

45. Ta bort maskarna i ett givet replikat varje gång prover ska tas (t.ex. genom att sprida ut jorden på en grund bricka och plocka bort maskarna med en mjuk guldsmedstång), och skölj dem snabbt i vatten på en grund glas- eller stålbricka. Avlägsna överflödigt vatten (se punkt 34). Överför maskarna försiktigt till ett förhandsvägt kärl och väg omedelbart kärlet plus maskar inklusive tarminnehåll.

46. Därefter bör daggmaskarna (*Eisena* sp.) lämnas över natten för tömning av tarminnehåll, t.ex. på ett fuktat filterpapper i en täckt petriskål (se punkt 34). Efter tömningen bestäms maskarnas vikt i syfte att bedöma eventuell minskning av biomassa under testet (se giltighetskriterierna i punkt 17). Vägning och vävnadsanalys av enchytraeider görs utan tarmtömning, eftersom detta är tekniskt svårt på grund av att maskarna är så små. Efter slutlig viktbestämning bör maskarna avlivas omedelbart med lämpligaste metod (t.ex. med flytande kväve eller nedfrysning under 18 °C).

47. Under elimineringsfasen ersätter maskarna förorenat tarminnehåll med ren jord. Det betyder att mätningar i otömda maskar (i detta fall enchytraeider) som tas ut omedelbart före elimineringsfasen inkluderar förorenad jord i tarmen. För vattenlevande oligochaeter antas att största delen av förorenat tarminnehåll har ersatts med rent sediment efter de första 4–24 timmarna av elimineringsfasen (se t.ex. (46)). Liknande resultat har rapporterats för daggmaskar i studier rörande ackumulering av radioaktivmärkt kadmium och zink (78). För icke-tömda enchytraeider kan koncentrationen i detta första prov från elimineringsfasen anses vara koncentrationen i vävnad efter tarmtömning. För att beakta den utspädning av testämneskoncentrationen som kan tillskrivas oförorenad jord under elimineringsfasen kan tarminnehållets vikt uppskattas från förhållandena mellan maskarnas våtvikt/askvikt eller torrvikt/askvikt.

▼M4

48. Jord- och maskproverna bör helst analyseras omedelbart efter att de tagits (inom 1–2 dagar) för att undvika nedbrytning eller andra förluster, och det rekommenderas att ungefärliga värden för upptagning och eliminering beräknas medan testet framskrider. Om analysen måste vänta, bör proverna förvaras på lämpligt sätt, t.ex. i djupfryst form (≤ –18 °C).

49. Kontroll bör göras av att den kemiska analysens precision och reproducerbarhet, såväl som extraktion av testkemikalie från jord- och maskproverna är tillfredsställande för den metod det gäller, och extraktionseffektiviteten, detektionsgränsen (LOD) och kvantifieringsgränsen (LOQ) bör rapporteras. Dessutom bör man kontrollera att testkemikalien inte kan detekteras i kontrollkärlen i koncentrationer som är högre än bakgrunden. Om koncentrationen av testkemikalie i testorganismen C_a är > 0 i kontrollmaskarna, bör detta inkluderas i beräkningen av de kinetiska parametrarna (se tillägg 2). Genom hela testet bör alla prover hanteras med tanke på minsta möjliga förorening och förlust (t.ex. till följd av att testkemikalien adsorberas på provtagningsutrustningen).

50. När radioaktivitetsmärkta testkemikalier används är det möjligt att analysera ursprunglig kemikalie och metaboliter. Kvantifiering av ursprunglig testkemikalie och metaboliter vid stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen ger viktig information. Proverna bör sedan putsas upp så att den ursprungliga testkemikalien kan kvantifieras separat. Om mängden av en enskild metabolit överskrider 10 % av den totala radioaktiviteten i det analyserade provet (de analyserade proverna) rekommenderas identifiering av dessa metaboliter.

51. Det totala utbytet, och utbytet av testkemikalie i maskar, jord och i förekommande fall fällor med adsorbenter som fångar upp avdunstad testkemikalie, bör registreras och rapporteras.

52. Pooling av enskilda prover från ett givet testkärl godtas för enchytraeider som är mindre än daggmaskar. Om poolingen inbegriper minskning av antalet replikat, begränsas de statistiska förfaranden som kan användas på erhållna data. Om det krävs ett specifikt statistiskt förfarande och en specifik tyngd, bör testet omfatta tillräckligt många replikatkärl för att få den pooling, det förfarande och den tyngd som önskas.

53. Det rekommenderas att BAF uttrycks både som funktion av total torrvikt och, när så krävs (t.ex. för starkt hydrofoba kemikalier), som en funktion av fettinnehållet. Lämpliga metoder bör användas för bestämning av fettinnehållet (vissa befintliga metoder, t.ex. (31) (58), bör anpassas för ändamålet). Dessa metoder bygger på en kloroform/metanol-extraktionsteknik. För att undvika klorerade lösningsmedel bör en modifiering av Bligh och Dyer-metoden (9) enligt beskrivningen i (17) användas. Eftersom de olika metoderna inte ger identiska värden, är det viktigt att beskriva den metod som använts. Om det är möjligt, dvs. om det finns tillräckligt med maskvävnad att tillgå, bör analysen av fettinnehåll helst göras på samma prov eller extrakt som det som används för analys av testkemikalien, eftersom fetterna ofta måste avlägsnas från extraktet innan det kan analyseras kromatografiskt (49). Alternativt kan kontrolldjur användas för att mäta fettinnehållet, som sedan kan användas för att normalisera BAF-värdena. Det senare förfarandet minskar föroreningen av utrustningen med testkemikalien.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

54. Upptagningskurvan för testkemikalien erhålls genom att plotta koncentrationen i/på maskarna under upptagningsfasen mot tiden enligt aritmetisk skala. När kurvan har nått en platå eller stabilt tillstånd (se definitionerna i tillägg 1) kan bioackumuleringsfaktorn vid stabilt tillstånd BAF_{ss} beräknas enligt följande:

$$\frac{C_a \text{ vid stabilt tillstånd eller slutet av upptagningsfasen (genomsnitt)}}{C_s \text{ vid stabilt tillstånd eller slutet av upptagningsfasen (genomsnitt)}}$$

C_a är testkemikaliens koncentration i testorganismen

C_s är testkemikaliens koncentration i jorden

55. Om stabilt tillstånd inte uppnås bör man i stället för att bestämma BAF_{ss} bestämma BAFK på grundval av upptagnings- och elimineringskonstanterna, enligt följande:

— Bestäm ackumuleringsfaktorn (BAF_K) som kvoten k_s/k_e.

— Upptagning och eliminering ska helst beräknas samtidigt (se ekvation 11 i tillägg 2).

— Elimineringskonstanten (k_e) bestäms i regel från elimineringskurvan (koncentrationen av testämnet i maskarna under elimineringsfasen). Därefter beräknas upptagningskonstanten k_s utifrån k_e, och ett värde på C_a som härleds från upptagningskurvan – se tillägg 2 för en beskrivning av dessa metoder. För att få BAF_K och konstanterna k_s och k_e rekommenderas datorstödda icke-linjära parameteruppskattningsmetoder. Om eliminering uppenbart inte är av första ordningen bör mer komplexa modeller användas.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— All tillgänglig information om akut toxicitet eller långtidstoxicitet (t.ex. EC_x, LC_x,, NOEC) av testkemikalien på jordlevande oligochaeter.

— Renhet, fysikalisk natur och fysikalkemiska egenskaper, t.ex. log K_{ow}, vattenlöslighet.

— Kemisk identifiering, källa, identitet och koncentration för eventuella lösningsmedel som använts.

— Om radioaktivmärkta testkemikalier används, uppgifter om exakt position för de märkta atomerna, specifik radioaktivitet och radiokemisk renhet.

Testarter:

— Vetenskapligt namn, stam, eventuell förbehandling, acklimatisering, ålder, storleksintervall osv.

▼M4

Testbetingelser:

— Testförfarande.

— Belysningens typ, egenskaper och ljusperiod(er).

— Testets utformning (t.ex. antalet kärl, kärlstorlek, jordmassa, jordlagrets tjocklek, antalet replikat, antalet maskar per replikat, antalet testkoncentrationer, upptagnings- och elimineringsfasernas varaktighet samt provtagningsfrekvens.

— Motivering för valet av testkärlens material.

— Metod för beredning och applicering av testämne samt motivering för valet av en specifik metod.

— Nominella testkoncentrationer, medelvärde för uppmätta värden och deras standardavvikelse i testkärlen och metoden för att erhålla dessa värden.

— Källa för beståndsdelarna i syntetisk jord eller – om naturligt medium används – jordens ursprung, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat för kontrollerna (överlevnad, utveckling av biomassa och reproduktion), jordens egenskaper (pH, totalhalten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procent sand, dy och lera), WHC_{max}, procentandelen vatten vid testets början och slut samt alla andra mätningar som har gjorts.

— Detaljerad information om behandling av jord- och maskprover, inbegripet detaljer om beredning, lagring, spikningsförfaranden, extraktion och analytiska förfaranden (inklusive precision) för testämne i maskar och jord, fettinnehåll (om uppmätt) och utbyte för testämnet.

Resultat:

— Mortalitet för kontrollmaskarna och maskarna i varje testkärl och allt observerat onormalt beteende (t.ex. undvikande av jorden och utebliven reproduktion i bioackumuleringstest med enchytraeider).

— Förhållandet mellan torrvikt och våtvikt för jorden och testorganismerna (utnyttjas vid normalisering).

— Maskarnas våtvikt vid varje provtagningstidpunkt; för daggmaskar våtvikterna vid testets början och vid varje provtagningstidpunkt före och efter tarmtömning.

— Testorganismernas fettinnehåll (om detta bestäms).

— Kurvor som visar upptagnings- -och elimineringskinetiken för testkemikalien i maskarna och tiden fram till stabilt tillstånd.

— C_a och C_s (med standardavvikelse och område, om lämpligt) för alla provtagningstidpunkter (C_a uttryckt som g per kg våtvikt och torrvikt för hela kroppen, C_s uttryckt som g per kg våtvikt och torrvikt för jord). Om det krävs en ackumuleringsfaktor biota-jord (BSAF) (t.ex. för jämförelse av resultat från två eller flera test med djur som har olika fettinnehåll), kan C_a även uttryckas som g per kg fettinnehåll i organismen och C_s kan uttryckas som g per kg organiskt kol i jorden.

— BAF (uttryckt som kg jord per kg mask), jordens upptagningskonstant k_s (uttryckt som g jord per kg mask per dag) och elimineringskonstanten k_e (uttryckt per dag), BSAF (uttryckt som kg totalt organiskt kol i jorden per kg fettinnehåll i mask) kan också rapporteras.

▼M4

— Om uppmätt: procentandelen ursprunglig kemikalie, metaboliter och bundna rester (den procentandel testkemikalie som inte kan extraheras med vanliga extraktionsmetoder) som detekteras i jord och testdjur.

— Metoder som använts för statistiska analyser av data.

Utvärdering av resultaten

— Resultatens överensstämmelse med giltighetskriterierna som förtecknas i punkt 17.

— Oförväntade eller ovanliga resultat, t.ex. ofullständig eliminering av testkemikalien från testdjuren.

LITTERATUR

(1) Amorim M. (2000), ”Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*”, examensarbete, University Coimbra.

(2) ASTM (2000), ”Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates”, *American Society for Testing and Materials*, E 1688–00a.

(3) ASTM International (2004), ”Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus”, ASTM International* (2004), s. 26.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000), ”The assessment of bioaccumulation”, I Hutzinger, O. (red.) *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek), ”Bioaccumulation - New Aspects and Developments”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 235–276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994), ”The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil”, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 93–99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. och Hermens J. (1993). ”The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water”, *Ecotox. Environ. Safety* 25, s. 154–165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995), ”Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*)”, *Ecotox. Environ. Safety* 31, s. 185–191.

(8) Bell A. W. (1958), ”The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus”, ann. Mus. Novitat.* 1902, s. 1–13.

(9) Bligh E. G. och Dyer W. J. (1959), ”A rapid method of total lipid extraction and purification”, *Can. J. Biochem.* Pysiol. 37, s. 911–917.

(10) Bouche M. (1972), ”Lombriciens de France. Ecologie et Systematique”, *INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale*, Paris, s. 671.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A, Spörlein P. (2001a), ”Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten”, rapport till tyska federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Berlin), R&D nr 298, s. 64–416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J. Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b), ”Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida)”, *Hydrobiologia* 463, s. 185–196.

(13) Conder J. M. och Lanno R. P. (2003), ”Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida”, J. Soils Sediments* 3, s. 13–20.

▼M4

(14) Connell D. W. och Markwell R. D. (1990), ”Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System”, *Chemosphere* 20, s. 91–100.

(15) Didden W. A. M. (1993), ”Ecology of Terrestrial Enchytraeidae”, *Pedobiologia* 37, s. 2–29.

(16) Didden W. (2003), ”Oligochaeta”, i *Bioindicators and biomonitors*, Markert, B. A., Breure, A.M. och Zechmeister, H. G. (red.) Elsevier Science Ltd, Nederländerna, s. 555–576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999), ”Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish”, Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D. R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995), ”Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, s. 140–145.

(19) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG, EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

(20) Edwards C. A. och Bohlen P. J. (1996), ”Biology and ecology of earthworms”, Tredje utgåvan, Chapman & Hall, London, s. 426.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. och Römbke J. (2009), ”Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten)”, rapport till tyska federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D nr 204 67 458, s. 149. Finns för nedladdning på: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

(23) Elmegaard N. och Jagers op Akkerhuis G. A. J. M. (2000), ”Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations”, National Environmental Research Institute, *NERI Technical Report* 325, s. 57.

(24) Environment Kanada (1995), ”Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant”, *Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.*

(25) EPPO (2003), ”Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions”, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33, s. 195–208.

(26) Franke C. (1996), ”How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?”, *Chemosphere* 32, s. 1897–1905.

(27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U., (1994), ”The assessment of bioaccumulation”, *Chemosphere* 29, s. 1501–1514.

(28) Füll C. (1996), ”Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae)”, Dissertation University Mainz, s. 156.

▼M4

(29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003), ”Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer”, *UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox.* 15, s. 78–84.

(30) Gabric A. J., Connell D. W., Bell P. R. F. (1990), ”A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes”, *Wat. Res.* 24, s. 1225–1231.

(31) Gardner W. S., Frez W. A., Cichocki E. A., Parrish C. C. (1985), ”Micro-methods for lipids in aquatic invertebrates”, *Limnology and Oceanography* 30, s. 1099–1105.

(32) Hawker D. W. och Connell D. W. (1988), ”Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish”, *Wat. Res.* 22, s. 701–707.

(33) Hund-Rinke K. och Wiechering H. (2000), ”Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests”, *J. Soils Sediments* 1, s. 15–20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), ”Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests” ingår i ”Toxikologische Beurteilung von Böden”, Heiden, S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (red.), Spektrum Verl., Heidelberg, s. 59–81.

(35) ISO 11268–2 (1998), *Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*. Del 2: *Determination of effects on reproduction*.

(36) Jaenike J. (1982), ”E*isenia foetida* is two biological species”, *Megadrilogica* 4, s. 6–8.

(37) Jager T. (1998), ”Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta)”, *Environ. Toxicol. Chem.* 17, s. 2080–2090.

(38) Jager T., Sanchez P. A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000), ”Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil”, *Environ. Toxicol. Chem.* 19, s. 953–961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A. C., Hogendoorn E. A., DeJong A., Kruitbosch J. A. W., Peijnenburg W. J. G. M. (2003a), ”Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures”, *Environ. Toxicol. Chem.* 22, s. 767–775.

(40) Jager T., Fleuren R. L. J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b), ”Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta)”, *Environ. Sci. Technol.* 37, s. 3399–3404.

(41) Janssen M. P. M., Bruins A., De Vries T. H., Van Straalen N. M. (1991), ”Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species”, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, s. 305–312.

(42) Kasprzak K, (1982), ”Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems”, *Pedobiologia* 23, s. 217–232.

(43) Khalil A. M. (1990), ”Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern”, *Dissertation University München*, s. 137.

(44) Landrum P. F. (1989), ”Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi”, Environ. Sci. Toxicol.* 23, s. 588–595.

(45) Marinussen M. P. J. C., Van der Zee S. E. A. T. M., De Haan F. A. (1997), ”Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions”, *Ecotox. Environ. Safety* 36, s. 17–26.

(46) Mount D. R., Dawson T. D., Burkhard L. P. (1999), ”Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates”, Environ. Toxicol. Chem.* 18, s. 1244–1249.

▼M4

(47) Nendza M. (1991), ”QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations”, i R. Nagel och R. Loskill (red.): *Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop*, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

(49) Kapitel C.13 i denna bilaga, Biokoncentration: Genomflödesprovning med fisk.

(50) Kapitel C.21 i denna bilaga, Jordlevande mikroorganismer: Test rörande omvandling av kväve.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H. och Luxton M. (1982), ”A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes”, *Oikos* 39, s. 287–388.

(55) Phillips D. J. H. (1993), ”Bioaccumulation”, ingår i *Handbook of Ecotoxicology* Vol. 1, Calow P. (red.). Blackwell Scientific Publ., Oxford, s. 378–396.

(56) Pflugmacher J. (1992), ”Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten”, *UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox*, 4, s. 77–81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F. A. (1996), ”oint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida”, RIVM Report No. 607506001*, Bilthoven.

(58) Randall R. C., Lee II H., Ozretich R. J., Lake J. L., Pruell R. J. (1991), ”Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation”, *Environ.Toxicol. Chem.* 10, s. 1431–1436.

(59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998), ”Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium”, *UBA-Texte* 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. och Moser Th. (1999), ”Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test” *UBA-Texte* 4/99, s. 373.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), ”Enchytraeen als Testorganismen”, i ”Toxikologische Beurteilung von Böden”, Heiden S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (reds), *Spektrum Verl*., Heidelberg, s. 105–129.

(62) Romijn CA. FM., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W.,Canton J. H. (1993), ”Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains”, *Ecotox. Envir. Safety* 27, s. 107–127.

(63) Sample B. E., Suter D. W., Beauchamp J. J., Efroymson R. A. (1999), ”Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation”, *Environ. Toxicol. Chem.* 18, s. 2110–2120.

(64) Schlosser H. J. och Riepert F. (1992), ”Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung”, *Zool. Beitr. NF* 34, s. 413–433.

(65) Schmelz R. och Collado R. (1999), ”*Enchytraeus luxuriosus sp*. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida)”, *Carolinea* 57, s. 93–100.

▼M4

(66) Sims R. W. och Gerard B. M. (1985), ”Earthworms”, i Kermack D. M. och Barnes R. S. K. (Hrsg.), *Synopses of the British Fauna (New Series)* nr 31, 171 S, London, E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J. P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A. J. A., Soares A.M. V. M. (2000), ”Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod”, *Environ. Toxicol. Chem.* 19, s. 2557–2563.

(68) Spacie A. och Hamelink J. L. (1982), ”Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish”, *Environ. Toxicol. Chem.* 1, s. 309–320.

(69) Stephenson G. L., Kaushik A., Kaushik N. K., Solomon K. R., Steele T., Scroggins R. P. (1998), ”Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms”, ingår i ”Advances in earthworm ecotoxicology”, Sheppard S., Bembridge J., Holmstrup M., Posthuma L. (red.), *Setac Press*, Pensacola, s. 67–81.

(70) Sterenborg I., Vork N. A., Verkade S. K., Van Gestel C. A. M., Van Straalen N. M. (2003), ”Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta”, Environ. Toxicol. Chemistry* 22, s. 1167–1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991), ”Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug”, *UBA-Texte* 42/91, Berlin.

(72) US EPA (2000), ”Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates”, andra utgåvan, EPA 600/R-99/064, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, mars 2000.

(73) Van Brummelen T. C. och Van Straalen N. M. (1996), ”Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber”, Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, s. 277–285.

(74) Van Gestel C. A. M. 1992), ”The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review”, i *Ecotoxicology of Earthworms* (red. Becker H., Edwards, P.J., Greig-Smith P. W. och Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C. A. och Ma W. C. (1990), ”An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies”, *Chemosphere* 21, s. 1023–1033.

(76) Van Straalen N. M., Donker M. H., Vijver M. G., van Gestel C. A. M. (2005), ”Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates”, *Environmental Pollution* 136, s. 409–417.

(77) Venter J. M. och Reinecke A. J. (1988), ”The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta)”, *South African J. Zool.* 23, s. 161–165.

(78) Vijver M. G., Vink J. P. M., Jager T., Wolterbeek H. T., van Straalen N. M., van Gestel C. A. M. (2005), ”Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil”, *Soil Biol, Biochem*. 37, s. 1843–1851.

(79) Widianarko B. och Van Straalen N. M. (1996), ”Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15, s. 402–406.

▼M4

Tillägg 1

DEFINITIONER

bioackumulering: ökningen av testkemikaliens koncentration i eller på en organism i förhållande till testkemikaliens koncentration i det omgivande mediet. Bioackumulering uppstår till följd av både biokoncentrations- och biomagnifieringsprocesser (se nedan).

biokoncentration: ökningen av testkemikaliens koncentration i eller på en organism till följd av upptagning av kemikalien som endast sker från det omgivande mediet (t.ex. via kroppsytan och förtärd jord) i förhållande till testkemikaliens koncentration i det omgivande mediet.

biomagnifiering: ökningen av testkemikaliens koncentration i eller på en organism, främst till följd av upptagning från förorenad föda eller förorenat byte, i förhållande till testkemikaliens koncentration i födan eller bytet. Biomagnifiering kan leda till överföring eller ackumulering av testämnet inom näringsvävar.

eliminering: eliminering av en testkemikalie betyder att kemikalien avlägsnas från testorganismens vävnad genom aktiva eller passiva processer som inträffar oberoende av om testämnet finns eller inte finns i det omgivande mediet.

bioackumuleringsfaktor (BAF): den koncentration av testkemikalien under valfri tidpunkt under upptagningsfasen som förekommer i eller på testorganismen (C_a uttryckt som g per kg torrvikt mask) dividerad med testkemikaliens koncentration i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g per kg torrvikt jord); BAF uttrycks med enheten kg jord per kg mask.

bioackumuleringsfaktor vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}): den BAF som gäller vid stabilt tillstånd och som inte förändras betydligt över en längre tidsperiod medan koncentrationen av testkemikalie i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g per kg torrvikt jord) är konstant under denna tidsperiod.

kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_K): de bioackumuleringsfaktorer som beräknas direkt från förhållandet mellan upptagningskonstant och elimineringskonstant (k_s och k_e, se nedan).

bioackumuleringsfaktor biota-jord (BSAF): den fettnormaliserade koncentrationen av testkemikalien i eller på testorganismen dividerad med den organiskt kol-normaliserade koncentrationen av testkemikalien vid stabilt tillstånd. C_a uttrycks som g per kg fettinnehåll i organismen och C_s som g per kg organiskt innehåll i jorden; BSAF har enheten kg organiskt kol per kg fett.

platå eller stabilt tillstånd: jämvikt råder mellan upptagnings- och elimineringsprocesser som inträffar samtidigt under exponeringsfasen. Stabilt tillstånd syns i kurvan över BAF mot tiden när kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande analyser av BAF på prover som tagits med minst två dagars mellanrum ligger inom 20 % från varandra, och det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan de tre provtagningsperioderna. För testkemikalier som tas upp långsamt är det lämpligare med ett intervall på sju dagar (49).

fördelningskoefficienten organiskt kol-vatten (K_{oc}): förhållandet mellan en kemikalies koncentration i eller på jordens fraktion av organiskt kol och kemikaliens koncentration i vatten vid jämvikt.

fördelningskoefficienten oktanol-vatten (K_{ow}): förhållandet mellan en kemikalies löslighet i n-oktanol och i vatten vid jämvikt; uttrycks även som P_{ow}. Logaritmen av K_{ow} (log K_{ow}) används som indikator för en kemikalies potential för bioackumulering i vattenlevande organismer.

▼M4

upptagnings- eller exponeringsfasen: den tid under vilken testorganismerna är exponerade för testkemikalien.

upptagningskonstant (k_s): ett numeriskt värde som definierar hur snabbt koncentrationen av testämnet ökar i eller på testorganismen till följd av upptagning från jordfasen; k_s uttrycks som g jord per kg mask per dag.

elimineringsfas: den tid efter överföringen av testorganismerna från ett förorenat medium till ett medium som inte innehåller testämne, under vilken eliminering (eller nettoförlust) av kemikalien från testorganismerna studeras.

elimineringskonstant (k_e): det numeriska värde som definierar reduktionshastigheten för koncentrationen av testämne i eller på testorganismen efter överföring av testorganismerna från ett medium som innehåller testämnet till ett medium som inte innehåller testämnet; k_e uttrycks som d^{-1}.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Beräkning av upptagnings- och elimineringsparametrar

Den huvudsakliga endpointen för ett bioackumuleringstest är bioackumuleringsfaktorn BAF. Uppmätt BAF kan beräknas genom att dividera koncentrationen i testorganismen C_a med koncentrationen i jorden C_s vid stabilt tillstånd. Om stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen beräknas BAF_K utifrån konstanterna i stället för utifrån BAF_{SS}. Det bör dock finnas en anmärkning om huruvida BAF är baserat på koncentrationer vid stabilt tillstånd eller inte.

Den vanliga metoden för att få fram kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_K), upptagningskonstant (k_s) och elimineringskonstant (k_e) är att använda icke-linjära datorbaserade parameteruppskattningsmetoder, t.ex. baserade på de modeller som beskrivs i (68). Utifrån en viss uppsättning sekventiella tid-koncentrationsdata och modellekvationerna

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 1)}$$

eller

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(ekvation 2)}$$

där

C_a = koncentrationen kemikalie i maskar (g per kg våt- eller torrvikt)

k_s = upptagningshastigheten i vävnad (g jord per kg mask per dag)

C_s = koncentrationen kemikalie i jord (g per kg våt- eller torrvikt)

k_e = elimineringskonstant (d^{-1})

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen

beräknar dessa datorprogram värden för BAF_K, k_s och k_e.

Om bakgrundskoncentrationen i icke-exponerade maskar t.ex. på dag 0 avviker betydligt från noll (kan vara fallet t.ex. för metaller) bör denna bakgrundskoncentration $C_{a,0}$ införlivas i ekvationerna, enligt följande:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 3)}$$

och

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(ekvation 4)}$$

Om en signifikant minskning av testkemikaliekoncentrationen i jorden kan observeras över tid under upptagningsfasen, kan följande modeller användas, t.ex. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{(ekvation 5)}$$

▼M4

där

C_s = kemikaliekoncentrationen i jorden (g per kg våt- eller torrvikt)

k_0 = sönderfallskonstant i jord (d^{-1})

C_0 = ursprunglig kemikaliekoncentration i jord (g per kg våt- eller torrvikt)

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 6)}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{(ekvation 7)}$$

där

C_a = koncentrationen kemikalie i maskar (g per kg våt- eller torrvikt)

k_s = upptagningshastigheten i vävnad (g jord per kg mask per dag)

k_0 = sönderfallskonstant i jord (d^{-1})

k_e = elimineringskonstant (d^{-1})

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen.

Om stabilt tillstånd nås under upptagningsfasen (t.ex. $t = \infty$) kan ekvation 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 1)}$$

reduceras till

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

eller

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{(ekvation 8).}$$

Då är k_s/k_e x C_s en tillnärmning av testämneskoncentrationen i maskvävnad vid stabilt tillstånd ($C_{a,ss}$).

Ackumuleringsfaktorn biota-jord (BSAF) kan beräknas enligt följande:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{(ekvation 9)}$$

där f_{oc} är fraktionen organiskt kol i jorden och f_{lip} är fraktionen fett i maskar, båda helst bestämda på prover som tagits i testet och på grundval av torrvikt eller våtvikt.

Elimineringskinetiken kan modelleras med stöd av data från elimineringsfasen och med tillämpning av följande modellekvation och en datorstödd icke-linjär metod för modelluppskattning. Om datapunkterna plottade mot tiden indikerar en konstant exponentiell minskning av testämneskoncentrationen i djuren, kan en one-compartment-modell (ekvation 9) användas för att beskriva elimineringens tidsförlopp.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{(ekvation 10)}$$

▼M4

Elimineringsprocesserna verkar i bland ha två faser med en snabb minskning av C_a till en början och därefter en långsammare avgång av testämne senare under elimineringen, t.ex. (27) (68). De två faserna kan tolkas genom antagande om att det finns två olika enheter i organismen från vilka testämnet avgår med olika hastigheter. I sådana fall bör information inhämtas från specifik litteratur, t.ex. (38) (39) (40) (78).

Med användning av modellekvationerna ovan kan de kinetiska parametrarna k_s och k_e även kalkyleras i ett steg genom att samtidigt tillämpa modeller för första ordningens kinetik på alla data från både upptagnings- och elimineringsfasen. Beskrivning av en metod som ger möjlighet till en sådan kombinerad beräkning av upptagnings- och elimineringskonstanter kan sökas i hänvisningarna (41), (73) och (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{(ekvation 11)}$$

Anmärkning: När upptagnings- och elimineringsparametrar uppskattas samtidigt utifrån kombinerade upptagnings- -och elimineringsdata är ”m” såsom visas i ekvation 11 en deskriptor som gör det möjligt för datorprogrammet att tilldela ekvationens subtermer till datauppsättningarna för respektive fas och göra utvärderingen korrekt (m = 1 för upptagningsfasen och m = 2 för elimineringsfasen).

Dessa modellekvationer bör dock användas med försiktighet, särskilt när det sker ändringar i testkemikaliens biotillgänglighet eller om (bio)nedbrytning sker under testet (se t.ex. (79)).

▼M4

Tillägg 3

EXEMPEL PÅ SCHEMAN FÖR TEST AV BIOACKUMULERING FRÅN JORDAR

Test med daggmaskar

a) Upptagningsfas med 8 provtagningsdatum som används för beräkning av kinetik.

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering av förberedd jord under 48 timmar.
– 4	Spikning av jordfraktionen med testkemikalielösning, avdunstning av eventuellt lösningsmedel, blandning av jordbeståndsdelarna, fördelning av jord i testkärlen och stabilisering till jämvikt under testbetingelserna i 4 dagar (3 veckor för metallspikad jord).
– 3 till – 1	Separation av testorganismerna från odlingen för acklimatisering, beredning och fuktning av jordbeståndsdelarna.
0	Mätning av temperatur och jordens pH, avlägsnande av jordprover från behandlade kärl och lösningsmedelskontroller för bestämning av testkemikaliens koncentration, tillsats av föda, vägning och slumpvis fördelning av maskarna till testkärlen med bibehållande av tillräckligt antal maskar för bestämning av analytiska bakgrundsvärden, våt- och torrvikt och fettinnehåll, vägning av alla testkärl för kontroll av jordens fukthalt och kontroll av lufttillförsel om stängda testsystem används.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av koncentrationen testämne.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5–6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
8–9	Samma som dag 3.
10	Samma som dag 1.
11–13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
15–16	Samma som dag 3.
17	Samma som dag 1.
18–20	Samma som dag 3.

▼**M4**

Dag	Aktivitet
21	Samma som dag 1: mätning av temperatur och jordens pH, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen, slut på upptagningsfasen, överföring av maskarna från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord för elimineringsfasen (ingen tarmtömning) samt provtagning av jord och maskar från lösningsmedelskontrollerna.
	Aktiviteterna före exponering (stabiliseringsfasen) bör tidplaneras med beaktande av testkemikaliens egenskaper.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

b) Elimineringsfas

Dag	Aktivitet
– 6	Beredning och fuktning av jordens beståndsdelar samt konditionering av beredd jord i 48 timmar.
– 4	Blandning av jordens beståndsdelar, fördelning av jord till testkärlen och inkubation under testbetingelserna i 4 dagar.
0 (upptagningsfasens slut)	Mätning av temperatur och jordens pH, vägning och slumpmässig fördelning av maskar till testkärlen, tillförsel av föda, överföring av maskar från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord samt tagning av jord- och maskprover efter 4–6 timmar för bestämning av testkemikaliens koncentration.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av testkemikaliens koncentration.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5–6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
8–9	Samma som dag 3.
10	Samma som dag 1.
11–13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
15–16	Samma som dag 3.
17	Samma som dag 1.

▼M4

Dag	Aktivitet
18–20	Samma som dag 3.
21	Samma som dag 1: mätning av temperaturen och jordens pH, kontroll av jordens fuktighet genom vägning av testkärlen samt tagning av jord- och maskprover från lösningsmedelskontrollerna.
	Beredning av jorden före elimineringsfasens början bör göras på samma sätt som beredningen före upptagningsfasen.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

Test med enchytraeider

a) Upptagningsfas med 8 provtagningsdatum som används för beräkning av kinetik.

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering av förberedd jord under 48 timmar.
– 4	Spikning av jordfraktionen med testkemikalielösning, avdunstning av eventuellt lösningsmedel, blandning av jordbeståndsdelarna, fördelning av jord i testkärlen och stabilisering till jämvikt i testbetingelserna i 4 dagar (3 veckor för metallspikad jord).
– 3 till – 1	Separation av testorganismerna från odlingen för acklimatisering, beredning och fuktning av jordbeståndsdelarna.
0	Mätning av temperatur och jordens pH, avlägsnande av jordprover från behandlade kärl och lösningsmedelskontroller för bestämning av testkemikaliens koncentration, tillsats av föda till jorden, vägning och slumpvis fördelning av maskarna till testkärlen med bibehållande av tillräckligt antal maskar för bestämning av analytiska bakgrundsvärden, våt- och torrvikt och fettinnehåll, vägning av alla testkärl för kontroll av jordens fukthalt och kontroll av lufttillförsel om stängda testsystem används.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av koncentrationen testämne.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5–6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda till jorden, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
9	Samma som dag 1.
10	Samma som dag 3.

▼**M4**

Dag	Aktivitet
11	Samma som dag 1.
12–13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda till jorden, mätning av temperaturen och jordens pH, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen; slut på upptagningsfasen; överföring av maskarna från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord för elimineringsfasen (ingen tarmtömning) samt provtagning av jord och maskar från lösningsmedelskontrollerna.
	Aktiviteterna före exponering (stabiliseringsfasen) bör tidplaneras med beaktande av testkemikaliens egenskaper.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

▼M4

Tillägg 4

Syntetisk jord – rekommendationer för beredning och lagring

Eftersom naturjordar från en viss källa inte alltid finns att tillgå under hela året, och ingående organismer och mikroföroreningar kan påverka testet, rekommenderas syntetiskt substrat, syntetisk jord enligt kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet för daggmaskar (48), för användning i detta test. Flera olika testarter kan överleva, växa och föröka sig i denna jord, och den ger också maximal standardisering såväl som jämförbarhet inom och mellan laboratorier och odlingsbetingelser.

Jordens beståndsdelar

Torv:	10 %	Sphagnum-torv, enligt OECD:s riktlinje 207 (48)
Kvartssand:	70 %	Industriell kvartssand (lufttorkad), minst 50 % av partiklarna bör ha en storlek inom området 50–200 μm, men alla partiklar bör vara ≤ 2 mm
Kaolinitlera:	20 %	Kaolinithalt ≥ 30 %
Kalciumkarbonat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulveriserat, kemiskt rent

Alternativt kan jordens organiska kolhalt minskas, t.ex. genom att sänka torvhalten till 4–5 % av torrjord och öka sandhalten i motsvarande grad. Med en sådan minskning av halten organiskt kol kan möjligheterna till adsorption av testkemikalien till jorden (organiskt kol) minskas, och då blir testkemikalien bättre tillgänglig för maskarna (74). Det har demonstrerats att *Enchytraeus albidus* och *Eisenia fetida* kan uppfylla validitetskriterierna för reproduktion vid testning i fältjordar med lägre halt organiskt kol, t.ex. 2,7 % (33), (61), och det finns erfarenheter som visar att detta också kan uppnås i syntetisk jord med 5 % torv.

Beredning

Jordens torra beståndsdelar blandas omsorgsfullt (t.ex. i en storskalig laboratorieblandare). Detta bör göras cirka en vecka innan testet inleds. De blandade torra jordbeståndsdelarna bör fuktas med avjoniserat vatten minst 48 timmar före applicering av testämnet för att nå surhetsjämvikt. För bestämning av pH används en blandning av jord och 1 M lösning av KCl i förhållandet 1:5. Om pH-värdet inte ligger inom rekommenderat område (6,0 ± 0,5) bör tillräcklig mängd $CaCO_3$ tillföras jorden eller så måste en ny sats jord beredas.

Den syntetiska jordens maximala vattenhållningskapacitet (WHC) bestäms enligt ISO 11268-2 (35). Minst två dagar innan testet inleds fuktas den torra syntetiska jorden med tillräcklig mängd avjoniserat eller rekonstituerat vatten till en vattenhalt som motsvarar cirka hälften av den slutliga vattenhalten. Den slutliga vattenhalten bör vara cirka 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet (WHC). Vid teststart ska den förhandsfuktade jorden delas upp i lika många delar som antalet testkoncentrationer och kontroller som används för testet, och fukthalten justeras till 40–60 % av WHC_{max} genom användning av en lösning av testämnet och/eller genom tillförsel av avjoniserat eller rekonstituerat vatten. Fukthalten bestäms i början och i slutet av testet (vid 105 °C). Fukthalten bör vara optimal för den art som testas (fukthalten kan också kontrolleras genom att försiktigt krama jorden i handen och då bör det komma fram små vattendroppar mellan fingrarna).

▼M4

Förvaring

De torra beståndsdelarna av syntetisk jord kan förvaras i rumstemperatur fram till användningen. Den förberedda förfuktade jorden kan förvaras i svalt utrymme i upp till tre dagar före spikningen, och vattenavdunstningen bör minimeras. Jord som spikats med testämne bör användas omedelbart, med undantag för om det finns information om att jorden i fråga kan förvaras utan att testämnets toxicitet och biotillgänglighet påverkas. Prover av spikad jord kan sedan förvaras i de förhållanden som rekommenderas för testsystemet i fråga fram till analys.

▼M4

Tillägg 5

Arter av jordlevande oligochaeter som rekommenderas för testning av bioackumulering från jord

Daggmaskar

Rekommenderad testart är *Eisenia fetida* (Savigny 1826), som tillhör familjen Lumbricidae. Från och med 1972 är den uppdelad i två underarter (*Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* (10)). Enligt Jaenike (36) är dessa äkta, separata arter. *Eisenia fetida* känns lätt igen genom de klargula banden mellan segmenten medan *Eisenia andrei* har en enhetlig mörkröd färg. De härstammar sannolikt från Svartahavsregionen och finns numera över hela världen, särskilt i antropogent modifierade livsmiljöer såsom komposthögar. Båda kan användas för både ekotoxikologiska test och bioackumuleringstest.

Eisenia fetida och *Eisenia andrei* säljs allmänt på marknaden, t.ex. som fiskbete. Jämfört med andra daggmaskar (familjen Lumbricidae) har de en kort livscykel och når vuxenstadiet inom cirka 2–3 månader (vid rumstemperatur). Den optimala temperaturen för dessa daggmaskar ligger kring 20–24 °C. De föredrar relativt fuktiga substrat med nästan neutralt pH och en hög halt av organiskt material. Dessa arter har använts i stor utsträckning i standardiserade ekologiska tester i cirka 25 år och odling av dem är därför väl etablerad (48) (77).

Båda arterna kan odlas i ett stort urval djuravfall. Som odlingsmedium rekommenderas enligt ISO (35) en 50/50-blandning av häst- eller boskapsgödsel och torv. Mediet bör ha pH på cirka 6–7 (reglerat med kalciumkarbonat), låg jonisk konduktivitet (lägre än 6 mS/cm eller en salthalt under 0,5 %) bör inte ha för hög halt av ammoniak eller animaliskt urin. Likaså kan man använda kommersiell trädgårdsjord fri från tillsatser eller syntetisk jord enligt OECD (48) eller en 50/50-blandning av båda. Substratet bör vara fuktigt men inte för vått. Lämplig storlek på odlingslådorna är 10–50 liter.

För att få maskar med standardålder och standardmassa är det bäst att inleda odlingen med kokonger. För detta tillsätts vuxna maskar till en odlingslåda med färskt substrat för att de ska producera kokonger. Erfarenheterna har visat att en populationsdensitet på cirka 100 vuxna maskar per kg substrat (våtvikt) ger goda förökningsnivåer. Efter 28 dagar avlägsnas de vuxna maskarna. Daggmaskarna som kläckts ur kokonger används för testning när de har nått vuxenstadium efter minst 2 månader men högst 12 månader.

Maskar av de arter som beskrivs ovan kan anses vara friska om de rör sig genom substratet, inte försöker lämna substratet och förökar sig kontinuerligt. Mycket långsamma rörelser eller gul bakre del (i fråga om *Eisenia fetida*) tyder på utarmat substrat. Då rekommenderas färskt substrat och/eller mindre antal djur per låda.

Valda ytterligare hänvisningar

Gerard B. M. (1964), *Synopsis of the British fauna*, nr 6 Lumbricidae, *Linnean Soc.* London, 6, s. 1–58.

Graff O. (1953), ”Die Regenwürmer Deutschlands”, *Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch.* 7, s. 1–81.

Römbke J. E., Egeler P., Füll C. (1997), ”Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium”, *Bericht für das UBA*, F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977), ”Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden”, *Oikos* 28, s. 49–55.

Satchell J. E. (1955), ”Some aspects of earthworm ecology”, *Soil Zoology (Kevan)*, s. 180–201.

▼M4

Sims R. W. och Gerard B. M. (1985), ”A synopsis of the earthworms”, *Linnean Soc. London*, 31, s. 1–171.

Tomlin A. D. (1984), ”The earthworm bait market in North America”, ingår i ”Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture”. Satchell, J.E. (red.), Chapman & Hall, London, s. 331–338.

Enchytraeider

Den rekommenderade testarten är *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (vit ringmask). *Enchytraeus albidus* är en av de största arterna (upp till 15 mm) bland ringmaskar (Annelida) i Oligochaetfamiljen Enchytraeidae och finns över hela världen, se t.ex. (8). *Enchytraeus albidus* finns i marina och limniska livsmiljöer och livsmiljöer på land, främst i multnande organiskt material (tång, kompost) men är sällsynt på ängar (42). Denna breda ekologiska tolerans och vissa morfologiska variationer tyder på att det kan finnas olika raser av denna art.

Enchytraeus albidus säljs allmänt på marknaden som fiskfoder. Kontroll bör göras av om odlingen är förorenad av andra, i regel mindre arter (60). Om förorening förekommer bör alla maskar tvättas med vatten i en petriskål. Stora vuxna exemplar av *Enchytraeus albidus* väljs sedan ut (med användning av stereomikroskop) för start av en ny odling. Alla andra maskar kasseras. Livscykeln är kort eftersom maskarna blir könsmogna mellan 33 dagar (vid 18 °C) och 74 dagar (vid 12 °C). Endast odlingar som har hållits i laboratoriet minst 5 veckor (en generation) utan problem får användas för testning.

Även andra arter av *Enchytraeus* är lämpliga, särskilt *Enchytraeus luxuriosus.* Denna art är en äkta jordlevande mask, vilket nyligen har beskrivits i (65). Om andra arter av *Enchytraeus* används bör de identifieras tydligt och rapporten bör innehålla motivering för valet av denna art.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) är en art som tillhör samma grupp som *Enchytraeus luxuriosus*. Man har inte med säkerhet kunna bekräfta dess existens på fältet, eftersom den endast har beskrivits utifrån daggmaskodlingar och komposthögar (Römbke 2003). Artens ursprungliga ekologiska krav är därför inte kända. Nyligen gjorda laboratoriestudier av olika slags fältjordar har dock bekräftat att denna art har en bred tolerans när det gäller jordegenskaper som pH och textur (Jänsch m.fl. 2005). Under de senaste åren har denna art ofta använts i ekotoxikologiska studier eftersom den är lätt att odla och testa(se t.ex. Kuperman m.fl. 2003). Den är dock liten (3–12 mm, i genomsnitt 7 mm, Westheide & Müller 1996), vilket gör hanteringen svårare i jämförelse med *Enchytraeus albidus*. När denna art används i stället för *Enchytraeus albidus*, kan storleken på testkärlen vara mindre, men det är inget krav. Dessutom bör man beakta att arten förökar sig mycket snabbt med en generationstid på mindre än 20 dagar vid 20 ± 2 °C (Achazi m.fl. 1999) och ännu snabbare vid högre temperaturer.

Enchytraeider av arten *Enchytraeus albidus* (såväl som andra *Enchytraeus*-arter) kan odlas i stora plastlådor (t.ex. 30 × 60 × 10 cm eller 20 × 12 × 8 cm, som lämpar sig för odling av små maskar) fyllda med en blandning av syntetisk jord och allmänt tillgänglig oförorenad trädgårdsjord utan tillsatser. Kompostmaterial bör undvikas eftersom det kan innehålla giftiga kemikalier såsom tungmetaller. Fauna bör avlägsnas från odlingsjorden före användning genom djupfrysning i tre omgångar. Rent syntetisk jord kan också användas men då kan förökningshastigheten vara lägre jämfört med blandade substrat. Substratet bör ha pH 6,0 ± 0,5. Odlingen hålls i en inkubator vid 15 ± 2 °C utan ljus. Under alla omständigheter ska temperaturer över 23 °C undvikas. Jorden (syntetisk eller naturlig) ska vara fuktig men inte våt. När jorden kramas försiktigt i handen ska endast små vattendroppar komma fram. Under alla omständigheter bör anoxiska betingelser undvikas (om t.ex. lock används, bör det ha tillräckligt antal hål för att ge tillräcklig luftväxling). Odlingsjorden bör luftas genom försiktig omblandning en gång per vecka.

▼M4

Maskarna bör utfodras minst en gång per vecka ad libitum med havreflingor som placeras i en kavitet på jordens yta och täcks med jord. Om det finns kvar foder från föregående utfodring bör mängden foder justeras i motsvarande grad. Om det växer svamp på överblivet foder bör det ersättas med en ny mängd havreflingor. För att stimulera förökningen kan havreflingorna kompletteras med allmänt tillgängligt vitaminberikat proteinpulver varannan vecka. Efter tre månader överförs djuren till en färsk kultur eller färskt odlingssubstrat. Havreflingorna ska förvaras i kärl med tättslutande lock och bör behandlas i autoklav eller hettas upp före användning för att undvika infektion med mjölkvalster (t.ex. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) eller rovkvalster (t.ex. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Efter desinfektering mals fodret så att det enkelt kan spridas på jordytan. En annan tänkbar foderkälla är bakningsjäst eller fiskfoder Tetra-Min®.

Allmänt taget gäller att odlingsbetingelserna är tillräckliga om maskarna inte försöker lämna substratet, rör sig snabbt genom jorden, har en glansig yta utan vidhäftande jordpartiklar, har en mer eller mindre vitaktig färg och det går att iaktta maskar av olika åldrar. Dessutom kan maskarna anses vara friska om de förökar sig kontinuerligt.

Valda ytterligare hänvisningar

Achazi R. K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999), ”The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta)”, *Newsletter on Enchytraeidae* 6, s. 117–126.

Jänsch S., Amorim M. J. B., Römbke J. (2005), ”Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species”, *Environ. Reviews* 13, s. 51–83.

Kuperman R. G., Checkai R. T., Simini M., Phillips C. T., Kolakowski J. E., Kurnas C. W., Sunahara G. I. (2003), ”Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX”, *Pedobiologia* 47, s. 651–656.

Römbke J. (2003), ”Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review”, *Pedobiologia* 47, s. 607–616.

Westheide W. och Graefe U. (1992), ”Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida)”, *J. Nat. Hist.* 26, s. 479–488.

Westheide W. och Müller M. C. (1996), ”Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology”, *Hydrobiologia* 334, s. 263–267.