

II

(Ikke-lovgivningsmæssige retsakter)

FORORDNINGER

KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) Nr. 260/2014

af 24. januar 2014

om tilpasning til den tekniske udvikling af forordning (EF) nr. 440/2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

(EØS-relevant tekst)

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF ⁽¹⁾, særlig artikel 13, stk. 3, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 ⁽²⁾ indeholder de testmetoder til bestemmelse af stoffers fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet, som skal anvendes i forbindelse med forordning (EF) nr. 1907/2006.

(2) Det er nødvendigt at ajourføre forordning (EF) nr. 440/2008 ved, at der med høj prioritet indsættes nye og ajourførte alternative testmetoder, som OECD har vedtaget for nylig, således at antallet af dyr, der anvendes til forsøg, begrænses i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes

til videnskabelige formål ⁽³⁾, og Rådets direktiv 86/609/EØF af 24. november 1986 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om beskyttelse af dyr, der anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål ⁽⁴⁾.

(3) Tilpasningen omfatter to metoder til bestemmelse af fysisk-kemiske egenskaber, herunder en ajourføring af testmetoden til bestemmelse af vandopløselighed og en ny testmetode til bestemmelse af fordelingskoefficienten, som er relevante for vurderingen af persistente, bioakkumulerende og toksiske stoffer (PBT); fire nye og en ajourført metode til bestemmelse af økotoksicitet og skæbne og opførsel i miljøet; ni metoder til bestemmelse af toksicitet og andre sundhedseffekter, herunder fire testmetoder til bestemmelse af inhalationstoksicitet, som omfatter en ajourføring af tre metoder og en ny metode til at reducere antallet af dyr, der anvendes, og forbedre vurderingen af virkninger, en ajourføring af testmetoden til bestemmelse af toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral), så den omfatter parametre til vurdering af endokrin aktivitet, en ajourføring af toksikokinetiktestmetoden, som er relevant for designet og forståelsen af toksikologiske undersøgelser, og en ajourføring af testmetoderne til bestemmelse af kronisk toksicitet, karcinogenicitet og kronisk toksicitet/karcinogenicitet.

(4) Forordning (EF) nr. 440/2008 bør ændres i overensstemmelse hermed.

(5) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra det udvalg, der er nedsat ved artikel 133 i forordning (EF) nr. 1907/2006 —

⁽¹⁾ EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

⁽²⁾ EUT L 142 af 31.5.2008, s. 1.

⁽³⁾ EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33.

⁽⁴⁾ EFT L 358 af 18.12.1986, s. 1.

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 ændres som angivet i bilaget til denne forordning.

Artikel 2

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

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

Udfærdiget i Bruxelles, den 24. januar 2014.

På Kommissionens vegne

José Manuel BARROSO

Formand

BILAG

I bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 foretages følgende ændringer:

1) Kapitel A.6 affattes således:

»A.6. VANDOPLØSELIGHED

INDLEDNING

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

INDLEDENDE OVERVEJELSER

2. Et stofs vandopløselighed kan i betragtelig grad afhænge af tilstedeværelsen af urenheder. Metoden omfatter bestemmelse af opløseligheden i vand af stoffer, som i det væsentlige er rene, og som er stabile i vand og ikke flygtige. Inden vandopløseligheden bestemmes, er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om teststoffets strukturformel, damptryk, dissociationskonstant og hydrolyse som funktion af pH.
3. To metoder, kolonne-eluerings-metoden og kolbe-metoden, som omfatter opløselighed henholdsvis under og over 10^{-2} g/l, er beskrevet i denne testmetode. En simpel foreløbig test er også beskrevet. Den gør det muligt at bestemme, hvor meget materiale der omtrentligt skal anvendes i den endelige test, og hvor lang tid der omtrentligt kræves til at opnå mætning.

DEFINITIONER OG ENHEDER

4. Et stofs opløselighed i vand er mætningskoncentrationen af stoffet i vand ved en given temperatur.
5. Opløselighed i vand angives i masse pr. rumfang opløsning. SI-enheden er kg/m^3 (g/l kan dog også anvendes).

REFERENCEKEMIKALIER

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

BESKRIVELSE AF METODERNE

Testbetingelser

7. Testen udføres helst ved $20^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. Den valgte temperatur bør holdes konstant i alle relevante dele af udstyret.

Indledende test

8. Stigende mængder vand tilsættes trinvis ved stuetemperatur til ca. 0,1 g af prøven (faste teststoffer skal være pulveriserede) i et 10 ml måleglas med glasprop. Efter hver tilsætning af vand omrystes blandingen kraftigt i 10 minutter, og det undersøges visuelt, om der er noget uopløst af prøven tilbage. Hvis prøven eller dele af prøven forbliver uopløst, efter at der er tilsat 10 ml vand, fortsættes testen i et 100 ml måleglas. Den anslåede opløselighed er angivet i tabel 1 nedenfor under den mængde tilsat vand, der netop forårsagede en fuldstændig opløsning af prøven. Hvis opløseligheden er lav, kan det tage lang tid at opløse et teststof, og henstandstiden øges til mindst 24 timer. Hvis teststoffet stadig ikke er opløst efter 24 timer, øges henstandstiden yderligere (op til 96 timer), eller der foretages yderligere fortynding, så det kan afgøres, om kolonne-eluerings- eller kolbe-metoden skal anvendes.

Tabel 1

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

Kolonne-eluerings-metoden

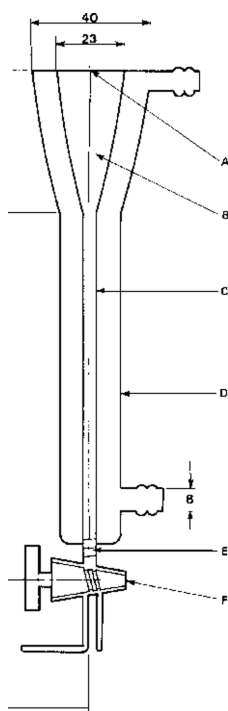
Princip

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

Apparatur

10. Apparatet består af en mikrokolonne (figur 1), som holdes ved konstant temperatur. Den er forbundet til en recirkulationspumpe (figur 2) eller en niveaubeholder (figur 3). Mikrokolonnen indeholder et inert bæremateriale, som holdes på plads af en lille prop af glasuld, der også fungerer som filter for partikler. Mulige materialer, der kan anvendes som bæremateriale, er glaskugler, diatoméjord eller andet inert materiale.
11. Mikrokolonnen i figur 1 kan anvendes til konfigurationen med recirkulationspumpe. Den har et headspace, der sikrer plads til fem bed-rumfang (som kasseres ved begyndelsen af testen) og rumfanget af fem prøver (som udtages til analyse under testen). Alternativt kan størrelsen reduceres, hvis vand kan tilsættes systemet under testen som erstatning for de første fem bed-rumfang, der fjernes med urenheder. Kolonnen tilsluttes med slange fremstillet af et inert materiale til recirkulationspumpen, som kan levere ca. 25 ml/h. Recirkulationspumpen kan f.eks. være en slangepumpe eller en membranpumpe. Det skal omhyggeligt sikres, at der ikke sker kontaminering af og/eller adsorption på slangematerialet.
12. Et system med niveaubeholder er vist skematisk i figur 3. I dette system er mikrokolonnen udstyret med en envejsstophane. Tilslutningen til niveaubeholderen består af en glasslibforbindelse og slange fremstillet af et inert materiale. Flowhastigheden fra niveaubeholderen bør være ca. 25 ml/h.

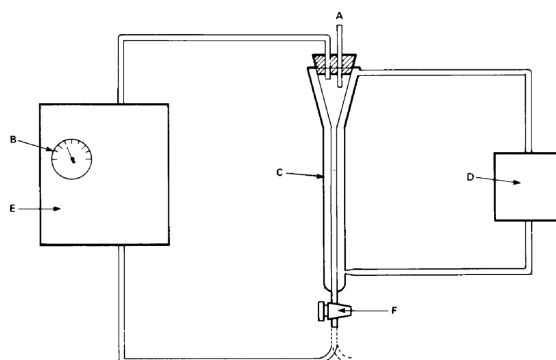
Figur 1



Mål i mm

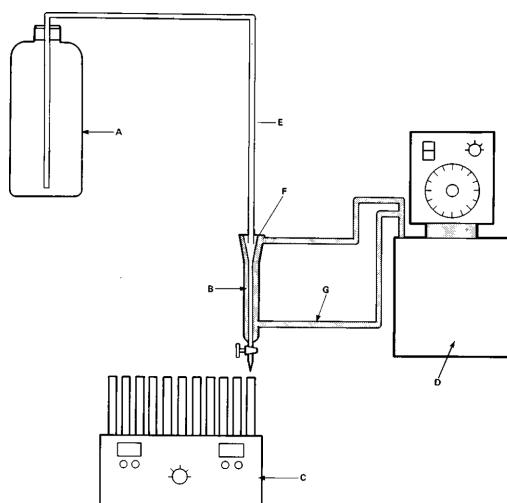
- A. Forbindelse til glasslib
B. Headspace
C. Indvendig: 5
D. Udvendig: 19
E. Glasuldsprop
F. Stophane

Figur 2



- A. Ligevægt til atmosfæren
- B. Flowmeter
- C. Mikrokolonne
- D. Termostatstyret cirkulationspumpe
- E. Recirkulationspumpe
- F. Tovejshane til prøveudtagning

Figur 3



- A. Niveaubeholder (f.eks. 2,5 l standflaske)
- B. Kolonne
- C. Fraktionssamler
- D. Termostat
- E. Teflonslange
- F. Glasslibforbindelse
- G. Vandslange (mellem termostat og kolonne, indre diameter: ca. 8 mm)

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

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

Fremgangsmåde baseret på recirkulationspumpe

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

Fremgangsmåde baseret på niveaubeholder

16. Successive fraktioner af eluatet opsamles og analyseres ved hjælp af den valgte metode. Fraktioner fra det midterste elueringsområde, hvor koncentrationerne er konstante inden for $\pm 30\%$ i mindst fem på hinanden følgende prøver, anvendes til at bestemme opløseligheden.
17. Dobbeltdestilleret vand er den foretrukne eluent. Deioniseret vand med en modstand over 10 megohm/cm og et samlet indhold af organisk kulstof under 0,01 % kan også anvendes.
18. Ved begge fremgangsmåder udføres endnu et forsøg med halvt så høj flowhastighed som det første. Hvis resultaterne fra de to forsøg stemmer overens, er testen tilfredsstillende. Hvis den målte opløselighed er højere ved den lavere flowhastighed, skal halveringen af flowhastigheden fortsættes, indtil to på hinanden følgende forsøg giver samme opløselighed.
19. Ved begge fremgangsmetoder kontrolleres fraktionerne for tilstedeværelse af kolloidt materiale ved hjælp af Tyndall-effekten. Tilstedeværelse af partikler gør testen værdiløs, og den bør gentages efter forbedring af kolonnens filtreringsfunktion.
20. pH i alle prøver måles, helst ved hjælp af særligt indikatorpapir.

Kolbe-metoden

Princip

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

Apparatur

22. Der er behov for følgende materialer:

- normalt laboratorieglasudstyr og -instrumentering
- udstyr til rystning/omrøring af opløsninger ved kontrolleret konstant temperatur
- eventuelt en centrifuge (helst termostateret) til emulsioner og
- analyseudstyr.

Fremgangsmåde

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

ikke adskiller sig med mere end 15 %, er testen tilfredsstillende. Hvis resultaterne fra beholder 1, 2 og 3 viser en stigende tendens, gentages hele testen med længere tider til opnåelse af ligevægt.

24. Testen kan også udføres uden forudgående henstand ved 30 °C. Der opnås et skøn over, hvor hurtigt mætnings-ligevægten indstiller sig, ved udtagning af prøver, indtil omrøringstiden ikke længere indvirker på de målte koncentrationer.
25. pH i alle prøver måles, helst ved hjælp af særligt indikatorpapir.

Analytiske bestemmelser

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

DATA OG RAPPORTERING

Data

Kolonne-eluerings-metoden

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

Kolbe-metoden

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

Testrapport

Kolonne-eluerings-metoden

29. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

- resultaterne af den foreløbige test
- kemisk identitet og kemiske urenheder (eventuelle indledende rensningstrin)
- koncentration, flowhastighed og pH for hver enkelt prøve
- middelværdi og standardafvigelse for mindst fem prøver fra mætningsplateauet fra hvert forsøg
- gennemsnittet af to successive, acceptable forsøg
- vandtemperaturen under mætningsprocessen
- analysemetoden
- arten af det anvendte bæremateriale
- afsætning på bærematerialet
- anvendt opløsningsmiddel
- tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen
- alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og teststoffets fysiske tilstandsform.

Kolbe-metoden

30. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

- resultaterne af den foreløbige test
- kemisk identitet og kemiske urenheder (eventuelle indledende rensningstrin)

- de enkelte analyseresultater og gennemsnittet, når der er bestemt mere end én værdi for hver kolbe
- pH af hver enkelt prøve
- gennemsnittet af værdierne for de forskellige kolber, der stemte overens
- testtemperaturen
- analysemetoden
- tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen
- alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og teststoffets fysiske tilstandsform.

LITTERATUR:

- (1) Bilag til Kommissionens direktiv 92/69/EØF af 31. juli 1992 om syttende tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer, EFT L 383 A af 29.12.1992, s. 54.
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use -Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.
- (3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.«

2) Kapitel A.23 tilføjes:

»A.23. FORDELINGSKOEFFICIENT (1-OCTANOL/VAND): SLOW-STIRRING-METODEN

INDLEDNING

1. Denne metode svarer til OECD Test Guideline (TG) 123 (2006). 1-Octanol/vand-fordelingskoefficienten (P_{OW}) er for P_{OW} -værdier svarende til $\log P_{OW}$ på indtil 8,2 blevet bestemt nøjagtigt med slow-stirring-metoden (1). Metoden er derfor velegnet til direkte eksperimentel bestemmelse af P_{OW} for stærkt hydrofobe stoffer.
2. Andre metoder, der beskriver fremgangsmåden til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten (P_{OW}), er »shake-flask«-metoden (2) og bestemmelse af P_{OW} ud fra retentionsmønsteret ved omvendt-fase HPLC (3). »Shake-flask«-metoden er tilbøjelig til at give artefakter på grund af overførsel af mikrodråber af octanol til den vandige fase. For stigende P_{OW} vil tilstedeværelse af sådanne dråber i den vandige fase medføre stadig større overvurdering af teststoffets koncentration i vandet. Metoden kan derfor kun anvendes på stoffer med $\log P_{OW} < 4$. I den anden metode anvendes pålidelige, direkte bestemte P_{OW} -værdier til kalibrering af sammenhængen mellem HPLC-retentionsmønsteret og de målte P_{OW} -værdier. Der er desuden udarbejdet et udkast til en OECD-guideline til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienterne for ioniserbare stoffer (4), men den bør ikke anvendes.
3. Denne metode er udviklet i Nederlandene. Præcisionen af de beskrevne metoder er valideret og optimeret i en ringtest med deltagelse af 15 laboratorier (5).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Signifikans og anvendelse

4. For inerte organiske stoffer er der konstateret en meget signifikant sammenhæng mellem stoffernes 1-octanol/vand-fordelingskoefficient (P_{OW}) og bioakkumuleringen i fisk. Desuden er P_{OW} påvist at være korreleret såvel med toksicitet over for fisk som med deres sorption af kemikalier til faste stoffer, som f.eks. jord og sedimenter. En omfattende gennemgang af disse sammenhænge er givet i reference (6).

5. En lang række forskellige sammenhænge er fastlagt mellem 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten og andre miljøtoksikologisk og miljøkemisk relevante stofegenskaber. I konsekvens heraf er 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten blevet en nøgleparameter såvel ved vurdering af kemikaliers miljøfarlighed som ved forudsigelse af deres skæbne i miljøet.

Anvendelsesområde

6. Slow-stirring-metoden antages at nedsætte dannelsen af mikrodråber af 1-octanol i vandfasen. Derved undgås den overvurdering af teststofkoncentrationen i den vandige fase, der skyldes teststofmolekyler knyttet til sådanne dråber. Slow-stirring-metoden er derfor særlig velegnet til bestemmelse af P_{OW} for stoffer med en forventet log P_{OW} -værdi på 5 eller derover, hvor shake-flask-metoden (2) er tilbøjelig til at give fejlagtige resultater.

DEFINITIONER OG ENHEDER

7. Et stofs fordelingskoefficient mellem vand og et lipofilt opløsningsmiddel (1-octanol) karakteriserer kemikaliet ligevægtsfordeling mellem de to faser. Fordelingskoefficienten mellem vand og 1-octanol (P_{OW}) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne af teststoffet i 1-octanol mættet med vand (C_O) og i vand mættet med 1-octanol (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Den er et koncentrationsforhold og er derfor dimensionsløs. Den angives oftest ved sin titalslogaritme ($\log P_{OW}$). P_{OW} er temperaturafhængig, og rapporterede data skal derfor omfatte måletemperaturen.

METODENS PRINCIP

8. Til bestemmelse af fordelingskoefficienten bliver vand, 1-octanol og teststof bragt i ligevægt med hinanden ved konstant temperatur. Derefter bestemmes teststoffets koncentration i de to faser.
9. Den her foreslåede slow-stirring-metode mindsker de eksperimentelle vanskeligheder, der er forbundet med dannelse af mikrodråber, når shake-flask-metoden benyttes. I slow-stirring-metoden bliver vand, 1-octanol og teststof bragt i ligevægt med hinanden i en termostattyret reaktionsbeholder med omrører. Transporten af stoffer mellem faserne fremskyndes ved omrøring. Ved omrøringen opstår der en vis turbulens, der øger stoftransporten mellem 1-octanol og vand, uden at der dannes mikrodråber (1).

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

10. Da tilstedeværelse af andre stoffer end teststoffet kan tænkes at have indflydelse på teststoffets aktivitetskoefficient, skal teststoffet afprøves i ren form. Den rene stoffes kvalitet af teststoffet til bestemmelsen af fordelingen 1-octanol/vand skal anvendes.
11. Denne metode finder anvendelse på rene stoffer, der ikke dissocierer eller associerer, og som ikke udviser nævneværdig overfladeaktivitet. Den kan anvendes til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten for sådanne stoffer og for blandinger. Når metoden anvendes på blandinger, afhænger de målte fordelingsforhold 1-octanol/vand dels af den testede blandingens kemiske sammensætning, dels af sammensætningen af den elektrolytblanding, der anvendes som vandig fase. Forudsat der træffes supplerende foranstaltninger, kan metoden også anvendes på stoffer, der dissocierer eller associerer (afsnit 12).
12. Som følge af de mange forskellige ligevægte, der optræder ved fordelingen mellem 1-octanol/vand af dissocierende forbindelser som organiske syrer og phenoler, organiske baser og metalorganiske forbindelser, er fordelingsforholdet i 1-octanol/vand en betinget konstant, der afhænger stærkt af elektrolytsammensætningen (7) (8). Bestemmelse af fordelingsforholdet i 1-octanol/vand kræver derfor styring og rapportering af pH og elektrolytsammensætning i testen. Vurdering af sådanne fordelingsforhold kræver ekspertviden. Ud fra størrelsen af dissociationskonstanterne må der vælges passende pH-værdier, således at der bestemmes et fordelingsforhold for hver ioniseringsstilstand. Til testning af metalorganiske forbindelser skal de anvendte buffere være ikke-komplekسدannende (8). På grundlag af kendskabet til vandige opløsningers kemi (komplekسدannelseskonstanter, dissociationskonstanter) må testbetingelserne vælges, så at det er muligt at fastlægge, i hvilke former teststoffet optræder i den vandige fase. Ionstyrken skal holdes identisk i alle test ved anvendelse af en baggrundselektrolyt.
13. Teststoffer med lav vandopløselighed eller høj P_{OW} kan volde vanskeligheder, fordi koncentrationen i vandfasen bliver meget lav og derfor vanskeligt kan bestemmes nøjagtigt. Det beskrives i metoden, hvordan dette problem gribes an.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

14. Kemiske reagenser skal være af analytisk kvalitet eller bedre. Det anbefales, at der enten anvendes umærket teststof med kendt kemisk sammensætning og helst mindst 99 % renhed eller radioaktivt mærket teststof med kendt kemisk sammensætning og radiokemisk renhed. Anvendes der radioaktive tracerstoffer med kort halveringstid, skal der korrigeres for henfald. Hvis der anvendes radioaktivt mærket teststof, skal analysemetoden være specifik for det pågældende kemiske stof for at sikre, at den målte radioaktivitet hænger direkte sammen med teststoffet.
15. Log P_{OW} kan enten bestemmes ved hjælp af gængs software til bestemmelse af log P_{OW} eller ud fra forholdet mellem opløselighederne i de to opløsningsmidler.
16. Før man udfører en test til bestemmelse af P_{OW} med slow-stirring-metoden, skal der foreligge følgende oplysninger om teststoffet:
 - a) strukturformel
 - b) egnede analysemetoder til bestemmelse af stoffets koncentration i vand og 1-octanol
 - c) dissociationskonstant(er) for ioniserbare stoffer (OECD Guideline 112 (9))
 - d) vandopløselighed (10)
 - e) abiotisk hydrolyse (11)
 - f) umiddelbar bionedbrydelighed (12)
 - g) damptryk (13).

BESKRIVELSE AF METODEN

Udstyr og apparatur

17. Der kræves sædvanligt laboratorieudstyr, herunder specielt følgende:
 - magnetomrørere og teflonbelagte magneter til omrøring af vandfasen
 - egnet analyseudstyr til bestemmelse af teststoffets koncentration i det forventede koncentrationsområde
 - omrørerbeholder med bundhane. Afhængigt af den skønnede P_{OW} -værdi og detektionsgrænsen (LOD) for teststoffet må det overvejes at anvende en reaktionsbeholder med kapacitet på mere end én liter, men med samme geometri, for at der kan udtages et tilstrækkeligt volumen vand til kemisk ekstraktion og analyse. Derved bliver koncentrationerne i det vandige ekstrakt højere, og den analytiske bestemmelse dermed mere pålidelig. En tabel med anslåede værdier af det minimale nødvendige volumen, detektionsgrænsen for teststoffet, dets anslåede log P_{OW} og dets vandopløselighed er givet i tillæg 1. Tabellen er baseret på sammenhængen mellem log P_{OW} og forholdet mellem opløseligheden i octanol og vand som angivet af Pinsuwan et al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

hvor:

$$SR = S_{oct}/S_w \text{ (i molaritet)}$$

og på den af Lyman (15) angivne relation til forudsigelse af vandopløselighed. En vandopløselighed, der er beregnet med ligningen i tillæg 1, må anses for et foreløbigt skøn. Det bemærkes, at det står brugeren frit at foretage en beregning af vandopløseligheden ved hjælp af enhver relation, der måtte anses for bedre til at beskrive sammenhængen mellem hydrofobicitet og opløselighed. For faste stoffer anbefales det f.eks. at lade smeltepunktet indgå i skønnet over opløseligheden. Hvis en modificeret ligning anvendes, må det efterprøves, at ligningen til beregning af opløseligheden i octanol stadig kan anvendes. Tillæg 2 indeholder en skematisk tegning af en omrørerbeholder med glaskappe og et volumen på ca. en liter. Beholderen i tillæg 2 har vist sig at have hensigtsmæssige proportioner, som bør bibeholdes, hvis der anvendes udstyr af anden størrelse

- en anordning til at fastholde en konstant temperatur er ubetinget nødvendig under slow-stirring-testen.

18. Beholderen skal være udført i inert materiale, så der kan ses bort fra adsorption til beholderens overflade.

Fremstilling af testopløsningerne

19. Til bestemmelsen af P_{OW} skal der anvendes 1-octanol af reneste handelskvalitet (over 99 %). Rensning af den anvendte 1-octanol ved ekstraktion med syre, base og vand og efterfølgende tørring anbefales. Derudover kan 1-octanol renses ved destillation. Til fremstilling af standardopløsningerne af teststofferne skal der bruges rensed 1-octanol. Vandet, der benyttes til bestemmelse af P_{OW} , skal enten være destilleret i glas eller kvarts, hidrøre fra et rensningssystem eller være af HPLC-kvalitet. Destilleret vand skal filtreres gennem et 0,22 μm filter, og der skal indgå blindprøver for at kontrollere, at der ikke er urenheder, der kan gribe forstyrrende ind i bestemmelsen af teststoffet i de koncentrerede ekstrakter. Hvis der anvendes et glasfiberfilter, skal det renses ved opvarmning til 400 °C i mindst tre timer.
20. Inden testen mættes de to faser gensidigt ved ækvilibrering i en tilstrækkelig stor beholder. Dette opnås ved langsom omrøring (slow-stirring) af tofasesystemet i to døgn.
21. Der udtages en passende mængde teststof, som opløses i 1-octanol (mættet med vand). Fordelingskoefficienten 1-octanol/vand bestemmes i fortyndede opløsninger i 1-octanol og vand. Koncentrationen af teststoffet bør derfor ikke være over 70 % af opløseligheden, og ikke over 0,1 M i nogen af faserne (1). De anvendte 1-octanol-opløsninger skal være fri for opslæmmede faste partikler af teststof.
22. Der udtages en passende mængde teststof, som opløses i 1-octanol (mættet med vand). Hvis den anslåede værdi af P_{OW} er over fem, skal det sikres, at de i testen anvendte 1-octanol-opløsninger er fri for opslæmmede partikler af teststoffet. Til dette formål benyttes følgende fremgangsmåde til kemikalier med en anslået log P_{OW} -værdi > 5:

- Teststoffet opløses i 1-octanol (mættet med vand).
- Opløsningen henstår så længe, at opslæmmede partikler når at bundfælde sig. Mens bundfældelsen står på, overvåges koncentrationen af teststoffet.
- Når de målte koncentrationer i 1-octanol-opløsningen er blevet stabile, fortyndes stamopløsningen med et passende volumen 1-octanol.
- Koncentrationen af den fortyndede stamopløsning måles. Hvis den målte koncentration er i overensstemmelse med den foretagne fortynding, kan den fortyndede stamopløsning anvendes til slow-stirring-testen.

Ekstraktion og analyse af prøver

23. Til assay af teststoffet skal der anvendes en valideret analysemetode. De for analysen ansvarlige skal dokumentere, at koncentrationerne både i den vandmættede 1-octanol-fase og i den 1-octanol-mættede vandfase er over kvantificeringsgrænsen for den anvendte analysemetode gennem hele testen. Når det er nødvendigt at bruge ekstraktion, skal genfindingen af teststoffet ved analysen af vandfasen og 1-octanol-fasen bestemmes inden testen. Analysesignalet skal korrigeres for blindværdi, og det skal sikres, at der ikke kan overføres analysand fra én prøve til en anden.
24. På grund af de ret lave koncentrationer i vandfasen af et hydrofobt teststof vil det antagelig være nødvendigt at ekstrahere vandfasen med et organisk opløsningsmiddel og forkoncentrere ekstrakten inden analyse. Af samme grund er det nødvendigt at reducere et eventuelt indhold i blindprøverne. Det kræver, at der anvendes opløsningsmidler af høj renhed, fortrinsvis opløsningsmidler til reststofanalyse. Derudover vil omhyggelig rensning af det anvendte glasapparat (f.eks. vask med opløsningsmiddel eller opvarmning til høj temperatur) medvirke til at undgå krydskontaminering.
25. Et skøn over log P_{OW} kan fås af et beregningsprogram eller ved en ekspertvurdering. Hvis værdien er over seks, skal blindkorrektioner og overførsel af analysand nøje overvåges. Hvis den anslåede værdi af log P_{OW} er over seks, er det desuden obligatorisk at bruge en surrogatstandard til korrektion for genfinding, for at der kan opnås en høj forkoncentrationsfaktor. Til tilnærmet beregning af en log P_{OW} -værdi findes der på markedet forskellige softwareprogrammer⁽¹⁾, f.eks. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) og ACD log P (19). Metoderne til tilnærmet beregning er beskrevet i referencerne (20-22).

⁽¹⁾ Denne oplysning er kun til orientering for brugerne. Andre tilsvarende softwareprogrammer kan anvendes, hvis det kan dokumenteres, at de giver de samme resultater.

26. Kvantificeringsgrænserne (LOQ) for bestemmelse af teststoffet i 1-octanol og vand fastlægges med anerkendte metoder. Som tommelfingerregel kan metodens kvantificeringsgrænse sættes til den koncentration i vand eller 1-octanol, der frembringer et signal/støjforhold på 10. Der skal vælges en passende metode til ekstraktion og forkoncentrering, og genfindingsværdierne ved analysen skal ligeledes angives. Forkoncentreringsfaktoren skal vælges, så der opnås et signal af den nødvendige størrelse ved den analytiske bestemmelse.
27. På grundlag af analysemetodens parametre og de forventede koncentrationer bestemmes den omtrentlige prøvemængde, der er nødvendig for at få en nøjagtig bestemmelse af teststofkoncentrationen. Det bør undgås at tage vandprøver, der er for små til at give et tilstrækkeligt analysesignal. Ligeledes bør det undgås at tage vandprøver, der er alt for store, da der i så fald kan være for lidt vand tilbage til det nødvendige mindste antal analyser ($n = 5$). I tillæg 1 er angivet det minimale prøvolumen som funktion af beholdervolumen, detektionsgrænse for teststoffet og opløselighed af teststoffet.
28. Kvantificering af teststoffet foretages ved sammenholdelse med kalibreringskurverne for den pågældende forbindelse. Koncentrationerne i de analyserede prøver skal ligge i intervallet mellem den højeste og den laveste koncentration af standard.
29. For teststoffer med en anslået $\log P_{OW}$ -værdi højere end seks skal der før ekstraktion tilsættes en surrogat-standard til vandet for at registrere tab under ekstraktion og forkoncentrering af vandprøverne. For at der kan korrigeres nøjagtigt for genfindingsgraden, skal surrogaternes egenskaber nøje svare til teststoffets eller være identiske dermed. Til det formål bør der fortrinsvis anvendes (stabile) isotopmærkede analoger af de undersøgte stoffer (f.eks. deuterium- eller ^{13}C -mærkede). Hvis det ikke er muligt at anvende stabile, isotopmærkede analoger, f.eks. ^{13}C eller ^2H , skal det ud fra pålidelige litteraturdata godtgøres, at surrogaternes fysisk-kemiske egenskaber ligger meget tæt på teststoffets. Under væske-væske ekstraktion af vandfasen kan der dannes emulsioner. Emulsionsdannelsen kan begrænses ved tilsætning af salt og ved at lade emulsionen sætte sig natten over. De anvendte metoder til ekstraktion og forkoncentrering af prøverne skal beskrives.
30. Prøverne af 1-octanolfasen kan om nødvendigt fortyndes med et passende opløsningsmiddel inden analyse. Desuden anbefales brug af surrogatstandards til korrektion for genfindingsgraden for stoffer, som har udvist stor variation ved genfindingsforsøgene (relativ standardafvigelse $> 10\%$).
31. Analysemetoden skal beskrives i detaljer. Herunder angives ekstraktionsmetode, forkoncentrerings- og fortynningsfaktor, instrumentparametre, kalibreringsrutine, kalibreringsområde, analytisk genfindning af teststoffet i vand, tilsætning af surrogatstandards til korrektion for genfindingsgrad, blindværdier, detektionsgrænser og kvantificeringsgrænser.

Testens udførelse

Optimale volumenforhold 1-octanol/vand

32. Ved valg af volumen af vand og volumen af 1-octanol skal følgende forhold tages i betragtning: kvantificeringsgrænsen i 1-octanol og vand, de forkoncentreringsfaktorer, der anvendes på vandprøverne, de udtagne prøvolumener af 1-octanol og vand samt de forventede koncentrationer. Af hensyn til forsøgets udførelse skal volumen af 1-octanol i slow-stirring-systemet vælges, så 1-octanol-laget er tilstrækkelig tykt ($> 0,5\text{ cm}$) til, at der kan tages prøver af 1-octanol-fasen uden at forstyrre denne.
33. Til bestemmelse af forbindelser med $\log P_{OW}$ på 4,5 og derover anvendes typisk et forhold mellem faserne på 20-50 ml 1-octanol og 950-980 ml vand i en beholder på én liter.

Testbetingelser

34. Under testen skal reaktionsbeholderen være termostateret med en temperaturvariation på under 1°C . Assayet skal udføres ved 25°C .
35. Testsystemet skal være beskyttet mod dagslys, enten ved brug af mørkekammer eller ved indpakning af reaktionsbeholderen i alufolie.
36. Testen skal (så vidt muligt) udføres i støvfrit miljø.
37. Systemet 1-octanol-vand omrøres, til det har nået ligevægt. Der foretages et indledende pilotforsøg, hvor ækvilibreringsperioden bestemmes ved slow-stirring metoden med regelmæssig prøveudtagning af vand og 1-octanol. Der skal gå mindst fem timer mellem prøveudtagningerne.
38. Hver P_{OW} -bestemmelse skal ske ved hjælp af mindst tre uafhængige slow-stirring-test.

Bestemmelse af ækvilibreringstiden

39. Ligevægt antages at være nået, når afbildning af koncentrationsforholdet i 1-octanol/vand mod tiden i fire tidspunkter resulterer i en regressionslinje med en hældning, der ikke er signifikant forskellig fra nul ved et p-niveau på 0,05. Der skal ækvilibreres i mindst ét døgn, før prøvetagningen påbegyndes. For stoffer med en anslået $\log P_{OW}$ -værdi på mindre end fem kan prøveudtagning som tommelfingerregel finde sted på dag to og tre. For mere hydrofobe forbindelser kan det være nødvendigt med længere ækvilibreringstid. For en forbindelse med en $\log P_{OW}$ på 8,23 (decachlorbiphenyl) var 144 timer tilstrækkeligt til ækvilibrering. Opnåelse af ligevægt vurderes ved gentagne prøvetagninger fra samme forsøgsbeholder.

Start af testen

40. Ved testens start fyldes reaktionsbeholderen med vand mættet med 1-octanol. Det forventes, at blandingen antager den termostaterede temperatur.
41. Den ønskede mængde teststof (opløst i det nødvendige volumen 1-octanol mættet med vand) tilsættes forsigtigt til reaktionsbeholderen. Dette er et afgørende trin i testen, da det er nødvendigt at undgå turbulent opblanding af de to faser. Til dette formål kan 1-octanol-fasen langsomt afpipetteres op mod væggen af testbeholderen, tæt på vandoverfladen. Den vil derved flyde ned ad glasvæggen og danne en film på oversiden af vandfasen. Dekanter aldrig 1-octanol direkte i kolben; undgå, at der drypper 1-octanol direkte ned i vandet.
42. Efter start af omrøringen skal omrøringshastigheden øges langsomt. Hvis omrørermotoren ikke kan indstilles passende, må brug af en transformator overvejes. Omrøringshastigheden skal indstilles, så der dannes en hvirvel med en dybde på 0,5 til højst 2,5 cm i grænsefladen mellem vand og 1-octanol. Hvis hvirvlens dybde er over 2,5 cm, skal omrøringshastigheden mindskes, da der ellers kan dannes mikrodåber af 1-octanol i vandfasen, hvilket vil medføre overvurdering af teststofkoncentrationen i vandet. Den anbefalede maksimale omrøringshastighed svarende til 2,5 cm er baseret på resultaterne af ring-testen (5). Den repræsenterer et kompromis mellem hurtigst mulig ækvilibrering og begrænsning af dannelsen af mikrodåber af 1-octanol.

Prøveudtagning og behandling af prøverne

43. Ved prøvetagning skal omrøreren være afbrudt, og bevægelsen i væskerne skal være ophørt. Når prøverne er taget, startes omrøreren igen langsomt som ovenfor beskrevet, hvorefter hastigheden øges gradvis.
44. Prøver af vandfasen tages fra en hane i bunden af reaktionsbeholderen. Dødvolumenet af vand i hannerne skal altid kasseres (i den i tillæg 2 viste beholder er det ca. 5 ml). Vandet i hannerne bliver ikke omrørt og er derfor ikke i ligevægt med hovedmængden. Notér volumen af vandprøverne, og sørg for, at indholdet af teststof i det kasserede vand medregnes ved opstilling af massebalancen. Fordampningstab skal minimeres ved at lade vandet løbe roligt ned i skilletragten, så laget af vand/1-octanol ikke forstyrres.
45. Prøver af 1-octanol fås ved at udtage en lille aliquot (ca. 100 µl) fra 1-octanol-laget med en 100 mikroliter sprøjte udført helt i glas-metal. Der skal udvises forsigtighed for at ikke at forstyrre grænsefladen. Volumen af den udtagne væskeprøve noteres. En lille aliquot er tilstrækkeligt, da prøven af 1-octanol bliver fortyndet.
46. Overflødige overførselstrin for prøverne bør undgås. Der benyttes derfor vejning til bestemmelse af prøvevolumenet. For vandprøvers vedkommende kan dette ske ved opsamling af vandprøven i en skilletragt, der i forvejen indeholder det nødvendige volumen opløsningsmiddel.

DATA OG RAPPORTERING

47. I denne metode bestemmes P_{OW} ved tre slow-stirring-test (tre forsøgsenheder) med det undersøgte stof under identiske betingelser. Den regressionslinje, der anvendes til påvisning af ligevægt, skal være baseret på resultaterne af mindst fire på hinanden følgende bestemmelser af C_O/C_W . Derved kan variansen beregnes som et mål for usikkerheden på det beregnede gennemsnit for hver forsøgsenhed.
48. P_{OW} kan karakteriseres ved variansen af de data, der opnås for hver forsøgsenhed. På grundlag heraf beregnes P_{OW} som det vægtede gennemsnit af resultaterne fra de enkelte forsøgsenheder. Ved beregningen vægtes resultaterne for forsøgsenhederne med deres reciprokke varians. Derved opnås, at data med stor variation (udtrykt ved variansen) og dermed mindre pålidelighed får mindre indflydelse på resultatet end data med lille varians.

49. Analogt hermed beregnes den vægtede standardafvigelse. Denne karakteriserer repeterbarheden af målingen af P_{OW} . Hvis den vægtede standardafvigelse er lav, har P_{OW} -bestemmelsen en høj grad af repeterbarhed inden for samme laboratorium. Den formelle statistiske behandling af data er beskrevet nedenfor.

Behandling af resultater

Påvisning af opnåelse af ligevægt

50. For hvert prøvetagningstidspunkt beregnes logaritmen til forholdet mellem teststoffets koncentration i 1-octanol og vand ($\log(C_O/C_W)$). Opnåelse af kemisk ligevægt påvises ved afbildning af dette forhold mod tiden. Når denne kurve går over i et plateau bestående af mindst fire på hinanden følgende tidspunkter, er ligevægt nået, og stoffet er reelt opløst i 1-octanol. Hvis ikke, må testen fortsættes, indtil fire på hinanden følgende tidspunkter giver en hældning, der ikke er signifikant forskellig fra 0 ved et p-niveau på 0,05 som tegn på, at C_O/C_W er uafhængig af tiden.

Beregning af $\log P_{OW}$

51. $\log P_{OW}$ for den pågældende forsøgsenhed beregnes som det vægtede gennemsnit af $\log C_O/C_W$ for den del af kurven over $\log C_O/C_W$ som funktion af tiden, hvor ligevægt er påvist at være indtrådt. Det vægtede gennemsnit beregnes ved at vægte data med den reciprokke varians, så indflydelsen af data på slutresultatet bliver omvendt proportional med usikkerheden på data.

Gennemsnitlig $\log P_{OW}$

52. Gennemsnitsværdien af $\log P_{OW}$ for forskellige forsøgsenheder beregnes som gennemsnittet af resultaterne for de enkelte forsøgsenheder, vægtet med den pågældende varians.

Beregningen foretages således:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

hvor:

$\log P_{OW,i}$ = værdien af $\log P_{OW}$ for den individuelle forsøgsenhed i

$\log P_{OW,Av}$ = det vægtede gennemsnit af de enkelte bestemmelser af $\log P_{OW}$

w_i = den statistiske vægt, der tildeles værdien af $\log P_{OW}$ for den individuelle forsøgsenhed i

Den reciprokke varians af $\log P_{OW,i}$ anvendes som w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$)

53. Fejlen på gennemsnittet af $\log P_{OW}$ beregnes som repeterbarheden af $\log C_O/C_W$, bestemt i ligevægtsfasen i de enkelte forsøgsenheder. Den udtrykkes som den vægtede standardafvigelse på $\log P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$), der igen er et mål for fejlen på $\log P_{OW,Av}$. Den vægtede standardafvigelse kan beregnes af den vægtede varians $\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$ på følgende måde:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

Symbolen n er antal forsøgsenheder.

Testrapport

54. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

- generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (som viser placeringen af det mærkede atom, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber (se afsnit 17)
- renhed (urenheder) af teststoffet
- for mærkede kemikalier, nominel renhed af radioaktiv mærkning samt molær aktivitet (hvis relevant)
- den foreløbige anslåede værdi af $\log P_{OW}$ og den metode, hvormed denne værdi er beregnet.

Testbetingelser:

- dato for testen udførelse
- testtemperaturen
- volumen 1-octanol og vand ved testens start
- volumen af de udtagne prøver af 1-octanol og vand
- volumen 1-octanol og vand, der er tilbage i testbeholderne
- beskrivelse af forsøgsbeholdere og omrøringsforhold (den geometriske form af omrørmagneten og af forsøgsbeholderen, hvirvelhøjden i mm samt omrøringshastigheden, når denne kendes)
- de analysemetoder, der er anvendt til bestemmelse af teststoffet, og metodernes kvantificeringsgrænse
- prøvetagningstidspunkter
- pH af den vandige fase og, når pH justeres for ioniserbare molekyler, de anvendte buffere
- antal gentagelser.

Resultater:

- repeterbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder
- de fundne koncentrationer af teststoffet i 1-octanol og vand som funktion af tiden
- opstilling af en massebalance
- temperatur og standardafvigelse, eller temperaturområde under testen
- regression af koncentrationsforholdet på tiden
- gennemsnitlig $\log P_{ow,Av}$ -værdi og standardfejlen herpå
- diskussion og fortolkning af resultaterne
- eksempler på rådata for repræsentative analyser (alle rådata skal opbevares i henhold til GLP-normer), herunder genfindingsværdier for surrogater, antal niveauer anvendt ved kalibrering (sammen med kriterierne for korrelationskoefficienten for kalibreringskurven) og resultaterne af QA/QC
- når den foreligger: valideringsrapport for assaymetoden (angives under referencer).

LITTERATUR:

- (1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the »slow-stirring« method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.
- (2) Kapitel A.8 i dette bilag, Fordelingskoefficient.
- (3) Kapitel A.8 i dette bilag, Fordelingskoefficient.
- (4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.
- (5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- (6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

-
- (7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, NY.
- (8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.
- (9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.
- (10) Kapitel A.6 i dette bilag, Vandopløselighed.
- (11) Kapitel C.7 i dette bilag, Nedbrydning — Abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH.
- (12) Kapitel C.4 — del II til VII (Metode A til F) i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.
- (13) Kapitel A.4 i dette bilag, Damptryk.
- (14) Pinsuwan S, Li A og Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.
- (15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 til 2-52.
- (16) Leo A, Weininger D (1989). *Medchem Software Manual*. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- (17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
- (18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.
- (19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.
- (20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
- (21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.
- (22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.
-

Tillæg 1

Regneark til beregning af mindste vandvolumen, der er nødvendigt til detektion af teststoffer med forskellige log P_{OW}-værdier i vandig fase

Forudsætninger:

- Maksimumsvolumen af de enkelte aliquoter = 10 % af totalvolumenet; 5 aliquoter = 50 % af totalvolumenet.
- Teststofkoncentration = 0,7 × opløseligheden i hver fase. Ved lavere koncentration skal der bruges større volumener.
- Anvendt volumen til bestemmelse af detektionsgrænse = 100 ml.
- Log P_{OW} mod log S_W og log P_{OW} mod SR (S_{OCT}/S_W) er rimelige fremstillinger af de sammenhænge, der gælder for teststofferne.

Beregning af S_w

log P _{OW}	ligning	log S _w	S _w (mg/l)
4	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	0,496	3,133E + 00
4,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	0,035	1,084E + 00
5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	- 0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	- 0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	- 1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	- 1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	- 2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	- 2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	- 3,192	6,427E-04

Beregning af S_{oct}

log P _{OW}	ligning	S _{oct} (mg/l)
4	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E + 04
4,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E + 04
5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E + 04
5,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E + 04
6	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E + 05
6,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E + 05
7	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E + 05
7,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E + 05
8	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E + 05

Total masse af teststof (mg)	Mass _{oct} /Mass _{water}	Mass _{H2O} (mg)	Conc _{H2O} (mg/l)	Mass _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Total masse af teststof (mg)	Mass _{oct} /Mass _{water}	Mass _{H2O} (mg)	Conc _{H2O} (mg/l)	Mass _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Beregning af volumener

Nødvendigt minimumsvolumen for H₂O-fasen ved hver LOD-koncentration

log K _{ow}	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volumen anvendt til LOD (l)	0,1					

Nøgle til beregninger

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 1-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 2-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 5-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 10-liters ækvilibreringsbeholder.

Over 10 % af selv 10-liters ækvilibreringsbeholderen.

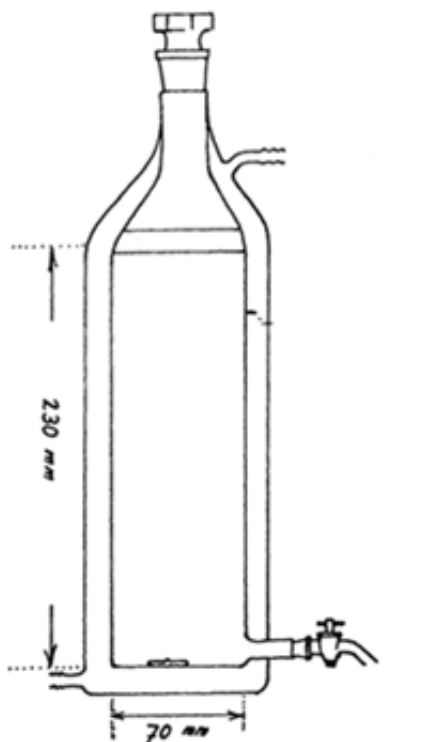
Oversigt over nødvendigt volumen som funktion af vandopløselighed og log P_{ow}

Minimumsvolumen til H₂O-fasen ved hver LOD-koncentration (ml)

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (mikrogram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
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
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volumen anvendt til LOD (l)		0,1					

Tillæg 2

Eksempel på beholder med glaskappe til slow-stirring-test til bestemmelse af P_{OW} 

3) Kapitel B.2 affattes således:

»B.2. AKUT TOKSICITET (INHALATION)**INDLEDNING**

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 403 (2009) (1). Den oprindelige Test Guideline 403 (TG 403) for akut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981. Formålet med denne reviderede testmetode B.2 (som svarer til den reviderede TG 403) er at sikre mere fleksibilitet, reducere omfanget af dyreforsøg og opfylde myndighedsbestemmelser. Den reviderede testmetode omfatter to typer forsøg: en traditionel LC_{50} -protokol og en koncentration $\times$ tid-protokol ($C \times t$). Denne testmetode er primært kendetegnet ved dens evne til at tilvejebringe en koncentrationsresponsrelation varierende fra ikke-dødelige til dødelige resultater med henblik på at få en gennemsnitlig dødelig dosis (LC_{50}), ikke-dødelig tærskelkoncentration (f.eks. LC_{01}) og hældning og dens evne til at identificere mulig kønsspecifik modtagelighed. $C \times t$ -protokollen bør anvendes, når specifikke myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør forsøg med dyr i forskellige tidsrum, f.eks. med henblik på planlægning af nødberedskab [f.eks. udledning af værdier for Acute Exposure Guideline Levels (AEGL), Emergency Response Planning Guidelines (ERPG) eller Acute Exposure Threshold Levels (AETL)] eller med henblik på fysisk planlægning.
2. Vejledning i udførelse og fortolkning af forsøgene i forbindelse med denne testmetode findes i Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39) (2).
3. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i GD 39 (2).
4. Denne testmetode muliggør karakterisering og kvantitativ risikovurdering af testkemikaliet og gør det muligt at vurdere og klassificere testkemikalierne i overensstemmelse med forordning (EF) nr. 1272/2008 (3). GD 39 (2) beskriver, hvordan den mest hensigtsmæssige metode til akut testning vælges. Hvis der kun kræves oplysninger om klassificering og mærkning, anbefales generelt kapitel B.52 i dette bilag (4) [se GD 39 (2)]. Denne testmetode B.2 er ikke specifikt beregnet til test af særlige materialer, som f.eks. tungtopløselige isometriske eller fiberholdige materialer eller fremstillede nanomaterialer.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Inden test i overensstemmelse med denne metode overvejes, bør alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet, herunder eksisterende forsøg (f.eks. kapitel B.52 i dette bilag (4)), hvis data understøtter, at der ikke udføres yderligere test, overvejes af testlaboratoriet med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Oplysninger, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige arter, stammer, køn, eksponeringsformer og testkoncentrationer, omfatter testkemikaliet identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede stoffer [se GD 39 (2)].
6. Test af ætsende og/eller irriterende testkemikalier ved koncentrationer, der forventes at forvolde stærk smerte og lidelse, bør så vidt muligt undgås. Ætsnings-/irritationsstyrken skal evalueres af eksperter ved hjælp af dokumentation, som f.eks. erfaringer fra mennesker og dyr (f.eks. fra forsøg med gentagen dosering udført ved koncentrationer, der ikke er ætsende/irriterende), eksisterende in vitro-data [f.eks. fra kapitel B.40 (5) og kapitel B.40.A (6) i dette bilag eller OECD TG 435 (7)], pH-værdier, information fra lignende stoffer eller andre relevante data med henblik på at undersøge, om yderligere test kan undgås. Når konkrete myndighedsbestemmelser gør det nødvendigt (f.eks. i forbindelse med planlægning af nødberedskab), kan denne testmetode bruges til eksponering af dyr for sådanne materialer, fordi det giver forsøgslederen eller den primære investigator mulighed for at vælge målkoncentrationerne. Målkoncentrationerne bør dog ikke have svære irriterende/ætsende virkninger, men alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i hvert enkelt tilfælde, og den valgte koncentration bør begrundes [se GD 39 (2)].

TESTENS PRINCIP

7. Denne reviderede testmetode B.2 har til formål at tilvejebringe tilstrækkelige oplysninger om den akutte toksicitet af et testkemikalie til, at det kan klassificeres, og til at tilvejebringe data om dødelighed (f.eks. LC₅₀, LC₀₁ og hældning) for et eller begge køn, hvis det er nødvendigt til de kvantitative risikovurderinger. Denne testmetode omfatter to metoder. Den første metode er en traditionel protokol, hvor grupper af dyr eksponeres for en grænsekonzentration (grænsetest) eller en serie af koncentrationer i en trinvis fremgangsmåde i en forudbestemt periode på normalt fire timer. Andre eksponeringsvarigheder kan anvendes for at opfylde konkrete myndighedsbestemmelser. Den anden metode er en C × t-protokol, hvor grupper af dyr eksponeres for en grænsekonzentration eller en serie af flere koncentrationer i flere perioder.
8. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, bør aflives humanitært og betragtes ved fortolkningen af testresultatet på samme måde som dyr, der er døde under testen. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (8).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

9. Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Den foretrukne art er rotter, og der bør gives begrundelse, hvis en anden art anvendes.

Forberedelse af dyrene

10. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På eksponeringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem 8 og 12 uger gamle, og deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn af tidligere eksponerede dyr i samme alder. Dyrene udtages på tilfældig måde og mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres. Dyrene holdes i deres bure i mindst fem dage, inden testen påbegyndes, så de tilvænnenes laboratorieforholdene. Dyrene tilvænnenes også testudstyret i en kort periode inden testen, da det vil mindske stress forårsaget af introduktionen til et nyt miljø.

Dyreopdræt og -sundhed

11. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnenes fastspændingsslang. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødigt fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænnning til fastspændingsslangene ikke

nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at test aerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

Inhalationskamre

12. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med forsøget kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i forsøgsrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

EKSPONERINGSBETINGELSER

Administration af koncentrationer

13. Eksponering gennem næsen kan være af enhver varighed på op til seks timer for rotter. Hvis mus eksponeres gennem næsen, må eksponeringstiden generelt ikke overstige fire timer. Der gives en begrundelse, hvis test af længere varighed er påkrævet [se GD 39 (2)]. Dyr, der eksponeres for aerosoler i kamre til hele kroppen, bør holdes i individuelle bure for at undgå, at de indtager testkemikaliet som følge af soignering af de andre dyr. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.
14. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliet's fysiske-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer.

Partikelstørrelsesfordeling

15. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 4 µm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (2) (9) (10). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler, fibre og hygroskopiske materialer (som udvides i luftvejenes fugtige miljø) kan overstige standarden.

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

16. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe et testkemikalie med den rigtige koncentration og partikelstørrelse i atmosfæren. Generelt foretrækkes vand. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at opnå den krævede partikelstørrelsesfordeling. Det skal dog omhyggeligt sikres, at testkemikaliet ikke dekomponerer eller ændres. Hvis mekaniske processer menes at have ændret teststoffets sammensætning (f.eks. ekstreme temperaturer som følge af friktion under formaling), bør testkemikaliet's sammensætning kontrolleres analytisk. Kontaminering af testkemikaliet skal undgås. Det er ikke nødvendigt at teste granulat, der ikke er letsmuldrrende, og som netop er formuleret, så det ikke kan inhaleres. Der bør anvendes en slidtest til at dokumentere, at der ikke frembringes respirable partikler under håndteringen af granulat. Hvis en slidtest frembringer respirable stoffer, bør der udføres en inhalationstoksicitetstest.

Kontroldyr

17. En sideløbende negativ (luft)kontrolgruppe er ikke nødvendig. Hvis et andet vehikel end vand bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe kun anvendes, hvis historiske inhalationstoksicitetsdata ikke foreligger. Hvis et toksicitetsforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration. Der er derfor ikke brug for en vehikelkontrol.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

Luftgennemstrømning i kammer

18. Luftgennemstrømningen gennem kammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Overvågningen af koncentrationen (eller stabiliteten) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske

parametre for generering af atmosfæren. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås, hvis luftgennemstrømningen gennem eksponeringssystemet ikke er tilstrækkelig til at tilvejebringe en dynamisk gennemstrømning i den kemiske testatmosfære. Der er fastlagte metodologier, der kan bruges til at påvise, at genindånding ikke finder sted under de valgte driftsbetingelser (2) (11). Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at disse standarder ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles.

Kammerets temperatur og relative fugtighed

19. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres mindst tre gange ved varigheder af op til fire timer og hver time ved kortere varigheder. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliet indvirkning på testmetoden.

Testkemikalie: nominel koncentration

20. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

21. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikallet ved dyrenes vejtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før forsøget. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikallet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode. Målkoncentrationer, nominelle koncentrationer og faktiske koncentrationer angives i forsøgsrapporten, men kun de faktiske koncentrationer bruges i de statistiske analyser til at beregne letale koncentrationer.
22. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikallet, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikallet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).
23. Eksponeringsatmosfæren holdes så konstant som muligt og overvåges kontinuerligt og/eller i intervaller afhængigt af analysemetoden. Hvis intervalbaseret prøveudtagning anvendes, bør der udtages atmosfæreprøver i kammeret mindst to gange i løbet af et forsøg med en varighed på fire timer. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan en prøve udtages over hele eksponeringsperioden. Hvis der forekommer markante udsving fra prøve til prøve, bør der anvendes flere prøver pr. eksponering for de næste testede koncentrationer. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middeldkoncentrationen med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikallet genereres, og det omfatter den tid, der kræves for at opnå t_{95} . Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (2).
24. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af formålsbestemte slutprodukter/apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer, og der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikallet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen og ikke kun for det aktive stof eller komponenten (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

25. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst to gange i løbet af hver eksponering på fire timer ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse. Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlings effektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage en eksponering. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser (se afsnit 15).

FREMGANGSMÅDE

26. To forsøgstyper er beskrevet nedenfor: en traditionel protokol og en C × t-protokol. Begge protokoller kan omfatte et forforsøg, et hovedforsøg og/eller en grænsetest (traditionel protokol) eller testning ved en grænsekoncentration (C × t). Hvis et køn vides at være mere modtagelig, kan forsøgslederen vælge at udføre disse forsøg alene ved hjælp af det mest modtagelige køn. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Inden forsøget påbegyndes, undersøges alle tilgængelige data med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Data, der er indhentet ved hjælp af kapitel B.52 i dette bilag 4, kan f.eks. overflødig gøre behovet for et forforsøg og kan også vise, om et køn er mere modtageligt [se GD 39 (2)].

TRADITIONEL PROTOKOL**Generelle betragtninger: Traditionel protokol**

27. I et traditionelt forsøg eksponeres grupper af dyr for et testkemikalie i en bestemt tidsperiode (ofte 4 timer) i et kammer til eksponering gennem næsen eller helkropseksponering. Dyr eksponeres for en grænsekoncentration (grænsetest) eller mindst tre koncentrationer i en trinvis fremgangsmåde (hovedforsøg). Et forforsøg kan udføres inden hovedforsøget, medmindre der allerede foreligger visse informationer om testkemikallet, f.eks. et tidligere udført B.52-forsøg [se GD 39 (2)].

Forforsøg: traditionel protokol

28. Et forforsøg bruges til at skønne testkemikaliet styrke, identificere kønsbetingede forskelle i modtagelighed og hjælpe med at vælge eksponeringskoncentrationer til hovedforsøget eller grænsetesten. Når koncentrationerne vælges til forforsøget, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder tilgængelige (Q)SAR-data og data vedrørende lignende kemikalier. Højst tre hanner og tre hunner bør eksponeres ved hver koncentration (3 dyr/køn kan være nødvendigt for at fastslå en kønsbetinget forskel). Et forforsøg kan omfatte én koncentration, men flere koncentrationer kan om nødvendigt testes. Et forforsøg bør ikke teste så mange dyr og koncentrationer, at det ligner et hovedforsøg. Et tidligere udført B.52-forsøg (4) kan bruges i stedet for et forforsøg [se GD 39 (2)].

Grænsetest: traditionel protokol

29. En grænsetest bruges, når testkemikallet vides eller forventes at være stort set ikke-toksisk, dvs. det fremkalder toksisk respons, der kun ligger over den fastsatte grænsekoncentration. I en grænsetest eksponeres en gruppe af tre hanner og tre hunner for testkemikallet ved en grænsekoncentration. Oplysninger om testkemikaliet toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede kemikalier, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om testkemikaliet toksicitet, eller når testkemikallet forventes at være toksisk, bør hovedforsøget udføres.
30. Valget af grænsekoncentrationer afhænger normalt af lovgivningskrav. Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l (eller den højest opnåelige koncentration) (3). Det kan være en teknisk udfordring at generere testkoncentrationer af visse testkemikalier, især som dampe og aerosoler. Ved test af aerosoler bør det primære mål være at opnå en respirabel partikelstørrelse (MMAD på 1-4 µm). For de fleste testkemikalier er det muligt ved en koncentration på 2 mg/l. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (2)]. I henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 bør test, der overstiger en grænsekoncentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden (3). Grænsekoncentrationen bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed (3), og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden grænsetesten, så det sikres, at betingelserne i kammeret for en grænsetest kan opnås.

31. Hvis der observeres mortalitet eller døende tilstand ved grænsekonzentrationen, kan resultaterne af grænsetesten bruges som et forforsøg med henblik på yderligere test ved andre koncentrationer (se hovedforsøg). Hvis et testkemikalies fysiske eller kemiske egenskaber gør det umuligt at opnå en grænsekonzentration, testes den højest opnåelige koncentration. Hvis mindre end 50 % letalitet forekommer ved den højest opnåelige koncentration, er yderligere test ikke nødvendig. Hvis grænsekonzentrationen ikke kan opnås, gives en forklaring og understøttende data i forsøgsrapporten. Hvis den højest opnåelige koncentration af en damp ikke fremkalder toksicitet, skal testkemikallet muligvis genereres som en flydende aerosol.

Hovedforsøg: traditionel protokol

32. Et hovedforsøg udføres typisk med fem hanner og fem hunner (eller 5 dyr af det mest modtagelige køn, hvis det kendes) pr. koncentrationsniveau med mindst tre koncentrationsniveauer. Der skal bruges tilstrækkelige koncentrationsniveauer til at opnå en robust statistisk analyse. Tidsintervallet mellem eksponeringsgrupperne bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsat, varighed og sværhed. Eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau udsættes, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkonzentrationen for den næste eksponeringsgruppe. Som følge af afhængigheden af avancerede teknologier er dette ikke altid praktisk muligt i inhalationsforsøg, og derfor bør eksponeringen af dyr ved det næste koncentrationsniveau baseres på tidligere erfaring og videnskabelig vurdering. GD 39 (2) bør anvendes ved test af blandinger.

KONCENTRATION $\times$ TID-PROTOKOL ($C \times T$)

Generelle betragtninger: $C \times t$ -protokol

33. Et trinvist $C \times t$ -forsøg kan overvejes som alternativ til en traditionel protokol ved vurdering af inhalationstoksicitet (12) (13) (14). Denne fremgangsmåde gør det muligt at eksponere dyr for et testkemikalie ved flere koncentrationsniveauer og i flere tidsrum. Alle test udføres i et kammer til eksponering gennem næsen (helkropskamre er ikke anvendelige i forbindelse med denne protokol). Et flowdiagram i tillæg 1 illustrerer denne protokol. En simuleringsanalyse har vist, at den traditionelle protokol og $C \times t$ -protokollen begge kan give robuste LC_{50} -værdier, men $C \times t$ -protokollen er generelt bedre til at give robuste LC_{01} - og LC_{10} -værdier (15).
34. En simuleringsanalyse har vist, at det generelt er tilstrækkeligt at anvende to dyr pr. $C \times t$ -interval (et pr. køn ved brug af begge køn eller to af det mest modtagelige køn), når der testes fire koncentrationer og fem eksponeringsvarigheder i et hovedforsøg. Under visse omstændigheder kan forsøgslederen vælge at bruge to rotter pr. køn pr. $C \times t$ -interval (15). Hvis der bruges to dyr pr. køn pr. koncentration og tidspunkt, kan det reducere bias og variabiliteten af estimaterne, øge succesraten for estimeringen og forbedre konfidensintervallet. I tilfælde af utilstrækkelig tilpasning til de data, der er brugt til estimeringen (ved brug af et dyr pr. køn eller to dyr af det mest modtagelige køn), kan en femte eksponeringskoncentration også være tilstrækkelig. Yderligere vejledning om det antal dyr og koncentrationer, der skal anvendes i et $C \times t$ -forsøg, findes i GD 39 (2).

Forforsøg: $C \times t$ -protokol

35. Et forforsøg bruges til at skønne testkemikaliet styrke og til at hjælpe med at vælge eksponeringskoncentrationer til hovedforsøget. Det kan være nødvendigt at udføre et forforsøg med op til tre dyr/køn/konzentration [se Appendix III i GD 39 (2)] for at vælge en hensigtsmæssig startkoncentration til hovedforsøget og minimere antallet af anvendte dyr. Der skal muligvis bruges tre dyr pr. køn for at fastslå en kønsbetiget forskel. Disse dyr bør eksponeres over én varighed, normalt 240 minutter. Muligheden for at skabe tilstrækkelige testatmosfærer bør vurderes i løbet af de tekniske forudgående test uden dyr. Det er generelt ikke nødvendigt at udføre et forforsøg, hvis mortalitetsdata er tilgængelige fra et B.52-forsøg (4). Når den indledende målkonzentration vælges i et B.2-forsøg, bør forsøgslederen overveje de mortalitetsmønstre, der er observeret i evt. tilgængelige B.52-forsøg (4) for begge køn og alle testede koncentrationer [se GD 39 (2)].

Startkoncentration: $C \times t$ -protokol

36. Startkoncentrationen (eksponeringssession I) (tillæg 1) er enten en grænsekonzentration eller en koncentration, som forsøgslederen har valgt ud fra forforsøget. Grupper af ét dyr/køn eksponeres for denne koncentration i flere tidsrum (f.eks. 15, 30, 60, 120 eller 240 minutter), så i alt 10 dyr eksponeres (kaldes eksponeringssession I) (tillæg 1).
37. Valget af grænsekonzentrationer afhænger normalt af lovgivningskrav. Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekonzentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l (eller den højest opnåelige koncentration) (3). Det kan være en teknisk udfordring at generere testkoncentrationer af visse testkemikalier, især som dampe og aerosoler. Ved test af aerosoler bør målet være at opnå en respirabel partikelstørrelse (dvs. en MMAD på 1-4 μ m) ved en grænsekonzentration på 2 mg/l. Dette er muligt for de fleste testkemikalier. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (2)]. I henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 bør test, der overstiger en grænsekonzentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden (3). Test, der overstiger en grænsekonzentration, bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed (3), og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten.

I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden test ved startkoncentrationen, så det sikres, at betingelserne i kammeret for denne koncentration kan opnås.

38. Hvis der observeres mortalitet eller døende tilstand ved startkoncentrationen, kan resultaterne ved denne koncentration bruges som udgangspunkt for yderligere test ved andre koncentrationer (se hovedforsøg). Hvis et testkemikalies fysiske eller kemiske egenskaber gør det umuligt at opnå en grænsekonzentration, testes den højest opnåelige koncentration. Hvis mindre end 50 % letalitet forekommer ved den højest opnåelige koncentration, er yderligere test ikke nødvendig. Hvis grænsekonzentrationen ikke kan opnås, gives en forklaring og understøttende data i forsøgsrapporten. Hvis den højest opnåelige koncentration af en damp ikke fremkalder toksicitet, skal testkemikallet muligvis genereres som en flydende aerosol.

Hovedforsøg: C × t-protokol

39. Startkoncentrationen (eksponeringssession I) (tillæg 1), som testes i hovedforsøget, er enten en grænsekonzentration eller en koncentration, som forsøgslederen har valgt ud fra forforsøget. Hvis mortalitet er blevet observeret under eller efter eksponeringssession I, bruges den minimumseksponering ($C \times t$), der resulterer i mortalitet, som rettesnor ved bestemmelsen af koncentrationen og eksponeringsperioderne til eksponeringssession II. Hver efterfølgende eksponeringssession afhænger af den forudgående session (se tillæg 1).
40. For mange testkemikalier er de resultater, der fås ved startkoncentrationen kombineret med tre yderligere eksponeringssessioner med et mindre tidsinterval (dvs. den geometriske afstand mellem eksponeringsperioder som angivet af faktoren mellem successive perioder, generelt $\sqrt{2}$), tilstrækkelige til at bestemme $C \times t$ -mortalitetsforholdet (15), men det kan være en fordel af bruge en femte eksponeringskoncentration [se tillæg 1 og GD 39 (2)]. Oplysninger om den matematiske behandling af resultater til $C \times t$ -protokollen findes i tillæg 1.

OBSERVATIONER

41. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk i eksponeringsperioden. Efter eksponering bør kliniske observationer foretages mindst to gange på eksponeringsdagen eller hyppigere, hvis det begrundes af dyrenes respons på behandlingen, og derefter mindst én gang dagligt i sammenlagt 14 dage. Varigheden af observationsperioden er ikke fast, men bestemmes ud fra arten og tidspunktet for indtræden af kliniske tegn og varigheden af restitutionperioden. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsættelse og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer. Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Dyr, som findes at være døende, og dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humanitært af hensyn til dyrevelfærden. Stor omhu bør udvises ved undersøgelser for kliniske tegn på toksicitet for at sikre, at indledningsvist dårligt udseende og forbigående respirationsændringer, der er resultatet af selve eksponeringen, ikke forveksles med toksicitet relateret til testkemikallet, som kræver tidlig aflivning af dyrene. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Guidance Document on Humane Endpoints (GD 19), skal tages i betragtning (7). Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.
42. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønstre. Hvis det er muligt, registreres evt. sondring mellem lokale og systemiske virkninger. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spyttflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab.

Kropsvægt

43. Det enkelte dyrs vægt registreres én gang i tilvænningsperioden, på eksponeringsdagen inden eksponeringen (dag 0) og mindst på dag 1, 3 og 7 (og derefter ugentligt), og den registreres på tidspunktet for død eller aflivning, hvis det indtræder efter dag 1. Kropsvægt anerkendes som en kritisk indikator for toksicitet, og dyr med et vedvarende vægttab på $\geq 20\%$ sammenlignet med vægten for forsøget, overvåges nøje. Overlevende dyr vejes og aflives humanitært ved afslutningen af perioden efter eksponering.

Patologi

44. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller aflives og tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk obduktion. Hvis makroskopisk obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

45. Yderligere undersøgelser, der på forhånd er medtaget som standard, kan overvejes for at udvide den fortolkningsmæssige værdi af undersøgelsen, f.eks. vejning af overlevende rotters lunger og tilvejebringelse af dokumentation for irritation ved hjælp af mikroskopisk undersøgelse af luftvejene. Undersøgte organer kan også omfatte organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer hos dyr, som overlever i 24 timer eller længere, og organer, som vides eller forventes at være påvirket. Mikroskopisk undersøgelse af hele luftvejene kan give nyttige informationer i forbindelse med testkemikalier, der reagerer med vand, f.eks. syrer og hygroskopiske testkemikalier.

DATA OG RAPPORTERING

Data

46. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt og obduktionsfund. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund.

Testrapport

47. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

- beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder
- anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte
- dyrenes antal, alder og køn
- randomiseringsmetode
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)
- beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

Testkemikalie

- fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)
- identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

- begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand
- historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

- beskrivelse af inhalationskammeret, herunder dimensioner og rumfang
- oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære
- apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

- luftkilde, behandling af tilført/udledt luft og konditioneringsystem
- metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære
- trykforskel (positiv eller negativ)
- eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)
- testatmosfærens tidsmæssige homogenitet/stabilitet
- placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer
- luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)
- information om det apparatur, der er anvendt til at måle ilt og kuldioxid, hvis det er relevant
- tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})
- antal volumenændringer pr. time
- evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata

- begrundelse for valg af målkonzentration i hovedforsøget
- nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)
- faktiske koncentrationer af testkemikaliets indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat
- alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m³ osv.); volumenenheder (f.eks. ppm, ppb osv.) kan også rapporteres i parentes
- partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σ), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres

Testbetingelser

- nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliets; hvis mekaniske processer har ændret testkemikaliets sammensætning, medtages resultaterne af analyser, som bekræfter testkemikaliets sammensætning
- en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren
- nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliets fra prøvematerialet)
- begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

- opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer
- opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer
- opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g
- opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)
- kropsvægten for det enkelte dyr registreret på forsøgsdage; dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før planlagt aflivning; for hvert dyr, toksiske virkninger indsætten, tidsforløb, og hvorvidt de er reversible
- for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund
- estimer af letalitet (f.eks. LC₅₀ eller LD₀₁) herunder 95 % konfidensgrænser, og hældning (hvis omfattet af evalueringsmetoden)
- statistisk relation, herunder estimat af eksponenten n ($C \times t$ -protokol); navnet på den anvendte statistiske software anføres.

Diskussion og fortolkning af resultater

- Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekonzentrationen eller partikelstørrelsen.
- Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes
- Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (8).
- Hvis test i henhold til kapitel B.52 i dette bilag (4) blev afbrudt til fordel for denne testmetode B.2, gives en begrundelse.
- Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.
- Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

LITTERATUR:

- (1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (3) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.
- (4) Kapitel B.52 i dette bilag, Akut inhalationstoksicitet — Akut toksisitetsklassemetoden (ATC).

- (5) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).
- (6) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: test med human hudmodel.
- (7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.
- (10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- (11) Pauluhn J og Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.
- (12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.
- (13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.
- (14) Ten Berge WF og Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.
- (15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104. Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINITION

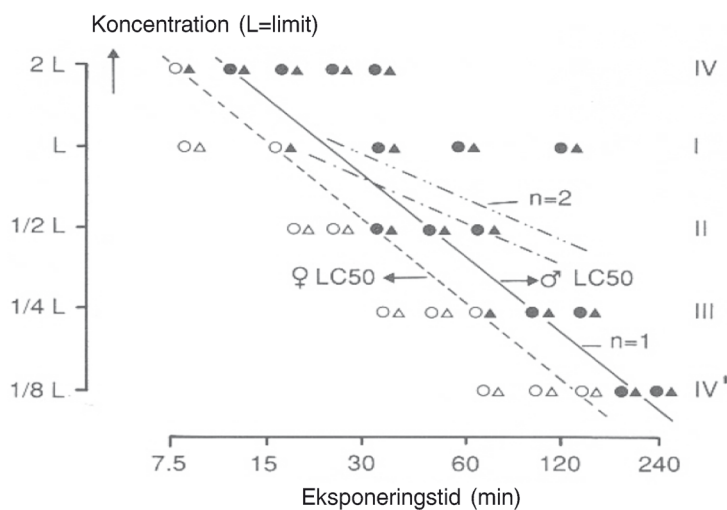
Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 1

C × t-protokol

1. Et trinvist koncentration × tid-forsøg (C × t) kan overvejes som alternativ til en traditionel protokol ved vurdering af inhalationstoksicitet (12) (13) (14). Det udføres fortrinsvis, når specifikke myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør forsøg med dyr i forskellige tidsrum, f.eks. med henblik på planlægning af nødberedskab eller med henblik på fysisk planlægning. Metoden indledes normalt med test af en grænsekonzentration (eksponeringssession I), hvor dyrene eksponeres for et testkemikalie i fem perioder (f.eks. 15, 30, 60, 120 og 240 minutter), så der opnås flere varigheder inden for én eksponeringssession (se figur 1). Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekonzentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l. Disse koncentrationer må kun overskrides, hvis myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør test ved disse koncentrationer (se afsnit 37 i kapitel B.2).
2. Hvis der foreligger begrænsede eller ingen oplysninger om toksiciteten af testkemikalie, bør der udføres et forforsøg, hvor grupper på højst tre dyr pr. køn eksponeres for de målkonzentrationer, som forsøgslederen har valgt, generelt i 240 minutter.
3. Hvis en grænsekonzentration testes i løbet af eksponeringssession I, og der observeres mindre end 50 % mortalitet, kræves der ikke yderligere testning. Hvis forholdet mellem koncentration/tid/respons skal bestemmes på højere niveauer end den angivne grænsekonzentration på grund af myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov, bør den næste eksponering ske ved et højere niveau, f.eks. to gange grænsekonzentrationen (dvs. 2 L i figur 1).
4. Hvis toksicitet observeres ved grænsekonzentrationen, skal der foretages yderligere testning (hovedforsøg). Disse yderligere eksponeringer gennemføres ved lavere koncentrationer (i figur 1: Eksponeringssession II, III eller IV) eller ved højere koncentrationer i kortere tid (i figur 1: Eksponeringssession IV) i tidsrum, der er tilpasset og ikke så stor spredning.
5. Testen (startkoncentration og yderligere koncentrationer) gennemføres med ét dyr/køn pr. koncentration/tidspunkt eller med to dyr af det mest modtagelige køn pr. koncentration/tidspunkt. Under visse omstændigheder kan forsøgslederen vælge at bruge to rotter pr. køn pr. koncentration/tidspunkt (eller fire dyr af det mest modtagelige køn pr. koncentration/tidspunkt) (15). Hvis der bruges to dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt, reduceres i de fleste tilfælde bias og variabiliteten af estimaterne, succesraten for estimeringen øges, og konfidensintervallet forbedres i forhold til protokollen som beskrevet her. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).
6. Ideelt bør hver eksponeringssession gennemføres på én dag. Det gør det muligt at udsætte den næste eksponering, indtil der er rimelig sikkerhed for overlevelse, og det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkonzentrationen for den næste eksponeringsgruppe. Hver eksponeringssession bør indledes med den gruppe, der skal eksponeres i længst tid, f.eks. 240 minutter-eksponeringsgruppen efterfulgt af 120 minutter-eksponeringsgruppen osv. Hvis dyr i 240 minutter-gruppen f.eks. dør efter 90 minutter eller viser alvorlige tegn på toksicitet (f.eks. ekstreme forandringer i respirationsmønstre, f.eks. besværet vejrtrækning), giver det ingen mening af eksponere en gruppe i 120 minutter, fordi mortaliteten sandsynligvis vil være 100 %. Forsøgslederen bør derfor vælge kortere eksponeringsvarigheder til den pågældende koncentration (f.eks. 90, 65, 45, 33 og 25 minutter).
7. Koncentrationen i kammeret måles hyppigt for at bestemme den tidsvægtede gennemsnitskoncentration for hver eksponeringsvarighed. Dødstidspunktet for hvert dyr anvendes så vidt muligt i den statistiske analyse (i stedet for eksponeringsvarigheden).
8. Resultaterne af de første fire eksponeringssessioner undersøges med henblik på at identificere datamangler i koncentration-tidskurven (se figur 1). Ved utilstrækkelig tilpasning kan der gennemføres endnu en eksponering (femte koncentration). Koncentration og eksponeringsvarighed for den femte eksponering bør vælges, så denne mangel dækkes.
9. Alle eksponeringssessioner (herunder den første eksponeringssession) anvendes til at beregne forholdet mellem koncentration/tid/respons ved hjælp af statistisk analyse (16). Hvis det er muligt, anvendes den tidsvægtede gennemsnitskoncentration og eksponeringsvarigheden indtil død (hvis død indtræder i løbet af eksponeringen) for hvert C × t-interval.

Figur 1

Hypotetisk illustration af forholdet mellem koncentration/tid/mortalitet hos rotter

Åbne symboler = overlevende; udfyldte symboler = døde dyr

Trekanter = hunner; cirkler = hanner

Ubrudt linje = LC₅₀-værdier (interval 7,5-240 min.) for hanner med n = 1

Punkteret linje = LC₅₀-værdier (interval 7,5-240 min.) for hunner med n = 1

Stiplede linjer = hypotetiske LC₅₀-værdier for hanner og hunner, hvis n havde været lig med 2 (12).

Ordliste

Koncentration:

Eksponeringstid:

10. Nedenfor findes et eksempel på en trinvis procedure:

Eksponeringssession I — Test ved grænsekonzentration (se figur 1)

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt ^(a)

— Målkonzentration ^(b) = grænsekonzentration

— Fem grupper af dyr eksponeres ved denne målkonzentration i henholdsvis 15, 30, 60, 120 og 240 minutter

↓

Eksponeringssession II ^(c) — Hovedforsøg

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

^(a) Hvis der ikke findes oplysninger om kønsbetinget modtagelighed, anvendes rotter af begge køn, dvs. et dyr/køn pr. koncentration. Ud fra de eksisterende informationer, eller hvis det i løbet af eksponeringen konstateres, at det ene køn er mere modtageligt, anvendes 10 dyr af det mest modtagelige køn (to dyr pr. koncentration/tidspunkt) ved hvert koncentrationsniveau i den efterfølgende test.

^(b) Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekonzentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l. I tilfælde af forventet toksicitet eller afhængigt af resultaterne af forforsøget vælges lavere startkoncentrationer. I tilfælde af myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov kan der anvendes højere koncentrationer.

^(c) Ideelt udsættes eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkonzentrationen for den næste eksponeringsgruppe.

- Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ^(d) (1/2 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor $\sqrt{2}$; se figur 1).

↓

Eksponeringssession III — Hovedforsøg

- Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt
- Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ^(d) (1/4 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor $\sqrt{2}$; se figur 1).

↓

Eksponeringssession IV' — Hovedforsøg

- Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt
- Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ^(d) (1/8 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor $\sqrt{2}$; se figur 1).

↓ eller

Eksponeringssession IV — Hovedforsøg

- Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt
- Fem grupper af dyr eksponeres ved en højere koncentration ^(e) (2 L) i lidt kortere tid (fordelt ved hjælp af faktor $\sqrt{2}$; se figur 1).

Matematisk behandling af resultater til C × t-protokollen

- En C × t-fremgangsmåde med fire eller fem eksponeringskoncentrationer og fem varigheder giver henholdsvis 20 eller 25 datapunkter. Med disse datapunkter kan C × t-forholdet beregnes ved hjælp af statistisk analyse (16):

Ligning 1

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

hvor C = koncentration; t = eksponeringsvarighed, eller

Ligning 2

$$\text{Response} = f(C^n t)$$

hvor $n = b_1/b_2$.

Ved hjælp af ligning 1 kan LC₅₀-værdien beregnes for en given tidsperiode (f.eks. 4 timer, 1 time, 30 minutter eller en tidsperiode inden for de testede tidsperioder) ved hjælp af P = 5 (50 % respons). Bemærk, at Habers regel kun gælder, når $n = 1$. LC₀₁ kan beregnes ved hjælp af P = 2,67.

^(d) Den minimumsdosis (koncentration × tid), der resulterede i mortalitet under test med startkoncentrationen (første eksponeringssession) bruges som udgangspunkt ved fastlæggelsen af den næste kombination af koncentration og eksponeringsvarigheder. Koncentrationen reduceres typisk med det halve (1/2 L), og dyrene eksponeres i en ny tidsperiode med et mindre interval ved hjælp af en geometrisk opdeling af eksponeringsperioder med faktor 1,4 ($\sqrt{2}$; se reference 11) omkring det tidspunkt, hvor den mindste letale dosis (tid × koncentration) blev observeret i løbet af den første eksponering. I denne figur (figur 1) blev mortalitet i eksponeringssession I først observeret ved 15 minutter. Varighederne i session II er derfor centreret omkring 30 minutter og er 15, 21 30, 42 og 60 minutter. Efter de første to eksponeringer anbefales det, at dataene indsættes i en figur som vist ovenfor, og det bør kontrolleres, om forholdet mellem koncentration og tid har en vinkel på 45 grader ($n = 1$), eller om forholdet mellem koncentration-tid-respons er mindre stejlt (f.eks. $n = 2$) eller stejlere ($n = 0,8$). I sidstnævnte tilfælde anbefales det på det kraftigste, at de næste koncentrationer og varigheder tilpasses tilsvarende.

^(e) I visse tilfælde kan det være nødvendigt at øge koncentrationen (2 L) i løbet af et nyt tidsinterval med et endnu mindre interval ved hjælp af en geometrisk opdeling af eksponeringsperioder med faktor 1,4 ($\sqrt{2}$) omkring det tidspunkt, hvor den mindste letale dosis (tid × koncentration) blev observeret i løbet af den første eksponering. Minimumseksponeringsvarigheden bør overstige 5 minutter. Maksimumseksponeringsvarigheden bør ikke overstige 8 timer.«

4) Kapitel B.7 og B.8 affattes således:

»B.7. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, ORAL) HOS GNAVERE

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 407 (2008). Den oprindelige Test Guideline 407 blev vedtaget i 1981. I 1995 blev en revideret udgave vedtaget med henblik på at indhente flere informationer fra de anvendte forsøgsdyr, navnlig om neurotoksicitet og immunotoksicitet.
2. I 1998 indledte OECD en højtprioriteret aktivitet, der havde til formål at revidere de eksisterende Test Guidelines og udvikle nye Test Guidelines for screening og test af potentielle hormonforstyrrende stoffer (8). Et element af denne aktivitet var at opdatere de eksisterende OECD-retningslinjer for »toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) hos gnavere« (TG 407) med parametre, der kunne bruges til at påvise testkemikaliers hormonforstyrrende aktiviteter. Denne fremgangsmåde blev underkastet et omfattende internationalt program, som omfattede test af relevansen og anvendeligheden af de yderligere parametre, disse parametres effektivitet for kemikalier med (anti)østrogen, (anti)androgen og (anti)thyreoid aktivitet samt reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og de nye parametres interferens med de parametre, der krævedes i henhold til den tidligere TG 407. Den store datamængde, der blev indhentet herved, er samlet og evalueret i detaljer i en omfattende OECD-rapport (9). Denne opdaterede testmetode B.7 (svarende til TG 407) er resultatet af de erfaringer og resultater, der er opnået i løbet af det internationale testprogram. Denne testmetode gør det muligt at placere visse virkninger fremkaldt af hormonforstyrrende stoffer i sammenhæng med andre toksiske virkninger.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

3. Efter at en akut toksicitetstest er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en oral toksicitetstest, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Denne testmetode har til formål at undersøge virkningerne på en meget bred vifte af potentielle mål for toksicitet. Den skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen eksponering i en relativt begrænset periode, herunder virkninger på nervesystemet, immunsystemet og det endokrine system. Med hensyn til disse effektparametre tager metoden sigte på at identificere kemikalier med neurotoksisk potentiale, som i givet fald bør undersøges nøjere, og kemikalier, der påvirker skjoldbruskkirtlens fysiologi. Den kan også tilvejebringe data om kemikalier, der påvirker mandlige og/eller kvindelige kønsorganer hos unge voksne dyr, og kan give en indikation af de immunologiske effekter.
4. Resultaterne af denne testmetode B.7 bør anvendes til fareidentifikation og risikovurdering. De resultater, der fås ved hjælp af de endokrinrelaterede parametre, bør ses i sammenhæng med »OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (11). Metoden omfatter det grundlæggende forsøg vedrørende toksicitet ved gentagen dosering, der kan bruges til kemikalier, for hvilke et 90-dages forsøg ikke er berettiget (f.eks. når produktionsmængden ikke overstiger visse grænser), eller som et forforsøg forud for et langtidsforsøg. Eksponeringsvarigheden bør være 28 dage.
5. Det internationale program, der blev gennemført med henblik på at validere parametre, der kan bruges til at påvise et testkemikalies potentielle hormonforstyrrende aktivitet, viste, at kvaliteten af de data, der indhentes ved hjælp af denne testmetode B.7, i høj grad afhænger af testlaboratoriets erfaring. Dette gælder specifikt for den histopatologiske bestemmelse af cykliske forandringer i de kvindelige kønsorganer og for bestemmelsen af vægten af de små hormonafhængige organer, der er vanskelige at dissekere. Der er udarbejdet vejledning om histopatologi (19). Den findes på OECD's offentlige websted for »Test Guidelines«. Den har til formål at hjælpe patologer i deres undersøgelser og øge testens sensitivitet. En lang række parametre blev vurderet at være indikatorer for endokrinrelateret toksicitet og er medtaget i testmetoden. Parametre, for hvilke der ikke forelå tilstrækkelige data til at påvise anvendelighed, eller som kun gav svage beviser i valideringsprogrammet på deres evne til at hjælpe med at påvise hormonforstyrrende stoffer, foreslås som valgfrie effektparametre (se tillæg 2).
6. På grundlag af data genereret i valideringsprocessen skal det understreges, at testens sensitivitet ikke er tilstrækkelig til at identificere alle stoffer med (anti)androgene eller (anti)østrogene virkemåder (9). Testen anvendes ikke i en livsfase, der er mest sensitiv over for hormonforstyrrelser. Ved hjælp af testmetoden blev der dog i løbet af valideringsprocesserne identificeret stoffer, som svagt og stærkt påvirker skjoldbruskkirtlens funktion, og stærkt og moderat hormonforstyrrende stoffer, der virker gennem østrogene eller androgene receptorer, men i de fleste tilfælde blev der ikke identificeret hormonforstyrrende stoffer, som svagt påvirker østrogene eller androgene receptorer. Den kan derfor ikke beskrives som en test til screening af hormonforstyrrende aktivitet.
7. Manglen på virkninger med tilknytning til disse virkemåder kan derfor ikke antages at være bevis for manglende virkning på det endokrine system. Hvad angår virkninger fremkaldt af hormonforstyrrende stoffer, bør stofkarakterisering derfor ikke alene baseres på resultaterne af denne testmetode, men bør anvendes i en »weight of evidence«-tilgang, der bruger alle eksisterende data om et kemikalie til at karakterisere potentiel hormonforstyrrende aktivitet. Myndigheders afgørelser vedrørende hormonforstyrrende aktivitet (stofkarakterisering) bør derfor baseres på en bred tilgang og ikke alene resultaterne af anvendelsen af denne testmetode.

8. Det anerkendes, at alle dyreforsøg skal overholde lokale standarder for dyrepleje. De anførte beskrivelser af pleje og behandling er minimumsstandarder og tilsidesættes af evt. strengere lokale bestemmelser. Nærmere anvisninger i human behandling af dyr findes i OECD (14).
9. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

TESTENS PRINCIP

10. Testkemikallet administreres oralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 28 dage. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduces, og de overlevende dyr aflives og obduces ved forsøgets afslutning. Et 28-dages forsøg tilvejebringer informationer om virkningerne af gentagen oral eksponering og kan angive behovet for yderligere forsøg med længere varighed. Det kan også give informationer om, hvilke koncentrationer der skal vælges til forsøg med længere varighed. Data, der udledes ved hjælp af testmetoden, bør kunne anvendes til at karakterisere testkemikallets toksicitet, indikere dosis-responsforholdet og bestemme det laveste dosisniveau (NOAEL).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

11. Rotten er den foretrukne gnaverart, selv om andre gnaverarter kan anvendes. Hvis de parametre, der er anført i denne testmetode B.7, undersøges hos andre gnaverarter, gives en detaljeret begrundelse. Selv om det er biologisk plausibelt, at andre arter reagerer på giftstoffer på næsten samme måde som rotter, kan brugen af mindre arter resultere i øget variabilitet som følge af de tekniske udfordringer, der er forbundet med dissekering af små organer. I det internationale valideringsprogram til påvisning af hormonforstyrrende stoffer var rotter den eneste anvendte art. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Doseringen bør begynde snarest muligt efter fravæning, og i hvert fald før dyrene er ni uger gamle. Ved forsøgets begyndelse bør den indbyrdes vægtforskel være minimal og ikke overstige $\pm 20\%$ af gennemsnittet for hvert køn. Hvis et forsøg med gentagen oral dosis gennemføres som et forforsøg forud for et langtidsforsøg, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og herkomst i begge forsøg.

Opbevaring og fodring

12. Alle fremgangsmåder skal overholde lokale standarder for pleje af forsøgsdyr. Temperaturen i forsøgslokalet skal være $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30% og helst ikke være over 70% , hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men $50\text{--}60\%$ bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikallet, når denne administrationsmåde anvendes. Dyrene bør anbringes i bure med små grupper af samme køn. Dyrene kan anbringes enkeltvis, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis flere dyr anbringes i samme bur, bør der højst være fem dyr pr. bur.
13. Foderet analyseres regelmæssigt for forurenende stoffer. En prøve af foderet opbevares, indtil rapporten er udarbejdet.

Forberedelse af dyrene

14. Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden behandlingsforsøget påbegyndes, så de tilvænnenes laboratorieforholdene.

Fremstilling af doser

15. Testkemikallet indgives gennem sonde eller i føden eller drikkevandet. Den orale administrationsmetode afhænger af forsøgets formål og testkemikallets fysiske/kemiske/toksikokinetiske egenskaber.
16. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikallet i et egnet vehikel. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Testkemikallets stabilitet i vehiklet skal bestemmes.

FREMGANGSMÅDE**Dyrenes antal og køn**

17. Der anvendes mindst 10 dyr (5 hunner og 5 hanner) ved hvert dosisniveau. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Det kan overvejes at udsætte en yderligere satellitgruppe på 10 dyr (5 af hvert køn) i kontrolgruppen og i gruppen med den højeste dosis, således at man kan observere evt. reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen.

Dosering

18. Generelt skal der anvendes mindst tre testgrupper og en kontrolgruppe, men hvis andre data ikke giver anledning til at forvente virkning af en dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, kan en grænsetest udføres. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres et dosisbestemmende forsøg (»range finding«) (dyr af samme stamme og herkomst) til bestemmelse af de doser, der skal anvendes. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis.
19. Dosisniveauerne udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om testkemikaliet eller beslægtede kemikaliers toksicitet og (toksiko)kinetik. Den højeste dosis vælges med henblik på fremkaldelse af toksiske effekter, men ikke død eller alvorlig lidelse. Normalt vælges en faldende række dosisniveauer til påvisning af eventuelt dosisafhængigt respons og niveau, hvor skadelige effekter ikke kan observeres ved det laveste dosisniveau (NOAEL). Det optimale interval mellem to doser er ofte en faktor på 2-4, og tilføjelse af en fjerde forsøgsgruppe er ofte at foretrække frem for anvendelse af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 10) mellem dosisniveauerne.
20. Hvis der observeres generel toksicitet (f.eks. reduceret kropsvægt, virkninger på lever, hjerte, lunger eller nyrer osv.) eller andre forandringer, der eventuelt ikke er toksiske virkninger (f.eks. reduceret indtagelse af føde eller forstørret lever), bør de observerede virkninger på de immunologiske, neurologiske eller endokrine effektparametre fortolkes med forsigtighed.

Grænsetest

21. Hvis en test med et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller, ved administration gennem foder eller drikkevand, en tilsvarende procentdel i foderet eller drikkevandet (baseret på bestemmelse af kropsvægten), udført efter nedenstående fremgangsmåde, ikke fremkalder erkendbare toksiske virkninger, og hvis der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indikerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

Administration af doser

22. Dyrene får testkemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 28 dage. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør. Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Dette volumen må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, af hvilke der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende stoffer, hvis effekt sædvanligvis forstærkes ved højere koncentration, skal variation af testvolumenet minimeres ved at justere koncentrationen, så volumenet er konstant ved alle dosisniveauer.
23. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Ved administration af testkemikaliet i foderet kan det enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrets kropsvægt; den anvendte mulighed skal specificeres. Ved administration med sonde skal dosis gives på tilsvarende tidspunkt hver dag og efter behov justeres, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Hvis et forsøg med gentagen dosis anvendes som et forforsøg forud for et langtidsforsøg, bør foderet være det samme i begge forsøg.

Observationer

24. Observationsperioden varer 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgingsobservationer holdes i mindst 14 dage uden indgift af testkemikalie, således at det kan registreres, om der er forsinkede, vedvarende eller reversible toksiske virkninger.
25. Der foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, om muligt på det eller de samme tidspunkter hver dag og under hensyntagen til, hvornår de forventede virkninger efter dosering er stærkest. Dyrenes sundhedstilstand registreres. Dyrene observeres for morbiditet og mortalitet mindst to gange om dagen.

26. Én gang før den første eksponering (med henblik på individbaserede sammenligninger) og mindst én gang om ugen derefter foretages der indgående kliniske observationer af alle dyrene. Med henblik på disse observationer tages dyrene ud af deres egne bure og anbringes i et standardindelukke. Observationerne udføres om muligt på samme tidspunkt hver gang. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at testbetingelserne varierer minimalt, og at observationerne om muligt foretages af observatører, der ikke har kendskab til behandlingen. Observationerne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (2).
27. I den fjerde eksponeringsuge vurderes reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (2) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (3) (4) (5), gribestyrke og motorisk aktivitet (7). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid anvendes.
28. Funktionelle observationer i den fjerde eksponeringsuge kan udelades, hvis forsøget gennemføres som et forforsøg til et efterfølgende forsøg vedrørende subkronisk toksicitet (90 dage). I så fald medtages de funktionelle observationer i det opfølgende forsøg. På den anden side kan data vedrørende funktionelle observationer fra forsøget med gentagen dosis lette valget af dosisniveauer for et efterfølgende forsøg vedrørende subkronisk toksicitet.
29. Undtagelsesvis kan funktionsundersøgelser udelades på grupper, der på anden vis viser tegn på toksicitet i en grad, der vil have afgørende indflydelse på funktionsundersøgelserne.
30. Ved obduktion kan brunstcyklus for alle hundyr bestemmes (frivilligt) ved at tage vaginalt smear. Disse observationer skaffer viden om brunstcyklusfasen på aflivningstidspunktet og bidrager til den histologiske evaluering af østrogenfølsomt væv [se vejledning om histopatologi (19)].

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

31. Alle dyr skal vejes mindst én gang ugentlig. Mængden af foderindtagelse skal beregnes mindst én gang ugentlig. Hvis testkemikallet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst én gang ugentlig.

Hæmatologisk undersøgelse

32. Følgende hæmatologiske undersøgelser foretages ved forsøgsperiodens afslutning: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, retikulocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og en måling af koaguleringssevne/tid. Andre analyser, som bør udføres, hvis testkemikallet eller dets putative metabolitter har eller mistænkes at have oxiderende egenskaber, omfatter methæmoglobinkoncentration og Heinz-legemer.
33. Der tages blodprøver fra et bestemt, angivet sted, lige inden eller i forbindelse med aflivning af dyrene; prøverne opbevares under passende betingelser. Dyrene skal være fastende inden aflivning (¹).

Klinisk biokemi

34. Klinisk-biokemiske bestemmelser med henblik på undersøgelse af vigtige toksiske virkninger i væv, og navnlig i nyrer og lever, foretages med blodprøver, der udtages fra alle dyr lige inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning (bortset fra dem, der er fundet døende, og/eller som er aflivet under forsøget). Undersøgelser af plasma eller serum skal omfatte natrium, kalium, glukose, total kolesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, alkalisk fosfatase, γ -glutamyltranspeptidase og glutamat-dehydrogenase), og galdesyrer. Målinger af yderligere enzymer (fra lever eller andre organer) og bilirubin kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger.
35. Følgende urinanalyser kan eventuelt udføres i forsøgets sidste uge til bestemmelse af: udseende, volumen, osmolalitet eller specifik vægtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller.

(¹) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor foderindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikallet. Hvis der benyttes faste, bør analyserne udføres efter de funktionelle observationer i forsøgets fjerde uge.

36. Yderligere bør man overveje at måle plasma- eller serummarkører for generel vævsskade. Andre bestemmelser, der bør foretages, hvis testkemikaliets kendte egenskaber kan eller forventes at kunne indvirke på tilsvarende metaboliske funktioner, omfatter kalcium, fosfat, triglycerider, visse hormoner og cholinesterase. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

37. Selv om der i den internationale evaluering af de endokrinrelaterede effektparametre ikke blev påvist en klar fordel med henblik på bestemmelse af thyroideahormoner (T3 og T4) og TSH, kan det være nyttigt at opbevare plasma- eller serumprøver for at måle T3, T4 og TSH (frivillig), hvis der er tegn på en virkning på hypofyse-thyroidea-aksen. Disse prøver kan opbevares nedfrosne ved -20°C . Følgende faktorer kan påvirke variabiliteten og de absolutte koncentrationer af hormonanalyserne:

— aflivningstidspunkt på grund af variation i hormonkoncentrationer i løbet af døgnet

— aflivningsmetode, der har til formål at undgå unødigt stress af dyrene, som kan påvirke hormonkoncentrationerne

— analysesæt til hormonanalyser, der kan have forskellige standardkurver.

Definitiv identifikation af thyroidea-aktive kemikalier baseret på histopatologisk analyse er mere pålidelig end analyse baseret på hormonniveauer.

38. Plasmaprøver, der specifikt er beregnet til hormonanalyse, tages på et tilsvarende tidspunkt på dagen. Det anbefales, at T3-, T4- og TSH-analyser overvejes i tilfælde af ændringer af histologi for thyroidea. De numeriske værdier, der fås ved analyse af hormonkoncentrationer, varierer ved anvendelse af forskellige analysesæt på markedet. Det betyder, at der muligvis ikke kan opstilles effektivitetskriterier baseret på ensartede historiske data. Alternativet bør laboratorierne tilstræbe at holde variationskoefficienterne til kontrol under 25 for T3 og T4 og under 35 for TSH. Alle koncentrationer registreres i ng/ml.

39. Hvis der ikke foreligger passende data fra tidligere forsøg, bør det overvejes at bestemme hæmatologiske og klinisk-biokemiske variable, inden eksponering påbegyndes, eller så vidt muligt hos en gruppe dyr, der ikke er med i forsøgsgrupperne.

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

40. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniet, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, testikler, bitestikler, prostata og vesiculæ seminales med prostata anterior (coagulating glands) (som én samlet enhed), thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyrene undersøges for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Forsigtighed skal udvises ved trimming af prostata for at undgå punktering af de væskefyldte vesiculæ seminales. Alternativt kan vesiculæ seminales og prostata trimmes og vejes efter fiksering.

41. To andre væv kan også vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring: ovarier (vådvægt) og uterus med cervix (vejledning om udtagning og forberedelse af uterusvæv med henblik på vejning findes i OECD TG 440 (18)).

42. Skjoldbruskkirtlens vægt (frivillig) bestemmes efter fiksering. Trimming bør også foretages omhyggeligt og først efter fiksering for at undgå beskadigelse af vævet. Beskadiget væv kan kompromittere den histopatologiske analyse.

43. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 47): alle makroskopiske læsioner, hjerne (repræsentative regioner, herunder cerebrum, cerebellum og pons), rygmarv, øjne, mavesæk, tyktarm og tyndtarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, thymus, skjoldbruskkirtel, spiserør og lunger (præserveret ved oppumpning med fikseringsmiddel og efterfølgende immersion), gonader (testikler og æggestokke), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, prostata og vesiculæ seminales med prostata anterior (coagulating glands), vagina, urinblære, lymfeknuder [ud over den nærmeste drænende lymfeknude bør en anden lymfeknude udtages på baggrund af laboratoriets erfaring (15)], perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen, skeletmuskulatur og knogle med knoglemarv (afsnit eller som alternativt et nyligt præpareret knoglemarvsaspirat). Det anbefales, at testikler fikseres ved immersion i Bouins eller modificeret Davidsons fikseringsmiddel (16) (17). Tunica albuginea punkteres forsigtigt og overfladisk i begge ender af organet med en kanyle, der muliggør hurtig penetration af fikseringsmidlet. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

44. Følgende væv kan give værdifulde indikationer på endokrinrelaterede virkninger: gonader (testikler og æggestokke), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, vesiculæ seminales med prostata anterior (coagulating glands), dorsolateral og ventral prostata), vagina, hypofyse, brystkirtler fra handyr, skjoldbruskkirtel og binyrer. Forandringer i brystkirtler fra handyr er ikke tilstrækkeligt dokumenteret, men denne parameter kan være meget sensitiv over for stoffer med østrogen virkemåde. Observation af organer/væv, der ikke er anført i afsnit 43, er frivillig (se tillæg 2).
45. I vejledningen om histopatologi (19) findes der flere oplysninger om dissekering, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af endokrine væv.
46. I det internationale testprogram blev der fremskaffet dokumentation for, at små hormonforstyrrende virkninger af kemikalier med ringe evne til at påvirke homeostase for kønshormoner kan identificeres ud fra forstyrrelse af synkroniseringen af brunstcyklussen i forskellige væv og ikke i så høj grad ud fra direkte histopatologiske forandringer i hundyrenes kønsorganer. Selv om der ikke blev fremskaffet definitivt bevis for sådanne virkninger, anbefales det, at bevis for mulig asynkronicitet i brunstcyklussen tages i betragtning ved fortolkningen af histopatologiske undersøgelser af æggestokke (follikulære celler og theca-granulosaceller), uterus, cervix og vagina. Cyklusfasen bestemt ved vaginalt smear kan, hvis den vurderes, også medtages i denne sammenligning.

Histopatologi

47. En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelserne skal omfatte alle dyrene i de andre grupper, også hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.
48. Alle makroskopiske læsioner undersøges.
49. Hvis der anvendes en satellitgruppe, skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i behandlingsgruppen.

DATA OG RAPPORTERING

Data

50. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.
51. Når det er muligt, bedømmes resultaterne ved en egnet og almindeligt anerkendt statistisk metode. Sammenligninger af virkningen i et dosisinterval bruges til at udgå brugen af flere t-test. Valg af statistisk metode skal finde sted i forbindelse med fastlæggelsen af forsøgets design.
52. Med henblik på kvalitetskontrol foreslås det, at historiske kontroldata indsamles, og at variationskoefficienter beregnes for numeriske data, især for parametre med relation til bestemmelse af hormonforstyrrende effekter. Disse data kan bruges i forbindelse med sammenligninger, når de faktiske forsøg evalueres.

Testrapport

53. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber
- identifikationsdata.

For eventuelt vehikel:

- begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

- den anvendte art/stamme
- dyrenes antal, alder og køn
- herkomst, miljøbetingelser, kost osv.
- de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse
- begrundelse for andre arter end rotte.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af dosisniveau
- oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning, opnået koncentration, præparatets stabilitet og homogenitet
- oplysninger om administration af testkemikaliaet
- eventuel omregning fra testkemikaliekoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg kropsvægt pr. dag)
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Valgfrie undersøgte effektparametre

- liste over valgfrie undersøgte effektparametre.

Resultater:

- kropsvægt og ændringer i kropsvægt
- foderindtagelse og indtagelse af vand, om muligt
- data vedrørende toksicitet sat over for køn og dosis, inklusive toksicitetstegnene
- art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)
- vurdering af sanseevne, gribestyrke og motorisk aktivitet
- hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier
- klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier
- kropsvægt ved aflivning og organvægte
- obduktionsfund
- en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund
- data for absorption, hvis de forefindes
- når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

*Diskussion af resultaterne**Konklusioner*

Tillæg 1

DEFINITIONER

Androgenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiandrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

Antiøstrogenicitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17β) i en pattedyrsorganisme.

Antithyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T₃) i en pattedyrsorganisme.

Dosering: et generelt udtryk, som indbefatter dosis, doseringens hyppighed og anvendelsens varighed.

Dosis: den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægt af testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets vægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag) eller som en konstant koncentration i foderet.

Synlig toksicitet: et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgift af testkemikaliets. De bør være tilstrækkelige til risikovurdering og bør være af en sådan karakter, at en forøgelse af den indgivne dosis må forventes at resultere i udviklingen af svære toksiske virkninger og sandsynlig mortalitet.

NOAEL: forkortelsen for »no-observed-adverse-effect level« (niveau uden observerbare negative effekter), dvs. det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede negative virkninger.

Østrogenicitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17β) i en pattedyrsorganisme.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Thyreoid aktivitet: et kemikalies evne til at fungere som et naturligt thyreoideahormon (f.eks. T₃) i en pattedyrsorganisme.

Validering: en videnskabelig proces, der har til formål at karakterisere de operationelle krav og begrænsninger vedrørende en testmetode og påvise dens pålidelighed og relevans i forbindelse med et bestemt formål.

Tillæg 2

Anbefalede effektparametre til påvisning af hormonforstyrrende stoffer i testmetode B.7

Obligatoriske effektparametre	Valgfrie effektparametre
Vægt	
— Testikler — Bitestikler — Binyrer — Prostata og vesiculæ seminales med prostata anterior	— Æggestokke — Uterus med cervix — Skjoldbruskkirtlen
Histopatologi	
— Gonader: — Testikler — Æggestokke — Sekundære kønsorganer: — Bitestikler — Prostata og vesiculæ seminales med prostata anterior — Uterus med cervix — Binyrer — Skjoldbruskkirtlen — Vagina	— Vaginalt smear — Brystkirtler fra handyr — Hypofyse
Hormonmåling	
	— Cirkulationsniveau for T3 og T4 — Cirkulationsniveau for TSH

LITTERATUR:

- (1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- (2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.
- (4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.
- (5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.
- (6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.
- (7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.
- (8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No. 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

- (10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html
- (12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.
- (16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. I: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE og Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52-85.
- (17) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.
- (18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No.440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- (19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

B.8. SUBAKUT TOKSICITET (INHALATION): 28-DAGES FORSØG

RESUMÉ

Denne reviderede testmetode B.8 har til formål at tilvejebringe en fuld karakterisering af testkemikaliet toksicitet ved inhalation efter gentagen eksponering i en begrænset periode (28 dage) og at fremskaffe data til kvantitative inhalationsrisikovurderinger. Grupper bestående af mindst fem hannavere og fem hunnavere eksponeres i seks timer om dagen i 28 dage for a) testkemikaliet ved tre eller flere koncentrationsniveauer, b) filtreret luft (negativ kontrol) og/eller c) vehiklet (vehikelkontrol). Dyr eksponeres generelt fem dage om ugen, men eksponering i syv dage om ugen tillades også. Hanner og hunner testes altid, men de eksponeres muligvis ved forskellige koncentrationsniveauer, hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie. Denne metode giver forsøgslederen fleksibilitet til at medtage satellitgrupper (reversibilitet), bronchieskylning (BAL), neurologiske test og yderligere kliniske patologiske og histopatologiske evalueringer med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliet toksicitet.

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 412 (2009). Den oprindelige Test Guideline 412 (TG 412) for subakut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 (1). Denne testmetode B.8 (som svarer til den reviderede TG 412) er blevet opdateret, så den afspejler det videnskabelige niveau og for at opfylde nuværende og fremtidige lovgivningskrav.
2. Denne metode gør det muligt at karakterisere negative virkninger efter gentagen daglig inhalationseksponering for et testkemikalie i 28 dage. Data, der udledes af 28-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation, kan bruges til kvantitative risikovurderinger [hvis de ikke efterfølges af et 90-dages forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation (kapitel B.29 i dette bilag)]. Dataene kan også give informationer om, hvilke koncentrationer der skal vælges til forsøg med længere varighed, f.eks. 90-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation. Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af nanomaterialer. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document 39 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliets bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Informationer, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier samt data udledt af forsøg med akut toksicitet ved inhalation. Hvis neurotoksicitet forventes eller observeres i løbet af forsøget, kan forsøgslederen vælge at inkludere relevante evalueringer, som f.eks. FOB (Functional Observational Battery) og måling af motorisk aktivitet. Selv om tidspunkterne for eksponering kan være afgørende i forhold til de specifikke undersøgelser, må gennemførelsen af disse ekstra aktiviteter ikke påvirke det grundlæggende forsøgsdesign.
4. Fortyndinger af ætsende eller irriterende testkemikalier kan testes ved koncentrationer, der giver den ønskede toksicitetsgrad [se GD 39 (2)]. Når dyr eksponeres for sådanne materialer, bør målkoncentrationerne være så lave, at de ikke medfører udtalt smerte og lidelse, men de bør alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i det enkelte tilfælde, fortrinsvis på grundlag af målrettede dosisbestemmende forsøg (»range finding«), der giver information om den kritiske effektparameter, irritationstærskel og tidspunkt for indtræden (se afsnit 11-13). Der gives en begrundelse for valget af koncentration.
5. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humanitært. Dyr, som er døende, betragtes på samme måde som dyr, der dør i løbet af forsøget. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (3).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

6. Der anvendes raske unge gnavere af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes andre dyrearter.

Forberedelse af dyrene

7. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På randomiseringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem syv og ni uger gamle. Deres kropsvægt bør være inden for $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for hvert køn. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets start, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

Dyreopdræt og -sundhed

8. Dyrene identificeres individuelt med subkutane transpondere, hvis det er muligt, for at lette observationer og undgå forvirring. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslang. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødigt fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænnning til fastspændingsslangene ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

Inhalationskamre

9. Karakteren af testkemikaliets og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

TOKSICITETSFORSØG**Grænsekonzentrationer**

10. I modsætning til forsøg med akut toksicitet er der ingen definerede grænsekonzentrationer i 28-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation. Den testede maksimumskonzentration baseres på: 1) den højest opnåelige koncentration, 2) »worst case« eksponeringsniveau for mennesker, 3) behovet for at sikre tilstrækkelig iltforsyning og/eller 4) hensyn til dyrevelfærd. Hvis der ikke foreligger databaserede grænser, kan de akutte grænser i forordning (EF) nr. 1272/2008 (13) anvendes (dvs. op til en maksimumskonzentration på 5 mg/l for aerosoler, 20 mg/l for dampe og 20 000 ppm for gasser); se GD 39 (2). Der gives en begrundelse, hvis det er nødvendigt at overskride disse grænser ved test af gasser eller meget flygtige testkemikalier (f.eks. kølemidler). Grænsekonzentrationen bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødigt stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

Dosisbestemmende forsøg

11. Inden hovedforsøget påbegyndes, kan det være nødvendigt at udføre et dosisbestemmende forsøg (»range finding«). Et dosisbestemmende forsøg er mere omfattende end et forforsøg, fordi det ikke er begrænset til valg af koncentration. Viden, der opnås fra et dosisbestemmende forsøg, kan resultere i et vellykket hovedforsøg. Et dosisbestemmende forsøg kan f.eks. fremskaffe teknisk information om analysemetoder, partikelstørrelsesfordeling, opdagelse af toksiske mekanismer, klinisk patologi og histopatologiske data samt estimeringer af de mulige NOAEL- og MTC-konzentrationer i et hovedforsøg. Forsøgslederen kan vælge at bruge det dosisbestemmende forsøg til at identificere tærsklen for irritation af luftvejene (f.eks. ved hjælp af histopatologisk undersøgelse af luftvejene, lungefunktionstest eller bronchieskylning), den øvre koncentration, der tåles uden unødigt belastning af dyrene, og de parametre, der bedst karakteriserer et testkemikalies toksicitet.
12. Et dosisbestemmende forsøg kan omfatte et eller flere koncentrationsniveauer. Højest tre hanner og tre hunner bør eksponeres ved hvert koncentrationsniveau. Et dosisbestemmende forsøg bør vare mindst fem dage og generelt højst 14 dage. En begrundelse for valget af koncentrationer til hovedforsøget gives i forsøgsrapporten. Formålet med hovedforsøget er at påvise et forhold mellem koncentration-respons med udgangspunkt i det, der forventes at være den mest sensitive effektparameter. Den laveste koncentration bør ideelt være en NOAEL-konzentration, mens den højeste koncentration bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødigt stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).
13. Når koncentrationerne vælges til det dosisbestemmende forsøg, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder data om forholdet mellem struktur og aktivitet og data vedrørende lignende kemikalier (se afsnit 3). Et dosisbestemmende forsøg kan bekræfte/afvise, hvad der betragtes som de mest sensitive mekanistisk baserede effektparametre, f.eks. organofosfaters hæmning af kolinesterasen, erythrocytotoksiske stoffers dannelse af methæmoglobin, thyreoideahormoner (T_3 , T_4) for thyreotoksikanter, protein, eller neutrofiler i bronchieskylning for uskadelige svært opløselige partikler eller lungeirriterende aerosoler.

Hovedforsøg

14. Hovedforsøget vedrørende subakut toksicitet omfatter generelt tre koncentrationsniveauer og også en samtidig negativ kontrolgruppe (luft) og/eller vehikelgruppe, hvis det er nødvendigt (se afsnit 17). Alle tilgængelige data bør anvendes som hjælp til at vælge hensigtsmæssige eksponeringsniveauer, herunder resultaterne af systemiske toksicitetsforsøg, metabolisme og kinetik (der bør lægges særlig vægt på at undgå høje koncentrationsniveauer, der mætter kinetiske processer). Hver testgruppe består af mindst 10 gnavere (5 hanner og 5 hunner), der eksponeres for testkemikallet i seks timer om dagen i fem dage om ugen i en periode på fire uger (samlet forsøgsvarighed på 28 dage). Dyr kan også eksponeres i syv dage om ugen (f.eks. ved test af inhalerede lægemidler). Hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie, kan kønnene eksponeres ved forskellige koncentrationsniveauer for at observere forholdet mellem koncentration-respons som beskrevet i afsnit 15. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end 6 timer/dag, eller når det er nødvendigt at gennemføre et forsøg med langvarig helkropseksponering (f.eks. 22 timer/dag) [se GD 39 (2)]. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden, medmindre eksponeringen varer længere end seks timer. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.
15. De valgte målkonzentrationer bør identificere målorganet (-organerne) og påvise et klart forhold mellem koncentration og respons:
- Det højeste koncentrationsniveau bør medføre toksiske virkninger, men ikke medføre langvarige symptomer eller letalitet, som kan forhindre en meningsfuld evaluering.
 - De mellemste koncentrationsniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes graderede toksiske effekter mellem effekterne ved den laveste og den højeste koncentration.
 - Det laveste koncentrationsniveau bør kun have ingen eller ingen toksisk virkning.

Satellitforsøg (reversibilitetsforsøg)

16. Et satellitforsøg (reversibilitetsforsøg) kan bruges til at observere reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Satellitgrupper består af fem hanner og fem hunner, der eksponeres samtidig med forsøgsdyrene i hovedforsøget. Satellitforsøgsgrupper bør eksponeres for testkemikallet ved det højeste koncentrationsniveau, og der bør efter behov være samtidige luft- og/eller vehikkelkontrolgrupper (se afsnit 17).

Kontrol dyr

17. Dyr i den samtidige negative (luft)kontrolgruppe bør behandles på samme måde som forsøgsdyrene, bortset fra at de eksponeres for filtreret luft i stedet for testkemikallet. Hvis vand eller et andet stof bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikkelkontrolgruppe inkluderes i forsøget i stedet for en negativ (luft)kontrolgruppe. Vand bør så vidt muligt anvendes som vehikel. Når vand bruges som vehikel, eksponeres kontrol dyrene for luft med samme fugtighed som de eksponerede grupper. Valget af et hensigtsmæssigt vehikel baseres på et korrekt gennemført forforsøg eller historiske data. Hvis et vehikels toksicitet ikke er velkendt, kan forsøgslederen vælge at bruge en negativ (luft)kontrol og en vehikkelkontrol, men det frarådes på det kraftigste. Hvis historiske data viser, at vehiklet er ikke-toksisk, er der ikke behov for en negativ (luft)kontrolgruppe, og der anvendes kun en vehikkelkontrol. Hvis et forforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration, og at denne vehikkelkontrol bør anvendes.

EKSPONERINGSBETINGELSER**Administration af koncentrationer**

18. Dyr eksponeres for testkemikallet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikallets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikallet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at reducere partikelstørrelsen. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

Partikelstørrelsesfordeling

19. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 3 µm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (4). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetallrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler og fibre kan overstige den.

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

20. Ideelt testes testkemikallet uden et vehikel. Hvis det er nødvendigt at bruge et vehikel til at frembringe en passende koncentration og partikelstørrelse af testkemikallet, bør der fortrinsvis anvendes vand. Når et testkemikalie er opløst i et vehikel, skal dets stabilitet påvises.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER**Luftgennemstrømning i kammer**

21. Luftgennemstrømningen gennem eksponeringskammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Realtidsovervågning af koncentrationen (eller den tidsmæssige stabilitet) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for inhalation. Hvis koncentrationen overvåges i realtid, kan frekvensen for måling af luftgennemstrømning reduceres til én måling pr. eksponering pr. dag. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås. Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at denne standard ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles. Hvis målinger på den første eksponeringsdag viser, at disse gasser er på passende niveauer, kræves der ikke yderligere målinger.

Kammerets temperatur og relative fugtighed

22. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres hver time under eksponering, hvis det er muligt. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikallets indvirkning på testmetoden.

Testkemikalie: nominel koncentration

23. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem inhalationskammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

24. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikallet målt ved dyrenes vejtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikallet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode.
25. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikallet i hele forsøgets varighed, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikallet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).
26. Eksponeringsatmosfæren skal være så konstant som praktisk muligt. Apparatur til realtidsovervågning, f.eks. et aerosolfotometer til måling af aerosoler eller en kulbrinteanalysator til dampe, kan bruges til at påvise eksponeringsbetingelsernes stabilitet. Den faktiske koncentration i kammeret måles mindst tre gange i løbet af hver eksponeringsdag for hvert eksponeringsniveau. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan én prøve pr. eksponeringsperiode accepteres. Ideelt udtages denne prøve over hele eksponeringsperioden. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end $\pm 10\%$ for gasser og dampe eller $\pm 20\%$ for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikallet genereres. Det omfatter den tid, der kræves for at opnå ækvilibrering af kammeret (t_{95}) og henfald. Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (2).
27. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe, og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af specialdrevne slutprodukter/-apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer. Der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikallet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen som helhed og ikke kun for det aktive stof eller indikatorstoffet (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

28. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst ugentligt for hvert koncentrationsniveau ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse (APS). Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget.
29. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlings effektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises ved alle de koncentrationer, der testes i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage et forsøg.
30. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser.

OBSERVATIONER

31. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk før, under og efter eksponeringsperioden. Hyppigere observationer kan være påkrævet afhængigt af dyrenes respons på eksponeringen. Hvis observation af dyrene hindres af fastspændingsslangere på dyrene, dårligt belyste helkropsskærme eller uigennemsigtige atmosfærer, observeres dyrene omhyggeligt efter eksponering. Observationer inden næste dags eksponering kan omfatte vurdering af reversibilitet eller forværring af toksiske virkninger.
32. Alle observationer registreres, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.
33. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønstre. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, krampes, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleksi-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab. Forsøgsprotokollen kan omfatte yderligere vurderinger, f.eks. kinetik, bioovervågning, lungefunktion, retention af tungtopløselige stoffer, der akkumuleres i lungevæv, og adfærdsskiftninger.

KROPSVÆGT

34. Det enkelte dyrs vægt registreres kort før den første eksponering (dag 0) og derefter to gange om ugen (f.eks. hver fredag og mandag for at påvise restitution i løbet af en eksponeringsfri weekend eller med et tidsinterval, der gør det muligt at vurdere systemisk toksicitet), og på døds- eller aflivningstidspunktet. Hvis der ikke er nogen virkninger i de første to uger, måles kropsvægten ugentligt i resten af forsøgsperioden. Hvis der anvendes satellitdyr (reversibilitet), vejes de ugentligt i hele restitutionperioden. Ved forsøgets afslutning vejes alle dyr umiddelbart inden aflivning med henblik på at beregne forholdet mellem organ- og kropsvægt uden bias.

INDTAGELSE AF FØDE OG VAND

35. Foderindtagelse måles ugentligt. Vandindtagelse kan også måles.

KLINISK PATOLOGI

36. Klinisk patologisk vurdering foretages for alle dyr, herunder kontrol- og satellitdyr (reversibilitet), når de aflives. Tidsintervallet med den sidste eksponering og blodtapning registreres, navnlig når den undersøgte effektparameter hurtigt rekonstitueres. Prøvetagning efter eksponering er indiceret for parametre med en kort plasmahalveringstid (f.eks. COHb, CHE og MetHb).
37. I tabel 1 vises de kliniske patologiske parametre, der generelt kræves i forbindelse med alle toksikologiforsøg. Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indikeres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Forsøgslederen kan vælge at undersøge yderligere parametre med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliet toksicitet (f.eks. cholinesterase, lipider, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin eller Heinz-legemer, kreatinkinase, myeloid/erythroid-forhold, troponiner, arterielle blodgasser, lactat-dehydrogenase, sorbitol-dehydrogenase, glutamat-dehydrogenase og γ -glutamyltranspeptidase).

Tabel 1

Standardparametre for klinisk patologi

Hematologisk undersøgelse	
Erythrocyttælling	Leukocyttal
Hematokrit	Differentialtælling
Hæmoglobinkoncentration	Trombocyttal
Middelcellehæmoglobin	Koaguleringssevne (vælg én):
Middelcellevolumen	— protrombintid
Middelcellehæmoglobinkoncentration	— koaguleringsstid
Retikulocyttælling	— partiel tromboplastintid

Klinisk-kemisk undersøgelse	
Glukose (*)	Alanin-aminotransferase
Total kolesterol	Aspartat-aminotransferase
Triglycerider	Alkalisk fosfatase
BUN	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Protein	Fosfor
Albumin	Chlorid
Globulin	
Urinalyse (valgfri)	
Udseende (farve og turbiditet)	Total protein
Volumen	Glukose
Specifik vægtylde eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	
(*) Da en langvarig fasteperiode kan medføre bias i glukosemålinger hos de behandlede dyr i forhold til kontroldyrene, afgør forsøgslederen, om det er hensigtsmæssigt, at dyrene faster. Hvis en fasteperiode anvendes, bør den være tilpasset den anvendte art. For rotter kan den være 16 timer (natten over). Bestemmelse af fasteglukose kan foretages efter faste natten over i løbet af den sidste eksponeringsuge eller efter faste natten over inden obduktion (i sidstnævnte tilfælde sammen med alle de øvrige kliniske patologiske parametre).	

38. Når der er bevis for, at de nedre luftveje (dvs. alveolerne) er det primære afsætnings- og retentionssted, kan bronchieskylning (BAL) anvendes til kvantitativt at analysere hypotesebaserede parametre for dosis/virkning med fokus på alveolitis, lungebetændelse og fosfolipidose. Det gør det muligt at undersøge forandringer i dosis/respons og tidsforløb i forbindelse med alveoleskader. BAL-væsken kan analyseres for total og differentieret leukocytal, total protein og lactat-dehydrogenase. Andre parametre, der kan overvejes, er parametre, der indikerer lysosomale skader, fosfolipidose, fibrose og irritationsinflammation eller allergisk inflammation, som kan omfatte bestemmelse af pro-inflammatoriske cytokiner/kemokiner. BAL-målinger supplerer generelt resultaterne af histopatologiske undersøgelser, men kan ikke erstatte dem. Vejledning i udførelse af lungeskylning findes i GD 39 (2).

MAKROSKOPISKE PATOLOGISKE FORANDRINGER OG ORGANVÆGT

39. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes komplet exsanguination (hvis muligt) og makroskopisk obduktion. Tidsrummet mellem afslutningen på hvert dyrs sidste eksponering og dets aflivning registreres. Hvis obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.
40. I tabel 2 vises de organer og væv, der skal præserveres i et passende medium under makroskopisk obduktion med henblik på mulig histopatologisk undersøgelse. Forsøgslederen afgør, om organer og væv i [kantet parentes] og andre organer og væv skal præserveres. Organer i **fed** trimmes og vejes i våd tilstand så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Skjoldbruskkirtel og bitestikler bør kun vejes, hvis artefakter fra trimming kan hindre histopatologisk evaluering. Væv og organer fikseres i 10 % bufret formalin eller et andet egnet fikseringsmiddel, straks obduktion er udført, men højst 24-48 timer inden trimming afhængigt af det anvendte fikseringsmiddel.

Tabel 2

Organer og væv, der præserves under makroskopisk obduktion

Binyrer	Vesiculæ seminales
Knoglemarv (og/eller nyligt aspirat)	Rygmarv (cervikal, midt-torakal og lumbal)
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Milt
[Øjne (retina, synsnerve) og øjenlåg]	Mavesæk
Hjerte	Testikler
Nyrer	Brisler
Larynx (3 niveauer, 1 niveau, som omfatter basis af strubelåget)	Skjoldbruskkirtlen
Lever	Spiserør (mindst 2 niveauer, herunder 1 længdesnit gennem carina og 1 tværsnit)
Lunge (alle lungelapper på et niveau, herunder hovedbronchier)	[Urinblære]
Lymfeknuder fra lungens hilum, navnlig ved tungtopløselige testkemikalier. Ved mere detaljerede undersøgelser og/eller forsøg med immunologisk fokus kan yderligere lymfeknuder overvejes, f.eks. lymfeknuder fra de mediastinale, cervikale/submandibulære og/eller aurikulære områder.	Uterus
Nasopharyngeale væv (mindst niveauer; 1 niveau for at medtage nasopharyngeal kanalen og NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue))	Alle større læsioner
Øsofagus	
[Bulbus olfactorius]	
Æggestokke	

41. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fikseringsmiddel ved et tryk på 20-30 cm vand for at sikre, at lungestrukturen bevares (5). Snit udtages for alle lapper på et niveau, herunder hovedbronchier, men hvis der udføres lungeskylning, udtages en ikkeskyllet lap på tre niveauer (ikke serielle snit).
42. Mindst fire niveauer af nasopharyngealt væv undersøges, hvoraf det ene omfatter nasopharyngeal-kanalen (5, 6, 7, 8, 9), så der kan udføres en tilstrækkelig undersøgelse af pladeepitel, transitionelt epitel (respiratorisk uden cilier), respiratorisk epitel (respiratorisk med cilier) og lugteepitel samt drænende lymfevæv (NALT; 10, 11). Tre niveauer af larynx undersøges, og et af disse niveauer skal omfatte basis af strubelåget (12). Mindst to niveauer af luftrøret undersøges, herunder et længdesnit gennem carina i bifurkationen af de ekstrapulmonal bronchier og et tværsnit.

HISTOPATOLOGI

43. Der foretages en histopatologisk evaluering af alle organer og væv, der er anført i tabel 2, for kontrolgruppen og gruppen med den højeste koncentration og for alle dyr, der dør eller aflives under forsøget. Særligt luftvejene, målorganerne og større læsioner skal undersøges. Organer og væv med læsioner i gruppen med den højeste koncentration undersøges i alle grupper. Forsøgslederen kan vælge at udføre histopatologiske evalueringer for yderligere grupper for at påvise et klart forhold mellem koncentration og respons. Hvis der anvendes en satellitgruppe (reversibilitet), skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk evaluering af væv og organer, hvor der var vist ændringer i behandlingsgruppen. Hvis der er usædvanligt mange dyr, der dør tidligt, eller andre problemer i højkonsponeringsgruppen, som kompromitterer signifikansen af data, foretages en histopatologisk undersøgelse af den næste lavere koncentration. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

DATA OG RAPPORTERING

Data

44. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt, foderindtagelse, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvægt og histopatologi. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund. Alle kvantitative og uventede resultater evalueres ved hjælp af en passende statistisk metode. Enhver generelt accepteret statistisk metode kan anvendes, og de statistiske metoder skal vælges under planlægningen af forsøget.

Testrapport

45. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

- beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder
- anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte kildedata og historiske data, hvis de vedrører dyr, der er eksponeret under lignende eksponerings-, bur- og fasteforhold
- dyrenes antal, alder og køn
- randomiseringsmetode
- beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

Testkemikalie

- fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)
- identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

- begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand
- historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

- detaljeret beskrivelse af inhalationskammeret, herunder rumfang og et diagram
- oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære
- apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration
- luftkilde og konditioneringssystem
- metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære
- trykforskel (positiv eller negativ)
- eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

- testatmosfærens stabilitet
- placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer
- behandling af tilført/udledt luft
- luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)
- tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})
- antal volumenændringer pr. time
- evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata:

- begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget
- nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)
- faktiske koncentrationer af testkemikaliets indsamlet fra dyrenes vejtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat
- alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m³ osv.) i stedet for volumenenheder (ppm, ppb osv.)
- partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

Testbetingelser

- nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliets
- en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren
- nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til overvågning af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer (dvs. fastlæggelse af en kalibreringskurve)
- nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til at udtage prøver til bestemmelse af koncentration og partikelstørrelsesfordeling i kammer
- nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliets fra prøvematerialet)
- randomiseringsmetode til tildeling af dyr til test- og kontrolgrupper
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)
- begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

- opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer
- opstilling i tabelform af data om nominal og faktisk koncentration i kammer

- opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g
- opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)
- opstilling i tabelform af de enkelte dyrs vægt
- opstilling i tabelform af foderindtagelse
- opstilling i tabelform af kliniske patologiske data
- for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund
- opstilling i tabelform af eventuelle andre målte parametre.

Diskussion og fortolkning af resultater

- Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekonzentrationen eller partikelstørrelsen.
- Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes.
- Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.
- Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.
- Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).
- Målorganet (-organerne) identificeres.
- NOAEL og LOAEL bestemmes.

LITTERATUR:

- (1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No. 412, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229-258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

-
- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. I: Waalkes MP og Ward JM (eds) Carcinogenesis. TARGET Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.»

5) Kapitel B.29 og B.30 affattes således:

»B.29. SUBKRONISK TOKSICITET (INHALATION): 90-DAGES FORSØG

RESUMÉ

Denne reviderede testmetode B.29 har til formål at tilvejebringe en fuld karakterisering af testkemikaliet toksicitet ved inhalation i en subkronisk varighed (90 dage) og at fremskaffe robuste data til kvantitative inhalationsrisikovurderinger. Grupper bestående af 10 hangnavere og 10 hungnavere eksponeres i seks timer om dagen i 90 dage (13 uger) for a) testkemikaliet ved tre eller flere koncentrationsniveauer, b) filtreret luft (negativ kontrol) og/eller c) vehiklet (vehiklkontrol). Dyr eksponeres generelt fem dage om ugen, men eksponering i syv dage om ugen tillades også. Hanner og hunner testes altid, men de eksponeres muligvis ved forskellige koncentrationsniveauer, hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie. Denne metode giver forsøgslederen fleksibilitet til at medtage satellitgrupper (reversibilitet), aflivninger under forsøget, bronchieskylning (BAL), neurologiske test og yderligere kliniske patologiske og histopatologiske evalueringer med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliet toksicitet.

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 413 (2009). Den oprindelige Test Guideline 413 (TG 413) for subkronisk toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 (1). Denne testmetode B.29 (som svarer til den reviderede TG 413) er blevet opdateret, så den afspejler det videnskabelige niveau og for at opfylde nuværende og fremtidige lovgivningskrav.
2. Forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation bruges primært til at fastlægge lovgivningsmæssige koncentrationer med henblik på at vurdere risici for arbejdstagere på arbejdspladsen. De bruges også til at vurdere risikoen for mennesker i boliger, ved transport og miljøet. Denne metode gør det muligt at karakterisere negative virkninger efter gentagen daglig inhalationseksponering for et testkemikalie i 90 dage (ca. 10 % af en rottes levetid). Data, der udledes af forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation, kan bruges til kvantitative risikovurderinger og til udvælgelse af koncentrationer til kroniske forsøg. Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af nanomaterialer. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document 39 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliet bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Informationer, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige testkoncentrationer, omfatter testkemikaliet identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Hvis neurotoksicitet forventes eller observeres i løbet af forsøget, kan forsøgslederen vælge at inkludere relevante evalueringer, som f.eks. FOB (Functional Observational Battery) og måling af motorisk aktivitet. Selv om tidspunkterne for eksponering kan være afgørende i forhold til de specifikke undersøgelser, må gennemførelsen af disse ekstra aktiviteter ikke påvirke det grundlæggende forsøgsdesign.
4. Fortyndinger af ætsende eller irriterende testkemikalier kan testes ved koncentrationer, der giver den ønskede toksicitetsgrad. Se GD 39 (2) for yderligere oplysninger. Når dyr eksponeres for sådanne materialer, bør målkoncentrationerne være så lave, at de ikke medfører udtalt smerte og lidelse, men de bør alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i det enkelte tilfælde, fortrinsvis på grundlag af målrettede dosisbestemmende forsøg (»range finding«), der giver information om den kritiske effektparameter, irritationstærskel og tidspunkt for indtræden (se afsnit 11-13). Der gives en begrundelse for valget af koncentration.
5. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humanitært. Dyr, som er døende, betragtes på samme måde som dyr, der dør i løbet af forsøget. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (3).

BESKRIVELSE AF METODEN**Valg af dyreart**

6. Der anvendes raske unge gnavere af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes andre dyrearter.

Forberedelse af dyrene

7. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På randomiseringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem syv og ni uger gamle. Deres kropsvægt bør være inden for $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for hvert køn. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets start, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

Dyreopdræt og -sundhed

8. Dyrene identificeres individuelt med subkutane transpondere, hvis det er muligt, for at lette observationer og undgå forvirring. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnenes fastspændingsslang. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødigt fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænnning til fastspændingsslangene ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

Inhalationskamre

9. Karakteren af testkemikaliets og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

TOKSICITETSFORSØG**Grænsekonzentrationer**

10. I modsætning til forsøg med akut toksicitet er der ingen definerede grænsekonzentrationer i forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation. Den testede maksimumskonzentration baseres på: 1) den højest opnåelige koncentration, 2) »worst case« eksponeringsniveau for mennesker, 3) behovet for at sikre tilstrækkelig iltforsyning og/eller 4) hensyn til dyrevelfærd. Hvis der ikke foreligger databaserede grænser, kan de akutte grænser i forordning (EF) nr. 1272/2008 (13) anvendes (dvs. op til en maksimumskonzentration på 5 mg/l for aerosoler, 20 mg/l for dampe og 20 000 ppm for gasser); se GD 39 (2). Det gives en begrundelse, hvis det er nødvendigt at overskride disse grænser ved test af gasser eller meget flygtige testkemikalier (f.eks. kølemidler). Grænsekonzentrationen bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødigt stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

Dosisbestemmende forsøg

11. Inden hovedforsøget påbegyndes, er det oftest nødvendigt at udføre et dosisbestemmende forsøg (»range finding«). Et dosisbestemmende forsøg er mere omfattende end et forforsøg, fordi det ikke er begrænset til valg af koncentration. Viden, der opnås fra et dosisbestemmende forsøg, kan resultere i et vellykket hovedforsøg. Et dosisbestemmende forsøg kan f.eks. fremskaffe teknisk information om analysemetoder, partikelstørrelsesfordeling, opdagelse af toksiske mekanismer, klinisk patologi og histopatologiske data samt estimeringer af de mulige NOAEL- og MTC-konzentrationer i et hovedforsøg. Forsøgslederen kan vælge at bruge det dosisbestemmende forsøg til at identificere tærsklen for irritation af luftvejene (f.eks. ved hjælp af histopatologisk undersøgelse af luftvejene, lungefunktionstest eller bronchieskylning), den øvre koncentration, der tåles uden unødigt belastning af dyrene, og de parametre, der bedst karakteriserer et testkemikalies toksicitet.

12. Et dosisbestemmende forsøg kan omfatte et eller flere koncentrationsniveauer. Afhængigt af de valgte effektparametre eksponeres 3-6 hanner og 3-6 hunner ved hvert koncentrationsniveau. Et dosisbestemmende forsøg bør vare mindst fem dage og generelt højst 28 dage. En begrundelse for valget af koncentrationer til hovedforsøget gives i forsøgsrapporten. Formålet med hovedforsøget er at påvise et forhold mellem koncentration-respons med udgangspunkt i det, der forventes at være den mest sensitive effektparameter. Den laveste koncentration bør ideelt være en NOAEL-koncentration, mens den højeste koncentration bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødigt stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).
13. Når koncentrationerne vælges til det dosisbestemmende forsøg, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder data om forholdet mellem struktur og aktivitet og data vedrørende lignende kemikalier (se afsnit 3). Et dosisbestemmende forsøg kan bekræfte/afvise, hvad der betragtes som de mest sensitive mekanistisk baserede effektparametre, f.eks. organofosfateres hæmning af kolinesterasen, erythrocytotoksiske stoffers dannelse af methæmoglobin, thyreoideahormoner (T_3 , T_4) for thyreotoksikanter, protein, eller neutrofiler i bronchieskylning for uskadelige svært opløselige partikler eller lungeirriterende aerosoler.

Hovedforsøg

14. Hovedforsøget vedrørende subkronisk toksicitet omfatter generelt tre koncentrationsniveauer og også en samtidig negativ kontrolgruppe (luft) og/eller vehikelgruppe, hvis det er nødvendigt (se afsnit 18). Alle tilgængelige data bør anvendes som hjælp til at vælge hensigtsmæssige eksponeringsniveauer, herunder resultaterne af systemiske toksicitetsforsøg, metabolisme og kinetik (der bør lægges særlig vægt på at undgå høje koncentrationsniveauer, der mætter kinetiske processeer). Hver testgruppe består af 10 hanngavere og 10 hunngavere, der eksponeres for testkemikaliets i seks timer om dagen i fem dage om ugen i en periode på 13 uger (samlet eksponeringsvarighed på mindst 90 dage). Dyr kan også eksponeres i syv dage om ugen (f.eks. ved test af inhalerede lægemidler). Hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie, kan kønnene eksponeres ved forskellige koncentrationsniveauer for at observere forholdet mellem koncentration-respons som beskrevet i afsnit 15. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end 6 timer/dag, eller når det er nødvendigt at gennemføre et forsøg med langvarig helkropseksponering (f.eks. 22 timer/dag) [se GD 39 (2)]. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden, medmindre eksponeringen varer længere end seks timer. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.
15. De valgte målkoncentrationer bør identificere målorganet (-organerne) og påvise et klart forhold mellem koncentration og respons:
- Det højeste koncentrationsniveau bør medføre toksiske virkninger, men ikke medføre langvarige symptomer eller letalitet, som kan forhindre en meningsfuld evaluering.
 - De mellemste koncentrationsniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes graduerede toksiske effekter mellem effekterne ved den laveste og den højeste koncentration.
 - Det laveste koncentrationsniveau bør kun have ringe eller ingen toksisk virkning.

Aflivninger under forsøget

16. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør antallet af dyr på hvert eksponeringsniveau forøges med det antal dyr, der aflives, inden forsøget afsluttes. Der gives en begrundelse for aflivning under forsøget, og der redegøres for aflivningerne i statistiske analyser.

Satellitforsøg (reversibilitetsforsøg)

17. Et satellitforsøg (reversibilitetsforsøg) kan bruges til at observere reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Satellitgrupper består af 10 hanner og 10 hunner, der eksponeres samtidig med forsøgsdyrene i hovedforsøget. Satellitforsøgsgrupper bør eksponeres for testkemikaliets ved det højeste koncentrationsniveau, og der bør efter behov være samtidige luft- og/eller vehikelkontrolgrupper (se afsnit 18).

Kontrol dyr

18. Dyr i den samtidige negative (luft)kontrolgruppe bør behandles på samme måde som forsøgsdyrene, bortset fra at de eksponeres for filtreret luft i stedet for testkemikaliets. Hvis vand eller et andet stof bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe inkluderes i forsøget i stedet for en negativ (luft)kontrolgruppe. Vand bør så vidt muligt anvendes som vehikel. Når vand bruges som vehikel, eksponeres kontrol dyrene for luft med samme fugtighed som de eksponerede grupper. Valget af et hensigtsmæssigt vehikel baseres på et korrekt

gennemført forforsøg eller historiske data. Hvis et vehikels toksicitet ikke er velkendt, kan forsøgslederen vælge at bruge en negativ (luft)kontrol og en vehikelkontrol, men det frarådes på det kraftigste. Hvis historiske data viser, at vehiklet er ikke-toksisk, er der ikke behov for en negativ (luft)kontrolgruppe, og der anvendes kun en vehikelkontrol. Hvis et forforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration, og at denne vehikelkontrol bør anvendes.

EKSPONERINGSBETINGELSER

Administration af koncentrationer

19. Dyr eksponeres for testkemikallet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliet fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikallet. Hygroscopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer. Partikelformige materialer kan underkastes mekaniske processer for at reducere partikelstørrelsen. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

Partikelstørrelsesfordeling

20. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 3 µm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (4). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalløg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler og fibre kan overstige den.

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

21. Ideelt testes testkemikallet uden et vehikel. Hvis det er nødvendigt at bruge et vehikel til at frembringe en passende koncentration og partikelstørrelse af testkemikallet, bør der fortrinsvis anvendes vand. Når et testkemikalie er opløst i et vehikel, skal dets stabilitet påvises.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

Luftgennemstrømning i kammer

22. Luftgennemstrømningen gennem eksponeringskammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Realtidsovervågning af koncentrationen (eller den tidsmæssige stabilitet) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for inhalation. Hvis koncentrationen overvåges i realtid, kan frekvensen for måling af luftgennemstrømning reduceres til én måling pr. eksponering pr. dag. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås. Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at denne standard ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles. Hvis målinger på den første eksponeringsdag viser, at disse gasser er på passende niveauer, kræves der ikke yderligere målinger.

Kammerets temperatur og relative fugtighed

23. Kammerets temperatur skal være $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Den relative fugtighed i dyrenes vejtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres hver time under eksponering, hvis det er muligt. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliet indvirkning på testmetoden.

Testkemikalie: nominel koncentration

24. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem inhalationskammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

25. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikalien målt ved dyrenes vejtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliesspecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materials sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikalien (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode.
26. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikalien i hele forsøgets varighed, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikalien karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).
27. Eksponeringsatmosfæren skal være så konstant som praktisk muligt. Apparatur til realtidsovervågning, f.eks. et aerosolfotometer til måling af aerosoler eller en kulbrinteanalysator til dampe, kan bruges til at påvise eksponeringsbetingelsernes stabilitet. Den faktiske koncentration i kammeret måles mindst tre gange i løbet af hver eksponeringsdag for hvert eksponeringsniveau. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan én prøve pr. eksponeringsperiode accepteres. Ideelt udtages denne prøve over hele eksponeringsperioden. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end $\pm 10\%$ for gasser og dampe eller $\pm 20\%$ for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikalien genereres. Det omfatter den tid, der kræves for at opnå ækvilibrering af kammeret (t_{95}) og henfald. Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (2).
28. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe, og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af specialdrevne slutprodukter/-apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer. Der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikalien er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen som helhed og ikke kun for det aktive stof eller indikatorstoffet (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

29. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst ugentligt for hvert koncentrationsniveau ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse (APS). Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget.
30. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlings effektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises ved alle de koncentrationer, der testes i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage et forsøg.
31. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser.

OBSERVATIONER

32. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk før, under og efter eksponeringsperioden. Hyppigere observationer kan være påkrævet afhængigt af dyrenes respons på eksponeringen. Hvis observation af dyrene hindres af fastspændingsslangere på dyrene, dårligt belyste helkropsskærme eller uigennemsigtige atmosfære, observeres dyrene omhyggeligt efter eksponering. Observationer inden næste dags eksponering kan omfatte vurdering af reversibilitet eller forværring af toksiske virkninger.
33. Alle observationer registreres, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal død tidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.
34. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spyttflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleksi-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab. Forsøgsprotokollen kan omfatte yderligere vurderinger, f.eks. kinetik, bioovervågning, lungefunktion, retention af tungtopløselige stoffer, der akkumuleres i lungevæv, og adfærdssændringer.

KROPSVÆGT

35. Det enkelte dyrs vægt registreres kort før den første eksponering (dag 0) og derefter to gange om ugen (f.eks. hver fredag og mandag for at påvise restitution i løbet af en eksponeringsfri weekend eller med et tidsinterval, der gør det muligt at vurdere systemisk toksicitet), og på døds- eller aflivningstidspunktet. Hvis der ikke er nogen virkninger i de første fire uger, måles kropsvægten ugentligt i resten af forsøgsperioden. Hvis der anvendes satellitdyr (reversibilitet), vejes de ugentligt i hele restitutionperioden. Ved forsøgets afslutning vejes alle dyr umiddelbart inden aflivning med henblik på at beregne forholdet mellem organ- og kropsvægt uden bias.

INDTAGELSE AF FØDE OG VAND

36. Foderindtagelse måles ugentligt. Vandindtagelse kan også måles.

KLINISK PATOLOGI

37. Klinisk patologisk vurdering foretages for alle dyr, herunder kontrol- og satellitdyr (reversibilitet), når de aflives. Tidsintervallet med den sidste eksponering og blodtapning registreres, navnlig når den undersøgte effektparameter hurtigt rekonstitueres. Prøvetagning efter eksponering er indiceret for parametre med en kort plasmahalveringstid (f.eks. COHb, CHE og MetHb).
38. I tabel 1 vises de kliniske patologiske parametre, der generelt kræves i forbindelse med alle toksikologiforsøg. Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Forsøgslederen kan vælge at undersøge yderligere parametre med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliet toksicitet (f.eks. cholinesterase, lipider, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin eller Heinz-legemer, kreatinkinase, myeloid/erythroid-forhold, troponiner, arterielle blodgasser, lactatdehydrogenase, sorbitaldehydrogenase, glutamatdehydrogenase og γ -glutamyltranspeptidase).

Tabel 1

Standardparametre for klinisk patologi

Hæmatologisk undersøgelse	
Erythrocyttælling	Leukocyttal
Hæmatokrit	Differentialtælling
Hæmoglobinkoncentration	Trombocyttal
Middelcellehæmoglobin	Koaguleringssevne (vælg én):
Middelcellevolumen	— protrombintid
Middelcellehæmoglobinkoncentration	— koaguleringsstid
Retikulocyttælling	— partiel tromboplastintid

Klinisk-kemisk undersøgelse	
Glukose (*)	Alanin-aminotransferase
Total kolesterol	Aspartat-aminotransferase
Triglycerider	Alkalisk fosfatase
BUN	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Total protein	Fosfor
Albumin	Chlorid
Globulin	
Urinalyse (valgfri)	
Udseende (farve og turbiditet)	Total protein
Volumen	Glukose
Specifik vægtfylde eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	
(*) Da en langvarig fasteperiode kan medføre bias i glukosemålinger hos de behandlede dyr i forhold til kontroldyrene, afgør forsøgslederen, om det er hensigtsmæssigt, at dyrene faster. Hvis en fasteperiode anvendes, bør den tilpasses den anvendte art. For rotter kan den være 16 timer (natten over). Bestemmelse af fasteglukose kan foretages efter faste natten over i løbet af den sidste eksponeringsuge eller efter faste natten over inden obduktion (i sidstnævnte tilfælde samme med alle de øvrige kliniske patologiske parametre).	

39. Når der er bevis for, at de nedre luftveje (dvs. alveolerne) er det primære afsætnings- og retentionssted, kan bronchieskylning (BAL) anvendes til kvantitativt at analysere hypotesebaserede parametre for dosis/virkning med fokus på alveolitis, lungebetændelse og fosfolipidose. Det gør det muligt at undersøge forandringer i dosis/respons og tidsforløb i forbindelse med alveoleskader. BAL-væsken kan analyseres for total og differentieret leukocytal, total protein og lactat-dehydrogenase. Andre parametre, der kan overvejes, er parametre, der indikerer lysosomale skader, fosfolipidose, fibrose og irritationsinflammation eller allergisk inflammation, som kan omfatte bestemmelse af pro-inflammatoriske cytokiner/kemokiner. BAL-målinger supplerer generelt resultaterne af histopatologiske undersøgelser, men kan ikke erstatte dem. Vejledning i udførelse af lungeskylling findes i GD 39 (2).

OFTALMOLOGISK UNDERSØGELSE

40. Ved hjælp af et oftalmoskop eller et tilsvarende instrument foretages oftalmologiske undersøgelser af fundus, refraktionsmedier, iris og conjunctivae for alle dyr inden administration af testkemikali og for kontrolgruppen og gruppen med den højeste højkonzentration ved forsøgsafslutning. Hvis der observeres forandringer i øjnene, undersøges alle dyr i de andre grupper, herunder satellitgruppen (reversibilitet).

MAKROSKOPISKE PATOLOGISKE FORANDRINGER OG ORGANVÆGT

41. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes komplet exsanguination (hvis muligt) og makroskopisk obduktion. Tidsrummet mellem afslutningen på hvert dyrs sidste eksponering og dets aflivning registreres. Hvis obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.
42. I tabel 2 vises de organer og væv, der skal præserveres i et passende medium under makroskopisk obduktion med henblik på mulig histopatologisk undersøgelse. Forsøgslederen afgør, om organer og væv i [kantet parentes] og andre organer og væv skal præserveres. Organer i **fed** trimmes og vejes i våd tilstand så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Skjoldbruskkirtel og bitestikler bør kun vejes, hvis artefakter fra trimming kan hindre histopatologisk evaluering. Væv og organer fikseres i 10 % bufret formalin eller et andet egnet fikseringsmiddel, straks obduktion er udført, men højst 24-48 timer inden trimming afhængigt af det anvendte fikseringsmiddel.

Tabel 2

Organer og væv, der præserves under makroskopisk obduktion

Binyrer	Øsofagus
Aorta	[Bulbus olfactorius]
Knoglemarv (og/eller nyligt aspirat)	Æggestokke
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Bugspytkirtler
Cæcum	Paratyreoideae
Tyktarm	Perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen
Duodenum	Hypofyse
[Bitestikler]	Prostata
[Øjne (retina, synsnerve) og øjenlåg]	Rectum
Femur og knæled	Spytktirler
Galdeblære (hvis en sådan forefindes)	Vesiculæ seminales
[Harderian-kirtler]	Hud
Hjerte	Rygmarv (cervikal, midt-torakal og lumbal)
Ileum	Milt
Jejunum	Sternum
Nyrer	Mavesæk
[Tårekirtler (ekstraorbitale)]	Tænder
Larynx (3 niveauer, herunder basis af strubelåget)	Testikler
Lever	Brisler
Lunge (alle lungelapper på et niveau, herunder hovedbronchier)	Skjoldbruskkirtlen
Lymfeknuder fra lungens hilum, navnlig ved tungtop-løselige testkemikalier. Ved mere detaljerede undersøgelser og/eller forsøg med immunologisk fokus kan yderligere lymfeknuder overvejes, f.eks. lymfeknuder fra de mediastinale, cervikale/submandibulære og/eller aurikulære områder.	Tunge
Lymfeknuder (distale fra indgangssted)	Spiserør (mindst 2 niveauer, herunder 1 længdesnit gennem carina og 1 tværsnit)
Brystkirtler (hundyr)	[Ureter]
Muskel (lår)	[Urethra]
Nasopharyngeale væv (mindst 4 niveauer; 1 niveau for at medtage nasopharyngeal-kanalen og NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue))	[Urinblære]
	Uterus
	Målorganer
	Alle større læsioner og masser

43. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fikseringsmiddel ved et tryk på 20-30 cm vand for at sikre, at lungestrukturen bevares (5). Snit udtages for alle lapper på et niveau, herunder hovedbronchier, men hvis der udføres lungeskyllning, udtages en ikkeskylllet lap på tre niveauer (ikke serielle snit).

44. Mindst fire niveauer af nasopharyngealt væv undersøges, hvoraf det ene omfatter nasopharyngeal-kanalen (5) (6) (7) (8) (9), så der kan udføres en tilstrækkelig undersøgelse af pladeepitel, transitionelt epitel (respiratorisk uden cilier), respiratorisk epitel (respiratorisk med cilier) og lugteepitel samt drænende lymfevæv (NALT) (10) (11). Tre niveauer af larynx undersøges, og et af disse niveauer skal omfatte basis af strubelåget (12). Mindst to niveauer af luftrøret undersøges, herunder et længdesnit gennem carina i bifurkationen af de ekstrapulmonal bronchier og et tværsnit.

HISTOPATOLOGI

45. Der foretages en histopatologisk evaluering af alle organer og væv, der er anført i tabel 2, for kontrolgruppen og gruppen med den højeste højkoncentration og for alle dyr, der dør eller aflives under forsøget. Særligt luftvejene, målorganerne og større læsioner skal undersøges. Organer og væv med læsioner i gruppen med den højeste koncentration undersøges i alle grupper. Forsøgslederen kan vælge at udføre histopatologiske evalueringer for yderligere grupper for at påvise et klart forhold mellem koncentration og respons. Hvis der anvendes en satellitgruppe (reversibilitet), skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk evaluering af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i behandlingsgruppen. Hvis der er usædvanligt mange dyr, der dør tidligt, eller andre problemer i højkonsponeringsgruppen, som kompromitterer signifikansen af data, foretages en histopatologisk undersøgelse af den næste lavere koncentration. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

DATA OG RAPPORTERING

Data

46. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt, foderindtagelse, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvægt og histopatologi. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humane grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund. Alle kvantitative og tilfældige resultater evalueres ved hjælp af en passende statistisk metode. Enhver generelt accepteret statistisk metode kan anvendes, og de statistiske metoder skal vælges under planlægningen af forsøget.

Testrapport

47. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

- beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder
- anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte kildedata og historiske data, hvis de vedrører dyr, der er eksponeret under lignende eksponerings-, bur- og fasteforhold
- dyrenes antal, alder og køn
- randomiseringsmetode
- beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

Testkemikalie

- fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)
- identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

- begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand
- historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

- detaljeret beskrivelse af inhalationskammeret, herunder rumfang og et diagram
- oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære
- apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration
- luftkilde og konditioneringssystem
- metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære
- trykforskel (positiv eller negativ)
- eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)
- testatmosfærens stabilitet
- placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer
- behandling af tilført/udledt luft
- luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)
- tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})
- antal volumenændringer pr. time
- evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata

- begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget
- nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)
- faktiske koncentrationer af testkemikaliets indsamlet fra dyrenes vejtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat
- alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m³ osv.) i stedet for volumenenheder (ppm, ppb osv.)
- partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σ), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

Testbetingelser

- nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliets;
- en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren
- nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til overvågning af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer (dvs. fastlæggelse af en kalibreringskurve)
- nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til at udtage prøver til bestemmelse af koncentration og partikelstørrelsesfordeling i kammer
- nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliets fra prøvematerialet)

- randomiseringsmetode til tildeling af dyr til test- og kontrolgrupper
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)
- begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

- opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer
- opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer
- opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g
- opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)
- opstilling i tabelform af de enkelte dyrs vægt
- opstilling i tabelform af foderindtagelse
- opstilling i tabelform af kliniske patologiske data
- for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

Diskussion og fortolkning af resultater

- Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekonzentrationen eller partikelstørrelsen.
- Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes.
- Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.
- Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.
- Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).
- Målorganet (-organerne) identificeres.
- NOAEL og LOAEL bestemmes.

LITTERATUR:

- (1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No. 413, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan JE og Redden JC (1994). *Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies*. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

-
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229-258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.
- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. I: Waalkes MP og Ward JM (eds) Carcinogenesis. TARGET Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

B.30. FORSØG VEDRØRENDE KRONISK TOKSICITET

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 452 (2009). Den oprindelige TG 452 blev vedtaget i 1981. Denne reviderede testmetode B.30 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og myndighedsbestemmelser (1) (2) (3) (4). Denne testmetode B.30 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.32 i dette bilag (Karcinogenicitetsforsøg) og kapitel B.33 i dette bilag (Kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier.
2. De fleste forsøg vedrørende kronisk toksicitet gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnave, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnave (5), med de nødvendige ændringer som beskrevet i OECD Guidance Document No. 116 (6).
3. De tre primære administrationsveje i forsøg vedrørende kronisk toksicitet er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliet's fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikallet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).
4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i forsøg vedrørende kronisk toksicitet. Langvarige forsøg vedrørende kronisk toksicitet, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af kronisk toksicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af inhalation (6) (7) og dermal applikation (6). Kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (7) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (10) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.
5. Forsøget vedrørende kronisk toksicitet skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en betydelig del af de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikallet, peger på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL), som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.
6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:
 - identifikation af et testkemikalies kroniske toksicitet
 - identifikation af målorganer
 - karakterisering af forholdet mellem dosis og virkning
 - identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)
 - forudsigelse af kroniske toksicitetsvirkninger på niveauer for menneskelig eksponering
 - data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (6).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af de toksikologiske karakteristika for et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliet af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for kronisk toksicitet, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliet identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, informationer om virkningsmåde, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Bestemmelsen af kronisk toksicitet bør kun udføres, når indledende informationer om toksicitet er indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Det bør overvejes at benytte en faseindeltesttilgang til kroniske test som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (11) (12) (13) (14).
8. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (6) og Guidance Document No. 35 (15).
9. Når et forsøg vedrørende kronisk toksicitet gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (16), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis«.
10. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (6) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (17) (18). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant, hvis der gennemføres et kombineret forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) (afsnit 11).
11. Det bør overvejes at udføre et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (denne testmetode B.30) og et separat karcinogenicitetsforsøg (kapitel B.32 i dette bilag). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 9 og 20-25) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag), og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser.
12. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (6).

TESTENS PRINCIP

13. Testkemikaliet administreres dagligt i graduerede doser til flere grupper af forsøgsdyr, normalt i en periode på 12 måneder, men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene (se afsnit 33). Den valgte varighed skal være så lang, at virkninger af kumulativ toksicitet kan manifestere sig, uden at det konfunderer virkningerne af geriatriske forandringer. Afvigelse fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Testkemikaliet administreres normalt oralt, selv om test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. Forsøgsdesignet kan også omfatte en eller flere aflivninger i løbet af forsøget, f.eks. ved tre og seks måneder, og yderligere dyr kan inkluderes for at tage højde for dette (se afsnit 19). I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN**Valg af dyreart**

14. Denne testmetode omhandler primært vurdering og evaluering af kronisk toksicitet hos gnavere (se afsnit 2), selv om det anerkendes, at lignende forsøg på ikke-gnavere kan være påkrævet i medfør af lovgivningen. Valget af dyreart skal begrundes. Design og gennemførelse af forsøg vedrørende kronisk toksicitet på ikke-gnavere skal baseres på de principper, der er beskrevet i denne testmetode, og de principper, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (5). Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).
15. Den foretrukne art i denne testmetode er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Forsøget vedrørende kronisk toksicitet gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene af kortere varighed. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

Opbevaring og fodringsbetingelser

16. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forurenninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliets og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

Forberedelse af dyrene

17. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratiemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravænnings- og akklimatiserings-, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af de anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige $\pm$ 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREM GANGSMÅDE**Dyrenes antal og køn**

18. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der ved afslutningen af forsøget er tilstrækkeligt mange dyr i hver gruppe til at foretage en grundig biologisk og statistisk evaluering. Hvis der anvendes gnavere, skal der normalt anvendes mindst 20 dyr pr. køn pr. gruppe til hvert dosisniveau. Hvis der anvendes ikke-gnavere, anbefales mindst 4 dyr pr. køn pr. gruppe. I forsøg med mus skal der evt. bruges flere dyr i hver dosisgruppe til at udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser.

Reserve til aflivninger under forsøget, satellitgrupper og sentineldyr

19. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget (mindst 10 dyr/køn/gruppe), f.eks. ved 6 måneder, for at fremskaffe oplysninger om progression af toksikologiske virkninger og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliets, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. Satellitgrupper kan medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie. Disse begrænses normalt til det højeste dosisniveau i forsøget plus

kontrol. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk 5 dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (22). Hvis aflivninger eller inklusion af satellit- eller sentinelgrupper planlægges undervejs i forsøget, skal antallet af dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. Disse dyr underkastes de samme observationer, herunder kropsvægt og foder-/vandindtagelse, hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser som dyrene i hovedforsøgets kroniske toksicitetsfase, selv om der også kan medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet.

Dosisgrupper og dosering

20. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (6). Mindst tre dosisniveauer og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se afsnit 27). Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliets eller tilsvarende kemikalier.
21. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliets fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges normalt det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Under hensyntagen til de faktorer, der er anført i afsnit 22, vælges det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %).
22. Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en negativ virkning, som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt. Den højeste dosis bør ikke overstige 1 000 mg/kg kropsvægt/dag (grænsedosis, se afsnit 27).
23. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 25) på det laveste dosisniveau. Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes.
24. Det valgte dosisinterval afhænger af testkemikaliets karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.
25. Som yderligere beskrevet i Guidance Document No. 116 (6) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:
 - kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller infleksionspunkter i dosis-respons
 - toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer
 - præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning
 - vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoxicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøostatiske mekanismer belastes osv.
 - områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel
 - overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker.
26. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliets. Bortset fra behandling med testkemikaliets skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt dosisgrupperne. Hvis et testkemikalie administreres i foderet medfører væsentligt reduceret foderindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

27. Hvis det ud fra informationer fra forforsøg kan forventes, at en test, der gennemføres med et dosisniveau svarende til mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag og de fremgangsmåder, der er beskrevet for dette forsøg, næppe vil fremkalde negative virkninger, og hvis toksicitet ikke forventes ud fra kendskab til strukturelt beslægtede kemikalier, kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt. En grænse på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag er kun relevant, hvis human eksponering indikerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

Fremstilling af doser og administration af testkemikalie

28. Testkemikaliets indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (6). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliets. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliets typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.
29. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliets i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dets toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernærings-tilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).
30. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliets administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.
31. Ved oral administration gives testkemikaliets dagligt til dyrene (syv dage om ugen) normalt i en periode på 12 måneder (se også afsnit 33), men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene. Ethvert andet dosisregime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliets i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (10), i en periode på 12 måneder. Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 12 måneder. Hvis andre gnavere end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (8).
32. Hvis testkemikaliets indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Det maksimale væskevolumen, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumen skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnavere (22). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen bør undgås.
- #### **Forsøgets varighed**
33. Denne testmetode er primært designet som et 12-måneders forsøg vedrørende kronisk toksicitet, men forsøgsdesignet gør det også muligt at udføre forsøg med enten kortere (f.eks. 6 eller 9 måneder) eller længere (f.eks. 18 eller 24 måneder) varighed, afhængigt af de specifikke lovgivningskrav eller mekanistiske formål. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Satellitgrupper, der medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie, bevares uden dosering i en periode på mindst fire uger og højst en tredjedel af den samlede forsøgsvarighed efter ophør af eksponering. Yderligere oplysninger, herunder overvejelser om overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).

OBSERVATIONER

34. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Almindelig klinisk observation bør foretages mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift.
35. Detaljerede kliniske undersøgelser gennemføres af alle dyrene i hvert fald før første eksponering (for at tage højde for individuelle forskelle), ved slutningen af den første uge af forsøget og derefter en gang månedlig. Protokollen for undersøgelser tilrettelægges, således at variationer mellem individuelle undersøgere minimeres, og således at den er uafhængig af testgruppen. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i undersøgelsesbetingelserne er mindst mulige. Undersøgelserne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (24).
36. Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres på alle dyr inden første administration af testkemikaliets. Ved forsøgets afslutning foretages denne undersøgelse helst på alle dyr, men i det mindste på alle dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der opdages øjenforandringer, der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges. Hvis strukturel analyse eller andre informationer antyder øjentoksicitet, øges frekvensen af øjenundersøgelser.
37. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indikeret et neurotoksisk potentiale, kan reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (24) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (25), (26), (27), gribestyrke (28) og motorisk aktivitet (29) eventuelt vurderes inden påbegyndelsen af forsøget og derefter med tre måneders mellemrum, indtil der er gået 12 måneder, og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.
38. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indikeret et immunotoksisk potentiale, kan yderligere undersøgelser af denne effektparameter udføres ved forsøgsafslutning.

Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse

39. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliets administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver

40. I forsøg med gnavere foretages hæmatologisk undersøgelse af mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe ved 3, 6 og 12 måneder og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder), og de samme dyr anvendes i hele forsøget. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser (se afsnit 18). I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved 3 måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på hæmatologiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse.
41. Følgende parametre bør undersøges (30): total og differential leucocyttælling, erythrocyttælling, blodpladetælling, hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, middelcellevolumen (MCV), middelcellehæmoglobin (MCH), middelcellehæmoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid og aktiveret partiel tromboplastintid. Andre parametre for hæmatologi, som f.eks. Heinz-legemer eller andre atypiske parametre for erythrocytmorfologi eller methæmoglobin, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Generelt bør der benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af de observerede og/eller forventede virkninger af et givet testkemikalie. Hvis testkemikaliets har indvirkning på det hæmopoietiske system, kan retikulocytællinger og knoglemarvscytologi også være indikeret, selv om de ikke skal foretages rutinemæssigt.

42. Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe med samme tidsintervaller som de hæmatologiske undersøgelser og med anvendelse af de samme dyr i hele forsøget. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede klinisk kemiske målinger. I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. fire dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved 3 måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på klinisk-biokemiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Dyrene (dog ikke mus) bør faste inden blodprøvetagning. Følgende parametre bør undersøges (30): glukose, urea (urinstof), kreatinin, total protein, albumin, calcium, natrium, kalium, total kolesterol, mindst to relevante test med henblik på hepatocellulær evaluering (alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, glutamat-dehydrogenase og totale galdehyrer) (31) og mindst to relevante test med henblik på hepatobiliær evaluering (alkalisk fosfatase, gamma-glutamyl-transferase, 5'-nucleotidase, total bilirubin og totale galdehyrer) (31). Andre klinisk-kemiske parametre, som f.eks. fastende triglycerider, specielle hormoner og kolinesterase, kan måles afhængigt af testkemikaliet toksicitet. Der skal generelt benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af den observerede og/eller forventede virkning af et testkemikalie.
43. Urinanalyser udføres på mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe med samme tidsintervaller som de hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser. Målinger ved 3 måneder foretages ikke, hvis der ikke er konstateret virkninger på urinanalyse i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Følgende liste over parametre indgik i en ekspertanbefaling vedrørende kliniske patologiforsøg (30): udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, total protein og glukose. Andre parametre omfatter keton, urobilinogen, bilirubin og hæmaturi. Andre parametre kan inkluderes, hvis det er nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.
44. Der er generel enighed om, at hæmatologiske og klinisk-biokemiske baselinevariabler er nødvendige inden behandling i forbindelse med hundeforsøg, men de er ikke nødvendige i forsøg med gnavere (30). Hvis de historiske baselinedata (se afsnit 50) er utilstrækkelige, bør det overvejes at fremskaffe sådanne data.

Patologi

Makroskopisk obduktion

45. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniet, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Der kan dog også medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet (se afsnit 19). Disse dyr underkastes dog ikke obduktion og de fremgangsmåder, der er beskrevet i det følgende. Sentineldyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde.
46. Organvægte registreres for alle dyr, bortset fra dyr som er udelukket i medfør af sidste del af afsnit 45. Binyrer, hjerne, testikler, hjerte, nyrer, lever, ovarier, milt, testikler, skjoldbruskkirtel (vejret efter fiksering, med paratyreoidea) og uterus skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. I forsøg med mus er vejningen af binyrer valgfri.
47. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 32) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel
Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]

Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Luftrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculæ seminales	Urinblære
Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskul	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarv-saspirat
Harderian-kirtel			

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserves begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliet kendte virkninger, bør præserves. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer til præservation ved oral administration, præserves, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserves og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

Histopatologi

48. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (32). De histopatologiske undersøgelser skal som minimum omfatte:

- alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen
- alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget
- alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter
- målvæv eller væv, der udviser behandlingsrelaterede forandringer i højdosisgruppen, fra dyr i alle andre dosisgrupper
- i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserves begge organer.

DATA OG RAPPORTERING

Data

49. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

50. Historiske kontroldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontroldata, som evalueres, bør være indgivet fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme og være genereret inden for fem år forud for det aktuelle forsøg.
51. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 8). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

Testrapport

52. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber
- identifikationsdata
- testkemikaliets kilde
- batchnummer
- certifikat for kemisk analyse.

For eventuelt vehikel:

- begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

- anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse
- dyrenes antal, køn og alder ved forsøgets begyndelse
- herkomst, miljøbetingelser, kost osv.
- de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af administrationsvej og dosis
- de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant
- oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning
- analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen
- administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliets
- eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg
- faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform):

- data om overlevelse
- kropsvægt og ændringer i kropsvægt
- foderindtagelse, beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand, hvis muligt
- data vedrørende toksicitet sat over for køn og dosis, inklusive toksicitetstegnene
- art, incidens (og, hvis vurderet sværhedsgrad) og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)
- oftalmologisk undersøgelse
- hæmatologiske målinger
- klinisk-biokemiske målinger
- urinalyser
- resultat af undersøgelser af neurotoksicitet eller immunotoksicitet
- kropsvægt ved forsøgets afslutning
- organvægt (og deres forhold, hvis relevant)
- obduktionsfund
- en detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund
- data for absorption, hvis de forefindes.

Evt. statistisk behandling af resultaterne

Diskussioner af resultater, herunder:

- forhold mellem dosis og respons
- overvejelse af oplysninger om virkningsmåde
- diskussion af tilgange til modellering
- bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL
- historiske kontroldata
- relevans for mennesker.

Konklusioner

LITTERATUR:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

- (3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145-191.
- (4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.
- (5) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.
- (6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.
- (7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No.39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (8) Kapitel B.8 i dette bilag, Subakut toksicitet (inhalation), 28-dages forsøg.
- (9) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg.
- (10) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).
- (11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation.
- (17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

-
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment 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.
- (30) Weingand K, Brown G, Hall R et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) EMEA-dokument (udkast) »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (Dok. ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.»

6) Kapitel B.32 og B.33 affattes således:

»B.32. KARCINOGENICITETSFORSØG

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 451 (2009). Den oprindelige TG 451 vedrørende karcinogenicitetsforsøg blev vedtaget i 1981. Denne reviderede testmetode B.32 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og lovgivningskrav (2) (3) (4) (5) (6). Denne testmetode B.32 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.30 i dette bilag (Forsøg vedrørende kronisk toksicitet) og kapitel B.33 i dette bilag (Kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode B.32 er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier. Det skal dog bemærkes, at andre oplysninger og krav kan være gældende for lægemidler (se International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).
2. De fleste karcinogenicitetsforsøg gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere, med de nødvendige ændringer. Yderligere vejledning findes i OECD Guidance Document No. 116 (7)).
3. De tre primære administrationsveje i karcinogenicitetsforsøg er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliet's fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i Guidance Document No. 116 (7).
4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i karcinogenicitetsforsøg. Karcinogenicitetsforsøg, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af karcinogenicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af dermal applikation (7) og inhalation (7) (8). Kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (8) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (11) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.
5. Karcinogenicitetsforsøget skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en periode, der kan være de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, herunder potentiel karcinogenicitet, og kan pege på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL) og, i tilfælde af ikke-genotoksiske karcinogener, af tumorrespons, som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.
6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:
 - identifikation af et testkemikalies karcinogene egenskaber, der fører til en øget incidens af neoplasmer, øget andel af ondartede neoplasmer eller en reduktion i tiden til forekomsten af neoplasmer sammenlignet med samtidige kontrolgrupper
 - identifikation af målorganer for karcinogenicitet
 - identifikation af tid til fremkomst af neoplasmer

- karakterisering af forholdet mellem dosis-respons og tumor
- identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)
- ekstrapolering af karcinogene virkninger til eksponeringsniveauer for mennesker ved lav dosis
- data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af den potentielle karcinogenicitet af et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliets af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for karcinogenicitet, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Information om og overvejelse af virkningsmåden for et mistænkt karcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) er særlig vigtig, fordi det optimale design kan variere, afhængigt af om testkemikaliets er et kendt eller mistænkt genotoksisk karcinogen. Yderligere vejledning om overvejelser vedrørende virkningsmåde findes i Guidance Document No. 116 (7).
8. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, herunder genotoksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data, data om mutagenicitet/genotoksicitet og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Vurderingen af karcinogenicitet bør udføres, når indledende informationer om toksicitet er indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Kortvarige test med cancerinitiering/-fremme kan også give nyttige oplysninger. Det bør overvejes at benytte en faseindeltest tilgang til karcinogenicitetstest som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (16) (17) (18) (19).
9. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse, analyse af kumulative tumorrisici i forhold til overlevelsesvarighed, analyse af tid til tumor og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (7) og Guidance Document No. 35 (20).
10. Når et karcinogenicitetsforsøg gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (21), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttet at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis«.
11. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (7) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (22) (23). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant, hvis der gennemføres et kombineret forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) (afsnit 12).
12. Det bør overvejes at udføre et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag) og et separat karcinogenicitetsforsøg (denne testmetode B.32). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 11 og 22-25) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag), og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser.

13. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (7).

TESTENS PRINCIP

14. Testkemikalien administreres normalt oralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr i størstedelen af deres levetid. Test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. Dyrene observeres nøje for tegn på toksicitet og for udvikling af neoplastiske læsioner. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

15. Denne testmetode omfatter primært vurdering og evaluering af karcinogenicitet hos gnavere (afsnit 2). Brugen af ikke-gnavere kan overvejes, hvis de tilgængelige data viser, at de er mere relevante for forudsigelsen af sundhedsvirkningerne hos mennesker. Valget af dyreart skal begrundes. Den foretrukne gnaverart er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Selv om anvendelsen af mus i karcinogenicitetstest oftest er af begrænset nytte (24) (25) (26), kræves forsøg på mus stadig i henhold til visse lovgivningsbestemmelser, medmindre det påvises, at et sådant forsøg ikke er videnskabeligt nødvendigt. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

16. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Karcinogenicitetsforsøget bør gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene af kortere varighed. Hvis det vides, at dyr af denne stamme og herkomst giver problemer med at opfylde de accepterede kriterier for overlevelse i langvarige forsøg [se Guidance Document No. 116 (7)], bør det overvejes at bruge en stamme, der har en acceptabel overlevelseshæftersfrekvens, til det langvarige forsøg. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

Opbevaring og fodring

17. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet (27) (28) (29). Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forurenninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikalien og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

Forberedelse af dyrene

18. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravæning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af det anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige $\pm$ 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

19. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der kan foretages en grundig biologisk og statistisk evaluering. Hver dosisgruppe og samtidig kontrolgruppe skal derfor bestå af mindst 50 dyr af hvert køn. Afhængigt af formålet med forsøget kan den statistiske styrke af nøgleestimer forøges ved differentielt og ulige at tildele dyr til de forskellige dosisgrupper, idet der tildeles mere end 50 dyr til lavdosisgrupperne, f.eks. for at skønnet karcinogene potentiale ved lave doser. Det skal dog anerkendes, at en moderat forøgelse af gruppestørrelsen kun vil give en forholdsvis lille forøgelse af forsøgets statistiske styrke. Yderligere oplysninger om forsøgets statistiske design og valg af dosisniveauer med henblik på at maksimere den statistiske styrke findes i Guidance Document No. 116 (7).

Reserve til aflivninger under forsøget og satellitgrupper (sentineldyr)

20. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget, f.eks. ved 12 måneder, for at fremskaffe oplysninger om progression af neoplastiske forandringer og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliet, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. Hvis aflivninger under forsøget indgår i forsøgsdesignet, skal antallet af dyr i hver dosisgruppe, som planlægges aflivet under forsøget, normalt være 10 dyr pr. køn, og det samlede antal dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk 5 dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (30). Nærmere detaljer findes i Guidance Document No. 116 (7).

Dosisgrupper og dosering

21. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (7). Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe. Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende kemikalier.
22. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliet fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Under hensyntagen til de faktorer, der er anført i afsnit 23, vælges normalt det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %). Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en *negativ virkning*, som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt.
23. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og, afhængigt af testkemikaliet virkningsmåde, en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 25) på det laveste dosisniveau. Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes.
24. Det valgte dosisinterval afhænger af testkemikaliet karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.
25. Som beskrevet i Guidance Document No. 116 (7) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:
- kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller infleksionspunkter i dosis-respons
 - toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer
 - præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning
 - vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoxicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøostatiske mekanismer belastes osv.

— områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel

— overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker.

26. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliets. Bortset fra behandling med testkemikaliets skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt dosisgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret fødeindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

Fremstilling af doser og administration af testkemikalie

27. Testkemikaliets indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (7). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliets. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliets typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.
28. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliets i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dets toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernærings-tilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).
29. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliets administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.
30. Ved oral administration gives testkemikaliets dagligt til dyrene (7 dage om ugen) normalt i en periode på 24 måneder (se også afsnit 32). Ethvert andet dosisregime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliets i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (11), i en periode på 24 måneder. Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 24 måneder. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (9).
31. Hvis testkemikaliets indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumen skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnave (31). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen bør undgås.

Forsøgets varighed

32. Varigheden af forsøget er normalt 24 måneder for gnavere, dvs. størstedelen af de anvendte dyrs levetid. Der kan anvendes kortere eller længere forsøgsvarigheder afhængigt af levetiden for den stamme af dyr, der anvendes i forsøget, men varigheden skal begrundes. For bestemte stammer af mus, f.eks. AKR/J, C3H/J eller C57BL/6J, kan en varighed på 18 måneder være mere hensigtsmæssig. I det følgende gives der oplysninger om forsøgsvarighed, afbrydelse af forsøget og overlevelse. Yderligere vejledning, herunder overvejelse af, om negativ karcinogenicitet kan accepteres i forhold til overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

- Afbrydelse af forsøget skal overvejes, når antallet af overlevende i de laveste dosisgrupper eller kontrolgrupper falder til under 25 %.
- Hvis kun gruppen med den højeste dosis dør før tiden på grund af toksicitet, bør det ikke medføre afbrydelse af forsøget.
- Overlevelse vurderes separat for hvert køn.
- Forsøget bør ikke forlænges ud over det punkt, hvor dataene fra forsøget ikke længere er tilstrækkelige til at understøtte en statistisk gyldig evaluering.

OBSERVATIONER

33. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Dyrene kontrolleres desuden en gang om dagen for specifikke tegn af toksikologisk relevans, idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift. Særlig opmærksomhed rettes mod udviklingen af tumorer, og på tidspunktet for den første tumordannelse registreres lokalisering, dimensioner, fremtræden og progression af hver makroskopisk synlig eller palpabel tumor.

Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse

34. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliets administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøget, hvor drikkeaktiviteten ændres.

Hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser

35. For at udlede flest mulige informationer fra forsøget, især med hensyn til virkningsmåde, kan blodprøver efter forsøgslederens vurdering udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser. Urinanalyse kan også være relevant. Yderligere vejledning om fordelene ved at udtage sådanne prøver i forbindelse med karcinogenicitetsforsøg findes i Guidance Document No. 116 (7). Hvis det vurderes at være relevant, kan blodprøver udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser udtagning og urinanalyse som en del af aflivningen under forsøget (afsnit 20) og ved forsøgsafslutning på mindst 10 dyr pr. køn pr. gruppe. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse og opbevares under hensigtsmæssige forhold. Blodsmears kan også forberedes til undersøgelse, navnlig hvis knoglemarv tilsyneladende er målorganet, selv om der ikke er enighed om værdien af en sådan undersøgelse i forbindelse med vurderingen af karcinogen/onkogen potentiale (32).

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

36. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal med undtagelse af sentineldyr (se afsnit 20) og andre satellitdyr have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger samt kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Sentineldyr og andre satellitdyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde. Organvægt indgår normalt ikke i karcinogenicitetsforsøg, da geriatriske forandringer og i senere faser udviklingen af tumorer konfunderer anvendeligheden af data om organvægt. Organvægt kan dog være vigtig til at udføre en weight of evidence-evaluering og overvejelser vedrørende virkningsmåde. Hvis organvægt indgår i et satellitforsøg, registreres værdierne senest et år efter forsøgsstart.

37. Følgende væv skal præserves ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 33) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel
Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]
Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Lufttrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculæ seminales	Urinblære
Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskel	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingebeen og paranasale sinusser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarv-saspirat
Harderian-kirtel			

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserves begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliet kendte virkninger, bør præserves. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer til præservation ved oral administration, præserves, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserves og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 og B.29 i dette bilag. For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

Histopatologi

38. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (33). Følgende væv skal som minimum undersøges:

- alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen
- alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget
- alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter, herunder tumorer
- når behandlingsrelaterede histopatologiske forandringer observeres i højdosisgruppen, undersøges disse væv fra alle dyr i alle andre dosisgrupper
- i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserves begge organer.

DATA OG RAPPORTERING

Data

39. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.
40. Historiske kontrolldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontrolldata, som evalueres, bør indgives fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme genereret i de fem år forud for det aktuelle forsøg.
41. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 9). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

Testrapport

42. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber
- identifikationsdata
- testkemikaliets kilde
- batchnummer
- certifikat for kemisk analyse.

For eventuelt vehikel:

- begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

- anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse
- dyrenes antal, alder og køn ved forsøgsstart
- herkomst, miljøbetingelser, kost osv.
- de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af administrationsvej og dosis
- de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant
- oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning
- analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen

- administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet
- eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg
- faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform)

Generelt

- data om overlevelse
- kropsvægt og ændringer i kropsvægt
- foderindtagelse, evt. beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand (hvis relevant)
- toksikokinetiske data (hvis de forefindes)
- oftalmoskopi (hvis tilgængelig)
- hæmatologi (hvis tilgængelig)
- klinisk kemi (hvis tilgængelig).

Kliniske fund

- tegn på toksicitet
- incidens (og sværhedsgrad, hvis de er vurderet) af abnormiteter
- art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er forbigående eller permanente).

Obduktionsdata

- kropsvægt ved forsøgets slutning
- organvægt og deres forhold, hvis relevant
- obduktionsfund; incidens og sværhedsgrad af abnormiteter.

Histopatologi

- ikkeneoplastiske histopatologiske fund
- neoplastiske histopatologiske fund
- korrelation mellem makroskopiske og mikroskopiske fund
- detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund, herunder sværhedsgrader

— rapport om peer review af objektglas.

Evt. statistisk behandling af resultaterne

Diskussioner af resultater, herunder:

— diskussion af tilgange til modellering

— dosis-responsforhold

— historiske kontroldata

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— relevans for mennesker.

Konklusioner

LITTERATUR:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.
- (6) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Kapitel B.8 i dette bilag, Subakut toksicitet (inhalation): 28-dages forsøg
- (10) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg
- (11) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol. 36:793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE og Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

-
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al. The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN og Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA og Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. I D'Arcy POF & Harron DWG (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. s. 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.
- (27) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
 - (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.
 - (32) Weingand K, et al. (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.
 - (33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

B.33. KOMBINERET FORSØG VEDRØRENDE KARCINOGENICITET/KRONISK TOKSICITET

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 453 (2009). Den oprindelige TG 453 blev vedtaget i 1981. Denne opdaterede testmetode B.33 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og lovgivningskrav (1) (2) (3) (4) (5). Denne testmetode B.33 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.32 i dette bilag (Karcinogenicitetsforsøg) og kapitel B.30 i dette bilag (Forsøg vedrørende kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier. Det skal dog bemærkes, at andre oplysninger og krav kan være gældende for lægemidler (se International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).
2. De fleste forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (6), med de nødvendige ændringer som beskrevet i OECD Guidance Document No. 116 (7).
3. De tre primære administrationsveje i forsøg vedrørende kronisk toksicitet/karcinogenicitet er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliet's fysiske-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i Guidance Document No. 116 (7).
4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet. Langvarige forsøg, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af kronisk toksicitet og karcinogenicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af inhalation (7) (8) og dermal applikation (7). Kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (8) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (11) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.
5. Det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en periode, der kan være de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, herunder potentiel karcinogenicitet, og kan pege på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL) og, i tilfælde af ikke-genotoksiske karcinogener, af tumorrespons, som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.
6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:
 - identifikation af et testkemikalies karcinogene egenskaber, der fører til en øget incidens af neoplasmer, øget andel af ondartede neoplasmer eller en reduktion i tiden til forekomsten af neoplasmer sammenlignet med samtidige kontrolgrupper
 - identifikation af tid til fremkomst af neoplasmer
 - identifikation af et testkemikalies kroniske toksicitet

- identifikation af målorganer for kronisk toksicitet og karcinogenicitet
- karakterisering af forholdet mellem dosis og virkning
- identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)
- ekstrapolering af karcinogene virkninger til eksponeringsniveauer for mennesker ved lav dosis
- forudsigelse af kroniske toksicitetsvirkninger på niveauer for menneskelig eksponering
- data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af den potentielle karcinogenicitet og kroniske toksicitet af et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliets af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for dets toksikologiske egenskaber, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Information om og overvejelse af virkningsmåden for et mistænkt karcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) er særlig vigtig, fordi det optimale design kan variere, afhængigt af om testkemikaliets er et kendt eller mistænkt genotoksisk karcinogen. Yderligere vejledning om overvejelser vedrørende virkningsmåde findes i Guidance Document No. 116 (7).
8. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, evt. oplysninger om virkningsmåde, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, herunder genotoksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data, data om mutagenicitet/genotoksicitet og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Bestemmelsen af kronisk toksicitet/karcinogenicitet bør kun udføres, når indledende informationer om toksicitet er indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Kortvarige test med cancerinitiering-/fremme kan også give nyttige oplysninger. Det bør overvejes at benytte en faseinddelt testtilgang til karcinogenicitetstest som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (16) (17) (18) (19).
9. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse, analyse af kumulative tumorrisici i forhold til overlevelsensvarighed, analyse af tid til tumor og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (7) og Guidance Document No. 35 (20).
10. Når et karcinogenicitetsforsøg gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (21), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det beslutes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis.«
11. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (7) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (22) (23). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant i forbindelse med dette kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet.

12. Det bør overvejes at udføre dette kombinerede forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag) og et separat karcinogenicitetsforsøg (kapitel B.32 i dette bilag). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger og reducerer i et vist omfang det nødvendige antal forsøgsdyr i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 11 og 22-26) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet, og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser. Yderligere vejledning om designet af det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet for at opnå maksimal effekt af forsøget med hensyn til muligheder for at reducere det anvendte antal forsøgsdyr og strømline de forskellige testprocedurer findes i Guidance Document No. 116 (7).
13. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (7).

TESTENS PRINCIP

14. Forsøgsdesignet omfatter to parallelle faser, en kronisk fase og en karcinogenicitetsfase (se henholdsvis afsnit 34 og 35 for oplysninger om varighed). Testkemikallet administreres normalt oralt, selv om test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. I forbindelse med den kroniske fase administreres testkemikallet dagligt i graduerede doser til flere grupper af forsøgsdyr, normalt i en periode på 12 måneder, men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene (se afsnit 34). Den valgte varighed skal være så lang, at virkninger af kumulativ toksicitet kan manifestere sig, uden at det konfunderer virkningerne af geriatriske forandringer. Forsøgsdesignet kan også omfatte en eller flere aflivninger i løbet af forsøget, f.eks. ved tre og seks måneder, og yderligere dyr kan inkluderes for at tage højde for dette (se afsnit 20). I forbindelse med karcinogenicitetsfasen administreres testkemikallet dagligt til flere grupper af forsøgsdyr i størstedelen af dyrenes levetid. I begge faser observeres dyrene nøje for tegn på toksicitet og for udvikling af neoplastiske læsioner. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduces, og de overlevende dyr aflives og obduces ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

15. Denne testmetode omfatter primært vurdering og evaluering af kronisk toksicitet og karcinogenicitet hos gnavere (afsnit 2). Brugen af ikke-gnavere kan overvejes, hvis de tilgængelige data viser, at de er mere relevante for forudsigelsen af sundhedsvirkningerne hos mennesker. Valget af dyreart skal begrundes. Den foretrukne gnaverart er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Selv om anvendelsen af mus i karcinogenicitetstest oftest er af begrænset nytte (24) (25) (26), kræves forsøg på mus stadig i henhold til visse lovgivningsbestemmelser, medmindre det påvises, at et sådant forsøg ikke er videnskabeligt nødvendigt. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Design og gennemførelse af forsøg vedrørende kronisk toksicitet/karcinogenicitet på ikke-gnavere skal baseres på de principper, der er beskrevet i denne testmetode, og de principper, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (6)). Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).
16. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet bør gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene vedrørende toksicitet af kortere varighed. Hvis det vides, at dyr af denne stamme og herkomst giver problemer med at opfylde de accepterede kriterier for overlevelse i langvarige forsøg [se Guidance Document No. 116 (7)], bør det dog overvejes at bruge en stamme, der har en acceptabel overlevelseshæfters, til det langvarige forsøg. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

Opbevaring og fodringsbetingelser

17. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet (27) (28) (29). Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C ($\pm$ 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forurenninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer

i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliets og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

Forberedelse af dyrene

18. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravæning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af de anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

19. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der kan foretages en grundig biologisk og statistisk evaluering. For gnavere bør hver dosisgruppe (som beskrevet i afsnit 22) og den samtidige kontrolgruppe beregnet til forsøgets karcinogenicitetsfase indeholde mindst 50 dyr af hvert køn. Afhængigt af formålet med forsøget kan den statistiske styrke af nøgleestimer forøges ved differentielt og ulige at tildele dyr til de forskellige dosisgrupper, idet der tildeles mere end 50 dyr til lavdosisgrupperne, f.eks. for at skønne det karcinogene potentiale ved lave doser. Det skal dog anerkendes, at en moderat forøgelse af gruppestørrelsen kun vil give en forholdsvis lille forøgelse af forsøgets statistiske styrke. For gnavere bør hver dosisgruppe (som beskrevet i afsnit 22) og den samtidige kontrolgruppe beregnet til forsøgets kronisk toksicitetsfase indeholde mindst 10 dyr af hvert køn. Det bemærkes, at dette antal er lavere end i forsøget vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag). Fortolkningen af data fra det reducerede antal dyr pr. gruppe i den kroniske toksicitetsfase af dette kombinerede forsøg støttes dog af data fra det større antal dyr i forsøgets karcinogenicitetsfase. I forsøg med mus skal der evt. bruges flere dyr i hver dosisgruppe i den kroniske toksicitetsfase til at udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser. Yderligere oplysninger om forsøgets statistiske design og valg af dosisniveauer med henblik på at maksimere den statistiske styrke findes i Guidance Document No. 116 (7).

Reserve til aflivninger under forsøget, satellitgruppe og sentineldyr

20. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget, f.eks. ved seks måneder for den kroniske toksicitetsfase, for at fremskaffe oplysninger om progression af ikke-neoplastiske forandringer og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliets, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. De dyr, der anvendes i forsøgets kroniske toksicitetsfase, normalt af 12 måneders varighed (afsnit 34), fremskaffer data om aflivning under forsøget til forsøgets karcinogenicitetsfase, hvilket sikrer en generel reduktion i det anvendte antal dyr. Satellitgrupper kan medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie. Disse begrænses normalt til det højeste dosisniveau i forsøget plus kontrol. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk fem dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (30). Yderligere vejledning om forsøgsdesignet med henblik på at medtage dyr til aflivning under forsøget samt satellit- og sentineldyr, samtidig med at det samlede antal dyr i forsøget minimeres, findes i Guidance Document No. 116 (7).
21. Hvis satellitdyr og/eller aflivninger under forsøget indgår i forsøgsdesignet, skal antallet af dyr i hver dosisgruppe, som medtages til dette formål, normalt være 10 dyr pr. køn, og det samlede antal dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. Dyr, der planlægges aflivet under forsøget, og satellitdyr underkastes de samme observationer, herunder kropsvægt og foder-/vandindtagelse, hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser som dyrene i hovedforsøgets kroniske toksicitetsfase, selv om der også kan medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet.

Dosisgrupper og dosering

22. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (7). Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe for både den kroniske toksicitetsfase og karcinogenicitetsfasen. Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliets eller tilsvarende kemikalier.

23. For forsøgets kroniske toksicitetsfase kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt, hvis det kan forventes, at en test, der gennemføres med et dosisniveau svarende til mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, næppe vil fremkalde negative virkninger. Dette bør baseres på informationer fra forforsøg og det forhold, at toksicitet ikke forventes ud fra kendskab til strukturelt beslægtede kemikalier. En grænse på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag er kun relevant, hvis human eksponering indikerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.
24. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliet fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Normalt vælges det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %). Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en negativ virkning, som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt.
25. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og, afhængigt af testkemikaliet virkningsmåde, en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 27). Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes. Når et kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet gennemføres, er det primære mål at fremskaffe oplysninger til vurdering af karcinogenicitetsrisici, og oplysninger om kronisk toksicitet er normalt det sekundært mål. Dette skal erindres, når dosisniveauer og dosisintervaller vælges til forsøget.
26. Det valgte dosisinterval afhænger af forsøgsformålene og testkemikaliet karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.
27. Som beskrevet i Guidance Document No. 116 (7) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:
- kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller infleksionspunkter i dosis-respons
 - toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer
 - præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning
 - vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoxicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøostatiske mekanismer belastes osv.
 - områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel
 - overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker, navnlig med hensyn til valget af mellemhøje og lave doser.
28. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliet. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt doseringsgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret fødeindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

Fremstilling af doser og administration af testkemikalie

29. Testkemikaliet indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (7). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliet fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer

en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikalie typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.

30. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikalie i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikalies absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikalies kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dets toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernærings-tilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikalies stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).
31. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikalies koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikalie administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.
32. Ved oral administration gives testkemikalie dagligt til dyrene (syv dage om ugen) normalt i en periode på 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen) (se også afsnit 33 og 34). Andre doseringsregimer, f.eks. fem dage om ugen, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikalie i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (11), i en periode på 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen). Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen). Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (9).
33. Hvis testkemikalie indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumen skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnave (31). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen, bør undgås.

Forsøgets varighed

34. Doseringsperioden og varigheden af dette forsøgs kroniske fase er normalt 12 måneder, men forsøgsdesignet gør det også muligt at udføre forsøg med enten kortere (f.eks. seks eller ni måneder) eller længere (f.eks. 18 eller 24 måneder) varighed, afhængigt af de specifikke lovgivningskrav eller mekanistiske formål. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Alle dosisgrupper, der er tildelt til denne fase, afsluttes på det tidspunkt, der er fastsat til evaluering af kronisk toksicitet og ikke-neoplastisk patologi. Satellitgrupper, der medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie, bevares uden dosering i en periode på mindst fire uger og højst en tredjedel af den samlede forsøgsvarighed efter ophør af eksponering.
35. Varigheden af forsøgets karcinogenicitetsfase er normalt 24 måneder for gnave, dvs. størstedelen af de anvendte dyrs levetid. Der kan anvendes kortere eller længere forsøgsvarigheder afhængigt af levetiden for den stamme af dyr, der anvendes i forsøget, men varigheden skal begrundes. For bestemte stammer af mus, f.eks. AKR/J, C3H/J eller C57BL/6J, kan en varighed på 18 måneder være mere hensigtsmæssig. I det følgende

gives der oplysninger om forsøgsvarighed, afbrydelse af forsøget og overlevelse. Yderligere vejledning, herunder overvejelse af, om negativ karcinogenicitet kan accepteres i forhold til overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

- Afbrydelse af forsøget skal overvejes, når antallet af overlevende i de laveste dosigrupper eller kontrolgrupper falder til under 25 %.
- Hvis kun gruppen med den højeste dosis dør før tiden på grund af toksicitet, bør det ikke medføre afbrydelse af forsøget.
- Overlevelse vurderes separat for hvert køn.
- Forsøget bør ikke forlænges ud over det punkt, hvor dataene fra forsøget ikke længere er tilstrækkelige til at understøtte en statistisk gyldig evaluering.

OBSERVATIONER (DEN KRONISKE TOKSICITETSFASE)

36. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Almindelig klinisk observation bør foretages mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift.
37. Detaljerede kliniske undersøgelser gennemføres af alle dyrene i hvert fald før første eksponering (for at tage højde for individuelle forskelle), ved slutningen af den første uge af forsøget og derefter en gang månedlig. Protokollen for undersøgelser tilrettelægges, således at variationer mellem individuelle undersøgere minimeres, og således at den er uafhængig af testgruppen. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i undersøgelsesbetingelserne er mindst mulige. Observationerne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (32).
38. Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres på alle dyr inden første administration af testkemikaliets. Ved forsøgets afslutning foretages denne undersøgelse helst på alle dyr, men i det mindste på alle dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der opdages øjenforandringer, der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges. Hvis strukturel analyse eller andre informationer antyder øjentoksicitet, øges frekvensen af øjenundersøgelser.
39. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indikeret et neurotoksisk potentiale, kan reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (32) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (33), (34), (35), gribestyrke (36) og motorisk aktivitet (37) eventuelt vurderes inden påbegyndelsen af forsøget og derefter med tre måneders mellemrum, indtil der er gået 12 måneder, og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.
40. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indikeret et immunotoksisk potentiale, kan yderligere undersøgelser af denne effektparameter udføres ved forsøgsafslutning.

Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse

41. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliets administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver

42. I forsøg med gnavere foretages hæmatologisk undersøgelse af alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) ved 3, 6 og 12 måneder og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser (se afsnit 19). I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved tre måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på hæmatologiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse.
43. Følgende parametre bør undersøges (38): total og differential leucocyttælling, erythrocyttælling, blodpladetælling, hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, middelcellevolumen (MCV), middelcellehæmoglobin (MCH), middelcellehæmoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid og aktiveret partiel tromboplastintid. Andre parametre for hæmatologi, som f.eks. Heinz-legemer eller andre atypiske parametre for erythrocytmorfologi eller methæmoglobin, kan måles afhængigt af testkemikaliet toksicitet. Generelt bør der benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af de observerede og/eller forventede virkninger af et givet testkemikalie. Hvis testkemikallet har indvirkning på det hæmopoietiske system, kan retikulocyttællinger og knoglemarvscytologi også være indiceret, selv om de ikke skal foretages rutinemæssigt.
44. Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) med samme tidsintervaller som de hæmatologiske undersøgelser. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede klinisk kemiske målinger. I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved tre måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på klinisk-biokemiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Dyrene (dog ikke mus) bør faste inden blodprøvetagning⁽¹⁾. Følgende parametre bør undersøges (38): glukose, urea (urinstof), kreatinin, total protein, albumin, calcium, natrium, kalium, total kolesterol, mindst to relevante test med henblik på hepatocellulær evaluering (alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, glutamat-dehydrogenase og totale galdesyre) (39) og mindst to relevante test med henblik på hepatobiliær evaluering (alkalisk fosfatase, gamma-glutamyl-transferase, 5'-nucleotidase, total bilirubin og totale galdesyre) (39). Andre klinisk-kemiske parametre, som f.eks. fastende triglycerider, specielle hormoner og kolinesterase, kan måles afhængigt af testkemikaliet toksicitet. Der skal generelt benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af den observerede og/eller forventede virkning af et testkemikalie.
45. Urinanalyser udføres på alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) med samme tidsintervaller som de hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser. Målinger ved tre måneder foretages ikke, hvis der ikke er konstateret virkninger på urinanalyse i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Følgende liste over parametre indgår i en ekspert anbefaling vedrørende kliniske patologiforsøg (38): udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, total protein og glukose. Andre parametre omfatter keton, urobilinogen, bilirubin og hæmaturi. Andre parametre kan inkluderes, hvis det er nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.
46. Der er generel enighed om, at hæmatologiske og klinisk-biokemiske baselinevariabler er nødvendige inden behandling i forbindelse med hundeforsøg, men de er ikke nødvendige i forsøg med gnavere (38). Hvis de historiske baselinedata (se afsnit 58) er utilstrækkelige, bør det overvejes at fremskaffe sådanne data.

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

47. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal normalt have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniet, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Der kan dog også medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet (se afsnit 21). Disse dyr underkastes dog ikke obduktion og de fremgangsmåder, der er beskrevet i det følgende. Sentinel dyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde.

⁽¹⁾ Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikkefast, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor foderindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikallet. Alle dyr bør vurderes i samme fysiologiske tilstand, og detaljerede eller neurologiske vurderinger bør derfor efter planen gennemføres en anden dag end udtagningen af de klinisk-biokemiske prøver.

48. Organvægte registreres for alle dyr, bortset fra dyr som er udelukket i medfør af sidste del af afsnit 47. Binyrer, hjerne, bitystikler, hjerte, nyrer, lever, ovarier, milt, testikler, skjoldbruskkirtel (vejet efter fiksering, med paratyreoideae) og uterus skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.
49. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 40) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel
Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]
Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Lufttrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculæ seminales	Urinblære
Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskel	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinuser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarv-saspirat
Harderian-kirtel			

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliet kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer ved oral administration, undersøges, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

Histopatologi

50. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (40). De histopatologiske undersøgelser skal som minimum omfatte:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

- alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget
- alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter
- målvæv eller væv, der udviser behandlingsrelaterede forandringer i højdosisgruppen, fra dyr i alle andre dosisgrupper
- i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

OBSERVATIONER (KARCINOGENICITETSFASEN)

51. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Dyrene kontrolleres desuden en gang om dagen for specifikke tegn af toksikologisk relevans. Ved sondeforsøg kontrolleres dyrene i perioden umiddelbart inden doseringen. Særlig opmærksomhed rettes mod udviklingen af tumorer, og på tidspunktet for den første tumordannelse registreres lokalisering, dimensioner, fremtræden og progression af hver makroskopisk synlig eller palpabel tumor.
52. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikallet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

Hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser

53. For at udlede flest mulige informationer fra forsøget, især med hensyn til virkningsmåde, kan blodprøver efter forsøgslederens vurdering udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser. Urinanalyse kan også være relevant. Data om dyr, der anvendes i forsøgets kroniske toksicitetsfase, normalt af 12 måneders varighed (afsnit 34), fremskaffer oplysninger om disse parametre. Yderligere vejledning om fordelene ved at udtage sådanne prøver i forbindelse med karcinogenicitetsforsøg findes i Guidance Document No. 116 (7). Hvis blodprøver udtages, tages de ved slutningen af forsøgsperioden lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse. Blodsmears kan også forberedes til undersøgelse, navnlig hvis knoglemarv tilsyneladende er målorganet, selv om der ikke er enighed om værdien af en sådan undersøgelse i karcinogenicitetsfasen i forbindelse med vurderingen af karcinogen/onkogen potentiale (38).

PATOLOGI

Makroskopisk obduktion

54. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal med undtagelse af sentineldyr (se afsnit 20) og andre satellitdyr have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger samt kraniet, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Sentineldyr og andre satellitdyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde. Organvægt indgår normalt ikke i karcinogenicitetsforsøg, da geriatriske forandringer og i senere faser udviklingen af tumorer konfunderer anvendeligheden af data om organvægt. Organvægt kan dog være vigtig til at udføre en weight of evidence-evaluering og overvejelser vedrørende virkningsmåde. Hvis organvægt indgår i et satellitforsøg, registreres værdierne senest et år efter forsøgsstart.
55. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 40) (væv i kantet parentes er valgfrit):

Alle større læsioner	Hjerte	Bugspytkirtel	Mavesæk (formave, kirtelmave)
Binyrer	Ileum	Biskjoldbruskkirtel	[Tænder]
Aorta	Jejunum	Perifer nerve	Testikler
Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons)	Nyre	Hypofyse	Brisler
Cæcum	Tårekirtel (ekstraorbital)	Prostata	Skjoldbruskkirtel

Cervix	Lever	Rectum	[Tunge]
Prostata anterior	Lunge	Spytkirtel	Lufttrør
Tyktarm	Lymfeknuder (både overfladiske og dybe)	Vesiculæ seminales	Urinblære
Duodenum	Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr)	Skeletmuskel	Uterus med cervix
Epididymis	[Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinuser]	Hud	[Ureter]
Øje (herunder retina)	Øsofagus	Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal)	[Urethra]
[Femur med led]	[Bulbus olfactorius]	Milt	Vagina
Galdeblære (for andre arter end rotte)	Æggestok	[Sternum]	Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarv-saspirat
Harderian-kirtel			

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserves begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliet kendte virkninger, bør præserves. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer ved oral administration, undersøges, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserves og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præservet fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

Histopatologi

56. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (40). Følgende væv skal som minimum undersøges:

- alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen
- alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget
- alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter, herunder tumorer
- når behandlingsrelaterede histopatologiske forandringer observeres i højdosisgruppen, undersøges disse væv fra alle dyr i alle andre dosisgrupper
- i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserves begge organer.

DATA OG RAPPORTERING (KARCINOGENICITET OG KRONISK TOKSICITET)

Data

57. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelse (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

58. Historiske kontrolldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontrolldata, som evalueres, bør indgives fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme genereret i de fem år forud for det aktuelle forsøg.
59. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 9). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.
60. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber
- identifikationsdata
- testkemikaliets kilde
- batchnummer
- certifikat for kemisk analyse.

For eventuelt vehikel:

- begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

- anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse
- dyrenes antal, alder og køn ved forsøgsstart
- herkomst, miljøbetingelser, kost osv.
- de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Testbetingelser:

- begrundelse for valg af administrationsvej og dosis
- de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant
- oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning
- analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen
- administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet
- eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg
- faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform):

Generelt

- data om overlevelse
- kropsvægt og ændringer i kropsvægt
- foderindtagelse, beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand, hvis muligt
- toksikokinetiske data, hvis de forefindes.
- oftalmoskopi (hvis tilgængelig)
- hæmatologi (hvis tilgængelig)
- klinisk kemi (hvis tilgængelig).

Kliniske fund

- tegn på toksicitet
- incidens (og sværhedsgrad, hvis de er vurderet) af abnormiteter
- art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er forbigående eller permanente).

Obduktionsdata

- kropsvægt ved forsøgets slutning
- organvægt og deres forhold, hvis relevant
- obduktionsfund; incidens og sværhedsgrad af abnormiteter.

Histopatologi

- ikkeneoplastiske histopatologiske fund
- neoplastiske histopatologiske fund
- korrelation mellem makroskopiske og mikroskopiske fund
- detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund, herunder sværhedsgrader
- rapport om peer review af objektglas.

Evt. statistisk behandling af resultaterne

Diskussioner af resultater, herunder:

- diskussion af tilgange til modellering
- dosis-responsforhold
- historiske kontroldata

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— relevans for mennesker.

Konklusioner

LITTERATUR:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445
- (6) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Kapitel B.8 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 28-dages forsøg
- (10) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg
- (11) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

-
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN og Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA og Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. I D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.
- (27) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

-
- (34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (38) Weingand K, Brown G, Hall R et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (39) EMEA-dokument (udkast) »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (Dok. ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.»

7) Kapitel B.36 affattes således:

»B.36. TOKSIKOKINETIK

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD TG 417 (2010). Forsøg vedrørende et testkemikalies toksikokinetik (TK) gennemføres for at fremskaffe tilstrækkelige oplysninger om dets absorption, fordeling, biotransformation (dvs. metabolisme) og udskillelse til at relatere koncentration eller dosis til den observerede toksicitet og til at opnå en forståelse af dets toksicitetsmekanisme. TK kan hjælpe med at forstå toksikologiforsøgene ved at påvise, at forsøgsdyrene systematisk eksponeres for testkemikallet, og ved at afdække de omsættende dele (oprindeligt kemikalie/metabolitter). Grundlæggende TK-parametre, der er fastlagt ud fra disse forsøg, giver også information om potential for akkumulering af testkemikallet i væv og/eller organer og potential for induktion af biotransformation som følge af eksponeringen for testkemikallet.
2. TK-data kan bidrage til en vurdering af relevansen og tilstrækkeligheden af toksicitetsdata vedrørende dyr med henblik på ekstrapolering til fare- og/eller risikovurderinger for mennesker. TK-forsøg kan endvidere give nyttige oplysninger til fastlæggelse af dosisniveauer til toksicitetsforsøg (lineær i forhold til ikke-lineær kinetik), virkninger af administrationsvej, biotilgængelighed og forhold vedrørende forsøgsdesign. Visse typer TK-data kan bruges til udvikling af fysiologisk baserede toksikokinetiske modeller (PBTK).
3. Metabolit-/TK-data kan anvendes på vigtige områder og kan f.eks. give forslag om mulige toksiciteter og virkningsmåder og deres sammenhæng med dosisniveau og eksponeringsvej. Metabolismedata kan desuden fremskaffe oplysninger, der kan bruges til vurdering af den toksikologiske signifikans af eksponering for eksogent producerede metabolitter af testkemikallet.
4. Tilstrækkelige TK-data kan anvendes til støtte for yderligere accept og anvendelse af tilgange baseret på kvantitative forhold mellem struktur og aktivitet, analogislutninger eller gruppering i forbindelse med sikkerheds-evalueringen af kemikalier. Kinetikdata kan også bruges til at evaluere den toksikologiske relevans af andre forsøg (f.eks. in vivo og in vitro).
5. Medmindre en anden administrationsvej nævnes (se f.eks. afsnit 74-78), gælder denne testmetode for oral administration af testkemikallet.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

6. Der stilles forskellige krav og anføres forskellige behov i lovgivningerne med hensyn til måling af effektparametre og parametre vedrørende toksikokinetik for de forskellige kemikalieklasser (f.eks. pesticider, biocider og industrikemikalier). I modsætning til de fleste testmetoder beskriver denne testmetode TK-test, der involverer flere målinger og effektparametre. I fremtiden vil der muligvis blive udviklet flere nye testmetoder og/eller vejledninger, som beskriver hver effektparameter separat og i flere detaljer. For så vidt angår denne testmetode, fastlægger det enkelte lovgivningssystem, hvilke test eller vurderinger der skal gennemføres.
7. Der er adskillige forsøg, der kan udføres for at evaluere et testkemikalies TK-opførsel i lovgivningsøjemed. Afhængigt af de konkrete lovgivningsbehov eller situationer er det dog ikke nødvendigt at udføre alle disse mulige forsøg for at evaluere et testkemikalie. Designet af TK-forsøg skal være fleksibelt og tage hensyn til karakteristika for det undersøgte testkemikalie. I nogle tilfælde skal kun et bestemt sæt spørgsmål undersøges for at behandle fare- og risikoforholdene i forbindelse med et testkemikalie. I nogle situationer indsamles TK-data i forbindelse med evalueringen i andre toksikologiforsøg. I andre situationer skal der udføres yderligere og/eller mere omfattende TK-forsøg, hvis det kræves i henhold til lovgivningen, og/eller hvis nye spørgsmål rejses under evalueringen af testkemikallet.
8. Alle tilgængelige informationer om testkemikallet samt relevante metabolitter og analoger bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Dette kan omfatte data fra andre relevante testmetoder (in vivo-forsøg, in vitro-forsøg

og/eller in silico-evalueringer). Fysisk-kemiske egenskaber, såsom et testkemikalies fordelingskoefficient octanol/vand (udtrykt som $\log P_{ow}$), pKa, vandopløselighed, damptryk og molekylvægt, kan bruges i forbindelse med planlægningen af et forsøg og fortolkning af resultater. De kan bestemmes ved hjælp af hensigtsmæssige metoder som beskrevet i de relevante testmetoder.

BEGRÆNSNINGER

9. Denne testmetode er ikke designet til at tage højde for særlige omstændigheder, f.eks. drægtige eller diegivende dyr og afkom, eller til at evaluere potentielle reststoffer i eksponerede dyr, der anvendes i fødevareproduktionen. Data fra et B.36-forsøg kan dog bruges som baggrundsinformation ved design af specifikke forsøg til sådanne undersøgelser. Denne testmetode er ikke beregnet til test af nanomaterialer. I henhold til en rapport om en foreløbig gennemgang af OECD Test Guidelines med hensyn til deres relevans for nanomaterialer kan TG 417 (svarer til denne testmetode B.36) muligvis ikke anvendes i forbindelse med nanomaterialer (1).

DEFINITIONER

10. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i tillæg.

HENSYN TIL DYREVELFÆRD

11. Vejledning om human behandling af dyr findes i OECD Guidance Document No. 19 (2). Det anbefales, at den OECD-vejledning benyttes ved alle in vivo- og in vitro-forsøg, der er beskrevet i denne testmetode.

BESKRIVELSE AF METODERNE

Pilotforsøg

12. Pilotforsøg anbefales og tilskyndes i forbindelse med valg af forsøgsparametre til TK-forsøg (f.eks. metabolisme, massebalance, analysemetoder, dosisbestemmelse, udånding af CO_2 osv.). Karakterisering af nogle af disse parametre kan betyde, at det ikke er nødvendigt at bruge radioaktivt mærkede kemikalier.

Valg af dyr

Art

13. Den dyreart (og stamme), der bruges til TK-test, skal helst være den samme som den, der anvendes i andre toksikologiske forsøg udført med det pågældende testkemikalie. Normalt anvendes rotter, da de hyppigt anvendes i toksikologiske forsøg. Andre eller yderligere arter kan anvendes, hvis kritiske toksikologiforsøg giver bevis for signifikant toksicitet hos disse arter, eller hvis det dokumenteres, at deres toksicitet/toksikokinetik er mere relevant for mennesker. Der skal gives en begrundelse for valg af dyreart og stamme.
14. Medmindre andet nævnes, henviser denne testmetode til rotten som forsøgsdyr. Visse aspekter af metode skal muligvis ændres, hvis andre forsøgsarter bruges.

Alder og stamme

15. Der anvendes unge raske voksne dyr (normalt 6-12 uger gamle på doseringstidspunktet) (se også afsnit 13 og 14). Der skal gives en begrundelse, hvis der bruges dyr, som ikke er unge voksne. Alle dyr skal være af samme alder ved forsøgets begyndelse. Med hensyn til vægt må det enkelte dyr ikke afvige mere end $\pm 20\%$ fra testgruppens gennemsnitsvægt. Ideelt anvendes den stamme, der også blev anvendt til at etablere den toksikologiske database for testkemikalien.

Dyrenes antal og køn

16. For hver testet dosis anvendes mindst fire dyr af et køn. Der gives en begrundelse for kønnet af de valgte dyr. Det bør overvejes at bruge begge køn (4 handyr og 4 hundyrr), hvis der foreligger beviser, som understøtter signifikante kønsrelaterede forskelle i toksicitet.

Opbevaring og fodringsbetingelser

17. Dyr opbevares generelt i individuelle bure i forsøgsperioden. Flere dyr i samme bur kan begrundes i særlige tilfælde. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), og den relative fugtighed skal være 30-70 %. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

Testkemikalie

18. Et radioaktivt mærket testkemikalie med ^{14}C anvendes i forbindelse med alle aspekter af massebalance- og metabolitbestemmelse i forsøget. Hvis det kan påvises, at:

- massebalance- og metabolitbestemmelse kan evalueres tilstrækkeligt ved hjælp af det umærkede testkemikalie, og
- den analytiske specificitet og sensitivitet af den metode, der anvendes med et ikke-radioaktivt testkemikalie, er lig med eller større end den, der kan opnås med det radioaktivt mærkede testkemikalie

er det ikke nødvendigt at bruge et radioaktivt mærket testkemikalie. Andre radioaktive og stabile isotoper kan desuden anvendes, hvis elementet f.eks. er ansvarligt for eller indgår i den toksiske del af testkemikaliets. Hvis det er muligt, placeres det radioaktivt mærkede stof i en kernet del af det metaboliske stabile molekyle (det er ikke ombytligt, det fjernes ikke metabolisk som CO_2 , og det bliver ikke en del af organismens »one-carbon pool«). Det kan være nødvendigt at mærke flere steder eller bestemte områder af molekylet for at følge testkemikaliets metaboliske skæbne.

19. Testkemikalier med og uden radioaktiv mærkning analyseres ved hjælp af hensigtsmæssige metoder med henblik på at bestemme renhed og identitet. Den radioaktive renhed af det radioaktive testkemikalie skal være det højeste mulige for et bestemt testkemikalie (den skal ideelt være mere end 95 %), og det skal tilstræbes at identificere urenheder, der er tilstede ved eller over 2 %. Renheden skal rapporteres sammen med identiteten og andelen af identificerede urenheder. I lovgivningsbestemmelser kan der gives yderligere vejledning i definitionen og specifikationen af testkemikalier, der består af blandinger og metoder til bestemmelse af renhed.

Valg af dosis*Pilotforsøg*

20. Normalt er en enkelt oral dosis nok til pilotforsøget. Dosen skal være ikke-toksisk, men høj nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant) og til at opfylde det anførte formål med pilotforsøget som anført i afsnit 12 i denne testmetode.

Hovedforsøg

21. Til hovedforsøgene foretrækkes mindst to doser, da oplysninger indsamlet fra mindst to dosisgrupper kan bruges som en hjælp til at fastlægge dosis i andre toksicitetsforsøg og til at foretage en dosis-responsvurdering af allerede tilgængelige toksicitetstest.
22. Hvis to doser administreres, skal begge doser være høje nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant). Information fra tilgængelige toksicitetsdata skal overvejes ved valg af dosis. Hvis sådanne data ikke er tilgængelige (f.eks. fra forsøg vedrørende akut oral toksicitet med registrering af kliniske tegn på toksicitet eller fra toksicitetsforsøg med gentagen dosering), kan en værdi for den højeste dosis, der er lavere end LD_{50} (oral og dermal administration) eller LC_{50} (inhalation)-estimatet eller lavere end den laveste værdi af det estimerede interval for akut toksicitet, overvejes. Den laveste dosis skal være en brøkdel af den højeste dosis.
23. Hvis kun et dosisniveau undersøges, skal dosen ideelt være høj nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant) uden at producere synlig toksicitet. Der gives en begrundelse, hvis der ikke medtages et andet dosisniveau.
24. Hvis virkningen af dosen på de kinetiske processer skal bestemmes, er to doser muligvis ikke nok, og mindst én dosis skal være tilstrækkeligt høj til at mætte disse processer. Hvis området under koncentration-tidskurven for plasma (AUC) ikke er lineært mellem de to dosisniveauer, der er anvendt i hovedforsøget, er det en stærk indikation af, at mætning af en eller flere af de kinetiske processer sker et sted mellem de to dosisniveauer.
25. For testkemikalier af lav toksicitet bør en maksimal dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt (oral og dermal administration) anvendes (for oplysninger om inhalation henvises til kapitel B.2 i dette bilag; denne dosis overstiger typisk ikke 2 mg/l). Kemikaliespecifikke overvejelser kan gøre det nødvendigt at anvende en højere dosis, afhængigt af lovgivningen. Valg af dosis skal altid begrundes.

26. Toksikokinetiske data og data om fordeling i væv ved enkelt dosis kan være nok til at bestemme potentialet for akkumulering og/eller persistens. Under visse omstændigheder kan gentagen dosisadministration dog være nødvendig i) for i yderligere detaljer at afdække potentialet for akkumulering og/eller persistens eller ændringer i TK (dvs. enzyminduktion og -inhibition) eller ii) for at opfylde de gældende lovgivningskrav. Hvis et forsøg omfatter gentagen dosering, er det normalt tilstrækkeligt at anvende den lave dosis, men under visse omstændigheder kan det være nødvendigt også at anvende en høj dosis (se også afsnit 57).

Administration af testkemikalie

27. Testkemikaliet skal opløses eller suspenderes homogent i det vehikel, der også blev anvendt til de andre toksicitetsforsøg med anvendelse af oral sonde, der er udført med testkemikaliet, hvis oplysninger om vehiklet er tilgængelige. Der gives en begrundelse for valg af vehikel. Valg af vehikel og doseringsvolumen skal være en del af forsøgsdesignet. Testkemikaliet administreres sædvanligvis via sonde. Administration med gelatinekapsler eller iblandet foderet kan være bedre i visse situationer (begrundelse gives i begge tilfælde). Den faktiske dosis, der er administreret til hvert dyr, bekræftes.
28. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen via oral sonde, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse, typen af dosisvehikel, og om dyrene haft adgang til foder inden administration af testkemikaliet. Der gives en begrundelse for administration eller begrænsning af foder inden dosering. Normalt bør volumen holdes så lavt som muligt for både vandige og ikkevandige vehikler. Dosisvolumen må normalt ikke overstige 10 ml/kg kropsvægt for gnavere. Volumen af vehikler, der anvendes i forbindelse med mere lipofile testkemikalier, kan starte ved 4 ml/kg kropsvægt. Når daglig faste er kontraindiceret, bør lavere dosisvolumen (f.eks. 2-4 ml/kg kropsvægt) overvejes ved gentagen dosering. Når det er muligt, bør det overvejes at bruge et dosisvolumen svarende til det, der er anvendt i andre orale sondeforsøg med testkemikaliet.
29. Intravenøs (IV) administration af testkemikaliet og måling af testkemikaliet i blod og/eller excreta kan anvendes til at bestemme biotilgængelighed eller relativ oral absorption. Ved et IV-forsøg administreres en enkelt dosis (normalt svarende til, men ikke højere end den laveste orale dosis) af testkemikaliet ved hjælp af et hensigtsmæssigt vehikel. Dette materiale bør administreres i et passende volumen (f.eks. 1 ml/kg kropsvægt) på det valgte administrationssted på mindst fire dyr af det mest egnede køn (begge køn kan anvendes, hvis det er begrundet, se afsnit 16). En fuldt opløst eller suspenderet dosistilberedning er nødvendig ved IV-administration af testkemikaliet. Vehiklet til IV-administration må ikke opvirke blodintegriteten eller blodgennemstrømningen. Ved infusion af testkemikaliet med en infusionspumpe rapporteres infusionshastigheden, som skal være den samme for alle dyr. Bedøvelse anvendes, hvis et kateter indsættes i halsvenen (til administration af testkemikaliet og/eller udtagning af blod), eller hvis femoralarterien anvendes til administration. Typen af bedøvelse bør overvejes, da den kan påvirke toksikokinetikken. Dyrene skal have mulighed for at restituere sig tilstrækkeligt inden administration af testkemikaliet og vehiklet.
30. Andre administrationsveje, f.eks. dermal applikation og inhalation (se afsnit 74-78), kan anvendes i forbindelse med visse testkemikalier under hensyntagen til deres fysisk-kemiske egenskaber og menneskers forventede anvendelse eller eksponering.

Målinger

Massebalance

31. Massebalance bestemmes ved at lægge den procentdel af den administrerede (radioaktive) dosis, der udskilles i urin, fæces og udåndet luft, sammen med den procentdel, der er til stede i væv, resten af kadaveret og vaskevand fra bure (se afsnit 46). Generelt vurderes en total genfindning af det administrerede testkemikalie (radioaktivitet) på > 90 % at være tilstrækkelig.

Absorption

32. Der kan fås en indledende estimering af absorptionen ved at ekskludere procentdelen af dosen i mave-tarmkanalen og/eller fæces fra bestemmelsen af massebalancen. Se afsnit 33 for oplysninger om beregning af den procentvise absorption. Se afsnit 44-49 for oplysninger om undersøgelse af excreta. Hvis den præcise absorptionsgrad efter oral administration ikke kan bestemmes ud fra massebalanceforsøg (f.eks. hvis mere end 20 % af den administrerede dosis er til stede i fæces), kan yderligere undersøgelser være nødvendige. Disse forsøg kan omfatte enten 1) oral administration af testkemikaliet og måling af testkemikaliet i galde eller 2) oral og intravenøs administration af testkemikaliet og måling af det nettovolumen af testkemikalie, der er til stede i urin plus udåndet luft plus kadaver ved hver af de to administrationsveje. I begge forsøgsdesign foretages måling af radioaktivitet som en surrogatmetode til kemikaliespecifik analyse af testkemikaliet plus metabolitter.
33. Hvis udskillelse i galde undersøges, anvendes oftest oral administration. I dette forsøg lægges et kateter i galdegangen på mindst fire dyr af det mest egnede køn (eller begge køn, hvis det er begrundet), og en enkelt dosis af testkemikaliet administreres. Efter administration af testkemikaliet overvåges udskillelsen af radioaktivitet/testkemikalie i galde så længe som nødvendigt for at anslå den procentdel af den administrerede dosis, der udskilles ad denne vej, og denne værdi kan bruges til direkte at beregne den orale absorptionsgrad:

$$\text{Procent absorption} = (\text{mængde i galde} + \text{urin} + \text{udåndet luft} + \text{kadaver uden indhold i mave-tarmkanal}) / \text{administreret mængde} \times 100$$

34. I nogle testkemikalieklasser kan der ske direkte sekretion af den absorberede dosis på tværs af tarmmembraner. I sådanne tilfælde er målingen af den procentvise dosis i fæces efter en oral dosis via kateter i rottens galdekanal ikke repræsentativ for den uabsorberede dosis. Hvis tarmsekretion vurderes at forekomme, anbefales det, at den absorberede procentdel af dosis baseres på den absorption, der beregnes ved at sammenligne udskillelse efter oral administration med udskillelse efter intravenøs administration (intakt rotte eller rotte med kateter i galdekanal) (se afsnit 35). Hvis kvantificering af tarmsekretion vurderes at være nødvendig, bør udskillelse i galdegangen hos rotten med kateter i galdekanalen måles efter intravenøs dosisadministration.

Biotilgængelighed

35. Biotilgængelighed kan bestemmes ud fra plasma-/blodkinetikken for de orale og intravenøse grupper (se afsnit 50-52) ved hjælp af specifik kemisk analyse af testkemikaliets og/eller relevante metabolitter, og et radioaktivt mærket testkemikalie er derfor ikke påkrævet. Beregningen af testkemikaliet eller relevante metabolitters biotilgængelighed (F) foretages derefter på følgende måde:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (Dosis_{\text{IV}}/Dosis_{\text{exp}})$$

hvor AUC er området under koncentration-tidskurven for plasma, og exp er den eksperimentelle administrationsvej (oral, dermal eller via inhalation).

36. I forbindelse med risikovurdering af systemiske virkninger foretrækkes generelt biotilgængelighed af den toksiske komponent generelt frem for den procentvise absorption, når systemiske koncentrationer fra dyreforsøg sammenlignes med analoge bioovervågningsdata fra undersøgelser af erhvervsmæssig eksponering. Situationen kan blive mere kompleks, hvis doserne er i det ikke-lineære område, så det er vigtigt at den toksikokinetiske screening udpeger doser i det lineære område.

Fordeling i væv

37. Kendskab til fordelingen i væv af et testkemikalie og/eller dets metabolitter er afgørende for at kunne identificere målvæv og forstå de bagvedliggende toksicitetsmekanismer og for at få oplysninger om testkemikaliet potentiale, metabolitakkumulering og persistens. Procentdelen af den samlede (radioaktive) dosis i væv og resten af kadaveret bør som minimum måles ved afslutningen af udskillelsesforsøget (f.eks. op til syv dage efter dosis eller mindre afhængigt af testkemikaliet specifikke opførsel). Hvis testkemikalie ikke spores i væv ved forsøgsafslutning (f.eks. fordi testkemikaliets elimineret inden forsøgsafslutning på grund af en kort halveringstid), bør det omhyggeligt sikres, at data ikke fejlfortolkes. I en sådan situation undersøges fordelingen i væv på det tidspunkt, hvor koncentrationen af testkemikaliets (og/eller dets metabolit) topper i plasma/blod (T_{max}), eller hvor udskillelse i urinen topper, alt efter hvad der er relevant (se afsnit 38). Det kan desuden være nødvendigt at indsamle væv på andre tidspunkter med henblik på at bestemme fordelingen i væv af testkemikaliets og/eller dets metabolitter, evaluere betydningen af tid (hvis relevant), hjælpe med at bestemme massebalance og/eller som krævet af en kompetent myndighed. Væv, der indsamles, omfatter lever, fedt, mave-tarmkanal, nyre, milt, fuld-blod, resterende kadaver, væv fra målorganer og andet væv (f.eks. skjoldbruskkirtel, erythrocytter, kønsorganer, hud, øjne (især fra pigmenterede dyr) af potentiel signifikans for den toksikologiske evaluering af testkemikaliets. Analyse af yderligere væv på samme tidspunkter bør overvejes for at udnytte dyrene mest muligt, og hvis målorgantoksicitet observeres i forsøg vedrørende subkronisk eller kronisk toksicitet. Den (radioaktive) restkoncentration og forholdet mellem væv og plasma (blod) rapporteres også.
38. Evaluering af fordelingen i væv på flere tidspunkter, f.eks. tidspunktet for spidskoncentration i plasma/blod (dvs. T_{max}) eller spidsudskillelse i urin, fremskaffet fra de forskellige forsøg vedrørende plasma-/blodkinetik eller udskillelse, kan også være nødvendig eller kræves af en kompetent myndighed. Disse oplysninger kan bruges til at forstå toksicitet og testkemikaliet potentiale, metabolitakkumulering og persistens. Udvælgelsen af prøver skal begrundes. Prøver til analyse skal generelt være de samme som ovennævnte (se afsnit 37).
39. Kvantificering af radioaktivitet til forsøg vedrørende fordeling i væv kan udføres ved hjælp af dissekering, homogenisering, forbrænding og/eller opløsning af organer efterfulgt af væskescintillationstælling af opsamlede rester. Bestemte teknikker, som er på forskellige udviklingsstrin, f.eks. kvantitativ helkropsautoradiografi og mikroskopisk autoradiografi af receptor, kan vise sig at være nyttige til bestemmelse af fordelingen af et testkemikalie i organer og/eller væv (3) (4).
40. For andre eksponeringsveje end oral indsamles og analyseres specifikke væv, f.eks. lunger i inhalationsforsøg og hud i dermale forsøg. Se afsnit 74-78.

Metabolisme

41. Excreta (og plasma, hvis relevant) indsamles til identifikation og kvantificering af uforandret testkemikalie og uforandrede metabolitter som beskrevet i afsnit 44-49. Pooling af excreta med henblik på at lette identifikationen af metabolitter i en bestemt dosisgruppe accepteres. Det anbefales, at metabolitter fra hver tidsperiode profileres. Hvis det ikke er muligt på grund af manglende prøver og/eller radioaktivitet, kan pooling af urin og fæces på tværs af flere tidspunkter accepteres, men pooling på tværs af køn eller doser accepteres ikke. Der anvendes hensigtsmæssige kvalitative og kvantitative metoder til at analysere urin, fæces, udåndet radioaktivitet fra behandlede dyr og galde, hvis det er relevant.
42. Der bør ydes en rimelig indsats for at identificere alle metabolitter, der udgør 5 % eller mere af den administrerede dosis, og fastlægge et metabolisk system for testkemikaliet. Testkemikalier, der er karakteriseret i excreta som bestående af 5 % eller mere af den administrerede dosis, identificeres. Identifikation betyder den præcise strukturelle bestemmelse af komponenter. Identifikation opnås typisk ved at bruge co-kromatografi af metabolitter med kendte standarder ved hjælp af to forskellige systemer eller ved at bruge teknikker, der kan foretage positiv strukturel identifikation, som f.eks. massespektroskopi, kernemagnetisk resonans (NMR) osv. Hvis co-kromatografi anvendes, kan kromatografiske teknikker, der anvender samme stationære fase med to forskellige opløsningsmiddelsystemer, ikke anvendes til at foretage verifikation af metabolitidentitet ved hjælp af to teknikker, da metoderne ikke er uafhængige. Identifikation ved hjælp af co-kromatografi foretages ved hjælp af to forskellige og analytisk uafhængige systemer, f.eks. tyndtlagskromatografi (reverse og normal fase) (TLC) og højtydende væskechromatografi (HPLC). Hvis den kromatografiske adskillelse er af passende kvalitet, er yderligere bekræftelse ved hjælp af spektroskopi ikke nødvendig. Alternativt kan entydig identifikation også opnås ved at bruge metoder, der frembringer strukturelle oplysninger, som f.eks. væskechromatografi-massespektroskopi (LC-MS) eller væskechromatografi/tandem massespektroskopi (LC-MS/MS), gaskromatografi/massespektroskopi (GC-MS) og NMR-spektrometri.
43. Hvis identifikation af metabolitter, der udgør 5 % eller mere af den administrerede dosis, ikke er mulig, gives der en begrundelse/forklaring i den endelige rapport. Det kan være hensigtsmæssigt at identificere metabolitter, som udgør mindre end 5 % af den administrerede dosis, for at få en bedre forståelse af metaboliseringsvejen i forbindelse med fare- og/eller risikovurderingen af testkemikaliet. Strukturel bekræftelse skal så vidt muligt gives. Det kan omfatte profilering i plasma eller blod eller andet væv.

Udskillelse

44. Hastigheden og graden af udskillelse af den administrerede dosis bestemmes ved at måle den procentdel af dosen (radioaktiv), der er genfundet i urin, fæces og udåndet luft. Disse data vil også medvirke til at bestemme massebalance. De testkemikaliekvantiteter (radioaktivitet), der er elimineret i urin, fæces og udåndet luft, bestemmes med passende tidsintervaller (se afsnit 47-49). Forsøg med gentagne doser designes, så data om udskillelse kan indsamles med henblik på at opfylde målene i afsnit 26. Derved kan forsøgene sammenlignes med enkelt dosisforsøg.
45. Hvis et pilotforsøg har vist, at der ikke udskilles en signifikant mængde af testkemikaliet (radioaktivitet) (i henhold til afsnit 49) gennem udåndet luft, er det ikke nødvendigt at indsamle udåndet luft i hovedforsøget.
46. Hvert dyr placeres i et separat metabolismebur med henblik på indsamling af excreta (urin, fæces og udåndet luft). Efter hver indsamlingsperiode (se afsnit 47-49) skylles metabolismeburene med opløsningsmiddel (»burvask«) for at sikre maksimal genfindning af testkemikaliet (radioaktivitet). Indsamlingen af excreta afsluttes på dag 7, eller når mindst 90 % af den administrerede dosis er genfundet, alt efter hvad der forekommer først.
47. De samlede mængder af testkemikaliet (radioaktivitet) i urin bestemmes på mindst to tidspunkter på den første indsamlingsdag, hvoraf det ene skal være 24 timer efter dosering, og derefter dagligt indtil forsøgsafslutning. Der bør vælges mere end to indsamlingstidspunkter på dag 1 (f.eks. ved 6, 12 og 24 timer). Resultaterne af pilotforsøg analyseres for oplysninger om alternative eller yderligere indsamlingstidspunkter. Der gives en begrundelse for valg af indsamlingstidsplan.
48. De samlede mængder af testkemikaliet (radioaktivitet) i fæces bestemmes dagligt fra og med 24 timer efter dosering indtil forsøgsafslutning, medmindre pilotforsøg påviser alternative eller yderligere indsamlingstidspunkter. Der gives en begrundelse for valg af alternative indsamlingstidsplaner.
49. Indsamlingen af udåndet CO₂ og andre flygtige materialer kan afbrydes i et forsøg, hvis mindre end 1 % af den administrerede dosis findes i den udåndede luft i løbet af en indsamlingsperiode på 24 timer.

Forsøg vedrørende tidsforløb*Plasma-/blodkinetik*

50. Formålet med disse forsøg er at opnå estimater af grundlæggende TK-parametre [f.eks. C_{max} , T_{max} , halveringstid ($t_{1/2}$), AUC] for testkemikaliet. Disse forsøg kan gennemføres med en dosis eller mere sandsynligt med to eller flere doser. Dosis fastlægges ud fra karakteren af forsøget og/eller det undersøgte væv. Der skal evt. bruges kinetiske data til at afklare spørgsmål, som f.eks. testkemikaliet biotilgængelighed, og/eller afklare virkningen af dosen på clearance (f.eks. at afklare, om clearance mættes på en dosisafhængig måde).
51. Til disse forsøg anvendes der mindst fire dyr pr. køn pr. dosisgruppe. Der gives en begrundelse for kønnet af de valgte dyr. Det bør overvejes at bruge begge køn (4 handyr og 4 hundyr), hvis der foreligger beviser, som understøtter signifikante kønsrelaterede forskelle i toksicitet.
52. Efter administration af testkemikaliet (radioaktivt mærket) udtages blodprøver fra hvert dyr på passende tidspunkter ved hjælp af en hensigtsmæssig prøveudtagningsteknik. Volumen og antallet af blodprøver, der kan udtages pr. dyr, kan være begrænset af potentielle virkninger af gentagen prøvetagning på dyrets sundhed/fysiologi og/eller analysemetodens sensitivitet. Prøver analyseres for hvert enkelt dyr. Under visse omstændigheder (f.eks. karakterisering af metabolitter) kan det være nødvendigt at samle prøver fra flere dyr i en pool. Poolede prøver identificeres tydeligt, og der gives en forklaring. Hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes, kan analysen af total tilstedeværende radioaktivitet være tilstrækkelig. I så fald analyseres den totale radioaktivitet i fuldblod og plasma eller plasma og røde blodlegemer, således at blod-/plasmaforholdet kan beregnes. Under andre omstændigheder kan mere specifikke undersøgelser, der kræver identifikation af moderstof og/eller metabolitter eller vurdering af proteinbinding, være nødvendige.

Kinetik for andet væv

53. Formålet med disse forsøg er at fremskaffe oplysninger om tidsforløb for at afklare spørgsmål vedrørende f.eks. toksisk virkningsmåde, bioakkumulering og biopersistens via bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet i forskellige væv. Valget af væv og antallet af tidspunkter, der evalueres, afhænger af det undersøgte væv og den toksikologiske database for testkemikaliet. Designet af disse kinetiske forsøg vedrørende andet væv baseres på information fremskaffet som beskrevet i afsnit 37-40. Forsøgene kan omfatte enkelt dosering eller gentagen dosering. Der gives en detaljeret begrundelse for den valgte tilgang.
54. Årsagerne til at udføre kinetiske forsøg med andet væv kan omfatte:
- bevis for forlænget halveringstid i blod, hvilket antyder mulig akkumulering af testkemikaliet i forskellige væv
 - ønske om at undersøge, om der er opnået et steady state-niveau i bestemte væv (i forsøg med gentagen dosering, hvor der er opnået et tilsyneladende steady state-niveau for testkemikaliet i blod, kan man f.eks. også ønske at bekræfte, at der er opnået et steady state-niveau i målvæv).

55. For disse typer forsøg vedrørende tidsforløb administreres en passende dosis af testkemikaliet til mindst fire dyr pr. dosis pr. tidspunkt, og tidsforløbet for fordelingen i de udvalgte vævstyper overvåges. Der anvendes kun ét køn, medmindre der observeres kønsspecifik toksicitet. Om total radioaktivitet eller moderstof og/eller metabolitter analyseres, afhænger af det undersøgte spørgsmål. Fordeling i væv vurderes ved hjælp af hensigtsmæssige teknikker.

Enzyminduktion/-inhibition

56. Forsøg, der omhandler de mulige virkninger af enzyminduktion/-inhibition eller biotransformation af testkemikaliet i løbet af forsøget, kan være nødvendige i følgende tilfælde:
- 1) Tilgængelige beviser indikerer en sammenhæng mellem testkemikaliet biotransformation og øget toksicitet.
 - 2) De tilgængelige toksicitetsdata indikerer en ikke-lineær sammenhæng mellem dosis og metabolisme.
 - 3) Resultaterne af forsøg vedrørende identifikation af metabolitter påviser en potentielt toksisk metabolit, der muligvis er blevet produceret af en enzymbane, der er induceret af testkemikaliet.
 - 4) Til forklaring af virkninger, der påstås at hænge sammen med enzyminduktionsfænomener.

- 5) Hvis toksikologisk signifikante forandringer i testkemikaliets metaboliske profil observeres via in vitro- eller in vivo-eksperimenter med forskellige arter eller under forskellige betingelser, skal de involverede enzymer muligvis karakteriseres (f.eks. fase I-enzym, som f.eks. isoenzymer af det cytochrom P450-afhængige monooxygenasesystem, fase II-enzym, som f.eks. isoenzymer af sulfotransferase eller uridindiphosphat-glucuronosyltransferase, eller andre relevante enzymer). Disse oplysninger kan bruges til at evaluere relevansen af ekstrapolering mellem arter.
57. Der skal anvendes hensigtsmæssige forsøgsprotokoller med passende validering og begrundelse til at evaluere ændringer i TK relateret til testkemikaliets. Eksempler på forsøgsdesign omfatter gentagen dosering med ikke-mærket testkemikalie efterfulgt af en enkelt radioaktivt mærket dosis på dag 14 eller gentagen dosering med radioaktivt mærket testkemikalie og prøvetagning på dag 1, 7 og 14 med henblik på at bestemme metabolitprofiler. Gentagen dosering med radioaktivt mærket testkemikalie kan også give oplysninger om bioakkumulering (se afsnit 26).

SUPPLERENDE TILGANGE

58. Supplerende tilgange ud over de in vivo-forsøg, der er beskrevet i denne testmetode, kan give nyttige oplysninger om absorption, fordeling, metabolisme eller eliminering af et testkemikalie i visse arter.

Anvendelse af in vitro-oplysninger

59. Flere spørgsmål om metabolismen af testkemikaliets kan undersøges i in vitro-forsøg baseret på hensigtsmæssige testsystemer. Nyligt isolerede eller dyrkede hepatocytter og subcellulære fraktioner (f.eks. mikrosomer og cytosol eller S9-fraktion) fra leveren kan bruges til at studere mulige metabolitter. Lokal metabolisme i målorganet, f.eks. lunge, kan være interessant i forbindelse med risikovurdering. Til sådanne formål kan mikrosomfraktioner af målvæv være anvendelige. Forsøg med mikrosomer kan bruges til at undersøge potentielle køns- og livsfaseforskelle og karakterisere enzymparametre (K_m og V_{max}), som kan medvirke til at vurdere dosisafhængigheden af metabolisme i forhold til eksponeringsniveauer. Mikrosomer kan desuden hjælpe med at identificere de specifikke mikrosomenzymer, der er involveret i metabolismen af testkemikaliets, hvilket kan være relevant ved ekstrapolering mellem arter (se også afsnit 56). Potentialet for induktion af biotransformation kan også undersøges ved hjælp af subcellulære leverfraktioner (f.eks. mikrosomer og cytosol) fra dyr, der på forhånd er behandlet med det undersøgte testkemikalie, in vitro via forsøg med hepatocytinduktion eller fra specifikke cellelinjer, der udtrykker relevante enzymer. Under visse omstændigheder og hensigtsmæssige forhold kan det overvejes at anvende subcellulære fraktioner af menneskeligt væv til at bestemme potentielle artsforskelle, hvad angår biotransformation. Resultaterne af in vitro-undersøgelser kan også bruges til at udvikle PBTK-modeller (5).
60. In vitro-forsøg vedrørende dermal absorption kan give yderligere oplysninger, som kan karakterisere absorption (6).
61. Primære cellekulturer fra leverceller og friske vævsudsnit kan anvendes til at undersøge samme spørgsmål som levermikrosomer. I nogle tilfælde kan specifikke spørgsmål besvares ved hjælp af cellelinjer med defineret udtryk af det relevante enzym eller ved hjælp af konstruerede cellelinjer. I nogle tilfælde kan det være nyttigt at undersøge inhibitionen og induktionen af specifikke cytochrom P450-isozymer (f.eks. CYP1A1, 2E1, 1A2 m.fl.) og/eller fase II-enzym af moderstoffet ved hjælp af in vitro-forsøg. De indhentede informationer kan bruges i forbindelse med stoffer med tilsvarende struktur.

Brug af toksikokinetiske data fra toksicitetsforsøg som supplerende oplysninger

62. Analyse af blod-, vævs- eller excretaprøver fremskaffet i forbindelse med gennemførelsen af andre toksicitetsforsøg kan tilvejebringe data om biotilgængelighed, ændringer i plasmakoncentration over tid (AUC, C_{max}), bioakkumuleringspotentiale, clearance-hastigheder og køns- eller livsfasebetingede ændringer i metabolisme og kinetik.
63. Overvejelsen af forsøgsdesignet kan omfatte besvarelse af spørgsmål vedrørende: mætning af absorptions-, biotransformations eller udskillelsesveje ved højere dosisniveauer, funktionen af nye metaboliske veje ved højere doser og begrænsningen af toksiske metabolitter til højere doser.
64. Andre overvejelser i forbindelse med farevurdering kan omfatte spørgsmål, som f.eks.:
- aldersrelateret sensitivitet som følge af forskelle i blod-hjernebarrierens tilstand samt nyre- og eller detoxificeringskapaciteten
 - sensitivitet for delpopulation som følge af forskelle i biotransformationskapacitet eller andre TK-forskelle
 - grad af eksponering af foster ved transplacentalt overførsel af kemikalier eller af den nyfødte via laktation.

Brug af toksikokinetisk modellering

65. Toksikokinetiske modeller kan bruges til forskellige formål i forbindelse med fare- og risikovurdering, som f.eks. forudsigtelse af systemisk eksponering og intern vævsdosis. Specifikke spørgsmål vedrørende virkningsmåde kan undersøges, og disse modeller kan danne grundlaget for ekstrapolering på tværs af arter, eksponeringsveje, doseringsmønstre og risikovurdering for mennesker. Data, som kan bruges til at udvikle PBTK-modeller for et testkemikalie for en given art, omfatter 1) fordelingskoefficienter, 2) biokemiske konstanter og fysiologiske parametre, 3) absorptionsparametre, der er specifikke for eksponeringsvejen, og 4) kinetiske in vivo-data til modevaluering [f.eks. clearanceparametre for relevante (> 10 %) udskillellesveje samt K_m og V_{max} for metabolisme]. De forsøgsdata, der bruges i forbindelse med modeludvikling, skal genereres med videnskabeligt forsvarlige metoder, og modelresultaterne skal evalueres. Parametre, der er specifikke for testkemikaliets art, f.eks. absorptionshastigheder og konstanter for fordeling mellem blod/væv og metabolisk hastighed, bestemmes ofte for at lette udvikling af generelle eller fysiologisk baserede modeller (7).

DATA OG RAPPORTERING

66. Forsøgsrapporten bør indeholde en indholdsfortegnelse.

Selve rapporten

67. Selve rapporten skal indeholde de oplysninger, der er omfattet af denne testmetode, opdelt i følgende kapitler og afsnit:

Resumé

68. Dette afsnit af forsøgsrapporten skal indeholde et resumé af forsøgsdesignet og en beskrivelse af de anvendte metoder. I afsnittet fremhæves også de centrale fund med hensyn til massebalance, karakter og omfang af metabolitter, vævsrester, clearance-hastighed, bioakkumuleringspotentiale, kønsbetingede forskelle osv. Resuméet skal være så detaljeret, at fundene kan evalueres.

Indledning

69. I dette afsnit af rapporten anføres forsøgsmål, -rationale og -design, og der gives relevante referencer og baggrundsoplysninger.

Materialer og metoder

70. Dette afsnit i rapporten skal indeholde detaljerede beskrivelser af alle relevante forhold, herunder:

a) Testkemikalie

I dette underafsnit identificeres testkemikaliets kemisk navn, molekylærstruktur, kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af dets kemiske sammensætning, kemisk renhed, samt type og kvantiteter af evt. urenheder, hvis det er muligt. Det skal også indeholde oplysninger om fysisk-kemiske egenskaber, herunder fysisk tilstand, farve, opløselighed og/eller fordelingskoefficient, stabilitet og ætsende virkning, hvis det er relevant. Hvis det er relevant, anføres oplysninger om isomere. Hvis testkemikaliets radioaktivt mærket, anføres følgende oplysninger om følgende i dette underafsnit: radionukleids type, mærkets placering, specifik aktivitet og radiokemisk renhed.

Evt. vehikel, fortyndingsmidler, suspensionsmidler og blødgøringsmidler eller andre materialer, der anvendes til administration af testkemikaliets, anføres eller beskrives.

b) Forsøgsdyr

I dette afsnit anføres oplysninger om forsøgsdyrene, herunder udvælgelse af og begrundelse for art, stamme og alder ved forsøgets begyndelse, køn samt kropsvægt, sundhedsstatus og dyreopdræt og -sundhed.

c) Metoder

Dette afsnit skal indeholde detaljer om det anvendte forsøgsdesign og de anvendte metoder. Det skal bl.a. indeholde:

- 1) en begrundelse for evt. ændring af eksponeringsvej og eksponeringsbetingelser

- 2) en begrundelse for valget af dosisniveauer
 - 3) en beskrivelse af evt. pilotforsøg, der er indgår i forsøgsdesignet for de opfølgende forsøg; baggrundsdata for pilotforsøg indgives
 - 4) en beskrivelse af tilberedningen af doseringsopløsningen og typen af evt. opløsningsmiddel eller vehikel
 - 5) antal behandlingsgrupper og dyr i hver gruppe
 - 6) dosisniveauer og -volumen (og dosens specifikke aktivitet, når radioaktivitet anvendes)
 - 7) administrationsveje og -metoder
 - 8) doseringshyppighed
 - 9) evt. fasteperiode
 - 10) total radioaktivitet pr. dyr
 - 11) håndtering af dyr
 - 12) prøvetagning og -håndtering
 - 13) analysemetoder anvendt til separation, kvantificering og identifikation af metabolitter
 - 14) påvisningsgrænse for de anvendte metoder
 - 15) andre anvendte forsøgsmålinger og -fremgangsmåder (herunder validering af metoder til metabolitanalyse).
- d) Statistisk analyse:

Hvis statistisk analyse bruges til at analysere forsøgsfund, skal rapporten indeholde tilstrækkelige oplysninger om den anvendte analysemetode og det anvendte computerprogram, således at en uafhængig reviewer/statistiker kan revurdere og gentage analysen.

Hvis der bruges systemer, som modellerer forsøg, som f.eks. PBTK, skal præsentationen af modeller indeholde en udførlig beskrivelse af modellen, således at der kan foretages en uafhængig gentagelse og validering af modellen (se afsnit 65 og tillæg: Definitioner).

Resultater

71. Alle data opsummeres og opstilles i tabelform med relevant statistisk evaluering og beskrives i afsnittets tekst. Data om radioaktivitetsmåling opsummeres og fremlægges, for så vidt det er relevant for forsøget, typisk som mikrogram- eller milligram-ækvivalenter pr. prøvemasse, men andre enheder kan anvendes. I dette afsnit indsættes grafiske illustrationer af fundene, reproduktioner af repræsentative kromatografi- og spektrometridata, identifikation/kvantificering af metabolitter og foreslåede metaboliske veje, herunder metabolitternes molekylærstruktur. Følgende oplysninger angives desuden i dette afsnit, for så vidt de er relevante:
- 1) kvantitet og procentdel af genfunden radioaktivitet i urin, fæces, udåndet luft samt urin og fæces i vaskevand fra bure
- I forbindelse med dermale forsøg angives også data om genfinding af testkemikallet fra behandlet hud, hudvask og tilbageværende radioaktivitet i hudbeskyttelse og metabolismebur samt resultater af forsøg med hudvask. Se afsnit 74-77 for en yderligere diskussion.
- I forbindelse med inhalationsforsøg anføres også data om genfinding af testkemikallet i lunger og nasale væv (8). Se afsnit 78 for en yderligere diskussion

- 2) fordeling i væv rapporteret som procentdel af administreret dosis og koncentration (mikrogram-ækvivalenter pr. g væv), og forhold mellem væv og blod eller væv og plasma
- 3) materialebalance udviklet fra hvert forsøg, der omfatter analyse af kropsvæv og excreta
- 4) plasmakoncentrationer og toksikokinetiske parametre (biotilgængelighed, AUC, C_{max}, T_{max}, clearance og halveringstid) efter administration via de relevante eksponeringsveje
- 5) hastighed og grad af absorption af testkemikallet efter administration via de relevante eksponeringsveje
- 6) kvantiteter af testkemikallet og metabolitter (rapporteret som en procentdel af den administrerede dosis) indsamlet i excreta
- 7) reference til data i tillæg, der indeholder data om individuelle dyr for alle undersøgte effektparametre (f.eks. dosisadministration, genfundne procent, koncentrationer, TK-parametre osv.)
- 8) illustration af de foreslåede metaboliske veje og metabolitternes molekylærstruktur.

Diskussion og konklusioner

72. I dette afsnit skal forfatterne:

- 1) anføre en foreslået metabolisk vej baseret på resultaterne af metabolismen og elimineringen af testkemikallet
- 2) diskutere potentielle arts- og kønsspecifikke forskelle med hensyn til testkemikallets eliminering og/eller biotransformation
- 3) opstille data om og diskutere identifikationen og omfanget af metabolitter, clearance-hastigheder, bioakkumuleringspotentiale og koncentration af moderstof- og/eller metabolitresten i væv samt mulige dosisbetingede ændringer i TK-parametre, for så vidt det er relevant
- 4) i dette afsnit anføre alle relevante TK-data indhentet i forbindelse med gennemførelsen af toksicitetsforsøg
- 5) angive en præcis konklusion, der underbygges af forsøgsfundene
- 6) efter behov indsætte yderligere relevante afsnit.

73. I yderligere afsnit indsættes understøttende bibliografiske oplysninger, tabeller, figurer, tillæg osv.

ALTERNATIVE EKSPONERINGSVEJE

Dermal

Dermal behandling

74. I dette afsnit gives der specifikke oplysninger om undersøgelsen af toksikokinetikken for testkemikallet ved dermal eksponering. Med hensyn til dermal absorption henvises der til kapitel B.44 i dette bilag [Hudabsorption: in vivo-metode (9)]. I forbindelse med andre effektparametre, f.eks. fordeling og metabolisme, kan denne testmetode B.36 anvendes. Der anvendes et eller flere dosisniveauer ved dermal behandling. Testkemikallet (f.eks. ufortyndet, fortyndet eller formuleret materiale, der indeholder teststoffet og påføres huden) skal være det samme (eller en realistisk erstatning herfor) som det, mennesker eller andre potentielle målarter kan blive eksponeret for. Dosisniveauer vælges i overensstemmelse med afsnit 20-26 i denne testmetode. Faktorer, der kan tages i betragtning ved valg af dermal dosis, omfatter forventet human eksponering og/eller doser, hvor toksicitet er observeret i andre forsøg vedrørende dermal toksicitet. De dermale doser skal om nødvendigt opløses i et egnet vehikel og påføres i en mængde, der er tilstrækkelig til at levere doserne. Kort før forsøget indledes, klippes forsøgsdyrene på ryggen. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden, da det kan ændre dens permeabilitet. Mindst 10 % af kroppens overflade skal gøres klar til påføring af testkemikallet. I tilfælde af stærkt toksiske kemikalier kan

området være mindre end 10 %, men en så stor del af området som muligt bør dækkes med et tyndt og ensartet lag. Det samme behandlingsområde anvendes til alle dermale testgrupper. De behandlede områder beskyttes med en passende kappe, som fastgøres. Dyrene anbringes enkeltvis i bure.

75. Der gennemføres et forsøg med hudvask med henblik på at vurdere den mængde, af den anvendte dosis af testkemikaliet, der kan fjernes fra huden ved at vaske det behandlede hudområde med mild sæbe og vand. Dette forsøg kan også hjælpe med at bestemme massebalancen, når testkemikaliet administreres ved dermal applikation. I dette forsøg med hudvask påføres en enkelt dosis af testkemikaliet på to dyr. Dosis vælges i overensstemmelse med afsnit 23 i denne testmetode (se også afsnit 76 for en diskussion af hudkontaktid). De mængder af testkemikaliet, der genfindes i vaskevandet, bestemmes med henblik på at vurdere, hvor effektivt testkemikaliet fjernes ved vask.
76. Medmindre det ikke er muligt på grund af ætsning, påføres testkemikaliet huden og forbliver der i mindst seks timer. Når beskyttelseskappen fjernes, vaskes det behandlede område ved hjælp af den fremgangsmåde, der er beskrevet i forsøget med hudvask (se afsnit 75). Både beskyttelseskappe og vaskevand analyseres for rester af testkemikaliet. Ved afslutningen af forsøgene aflives alle dyrene humanitært i overensstemmelse med (2), og den behandlede hud fjernes. Et relevant udsnit af den behandlede hud analyseres for rester af testkemikaliet (radioaktivitet).
77. I forbindelse med toksikokinetisk vurdering af lægemidler kan der i overensstemmelse med den gældende lovgivning anvendes forskellige fremgangsmåder.

Inhalation

78. Der anvendes en enkelt koncentration (eller flere, hvis det er nødvendigt) af testkemikaliet. Koncentrationerne vælges i overensstemmelse med afsnit 20-26 i denne testmetode. Inhalationsbehandlinger gennemføres ved hjælp af et apparat med en »næsekegle« eller anordning til behandling af kun hovedet for at forhindre absorption via andre eksponeringsveje (8). Hvis andre betingelser for inhalationseksponering anvendes, dokumenteres begrundelsen for ændringen. Varigheden af eksponering ved inhalation defineres. Eksponeringsvarigheden er typisk 4-6 timer.

LITTERATUR:

- (1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.
- (3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.
- (4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.
- (5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.
- (6) Kapitel B.45 i dette bilag, Hudabsorption: in vitro-metode.
- (7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No. 9. Genève, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

-
- (9) Kapitel B.44 i dette bilag, Hudabsorption: in vivo-metode.
- (10) Barton HA, et al. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (11) Gibaldi M og Perrier D, (1982), *Pharmacokinetics*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.
-

Tillæg

DEFINITIONER

Absorption: proces(ser) for optagelse af kemikalier i eller på tværs af væv. Absorption henviser til moderstoffet og alle dets metabolitter. Må ikke forveksles med »biotilgængelighed«.

Akkumulering (bioakkumulering): Forøgelse af mængden af et testkemikalie over tid i væv (normalt fedtvæv, efter gentagen eksponering); hvis tilførslen af et testkemikalie til kroppen er større end den hastighed, hvormed det elimineres, akkumulerer organismen testkemikaliets, og der kan opnås toksiske koncentrationer af et testkemikalie.

ADME: akronym for »Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion« (absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse«.

AUC: (område under koncentration-tidskurven for plasma): området under kurven i et diagram over koncentrationen af et testkemikalie i plasma over tid. Det repræsenterer den samlede mængde af testkemikaliets, der absorberes af kroppen i en fastsat periode. Under lineære betingelser er AUC (fra nultid til uendeligt) proportional med den samlede mængde af testkemikaliets, der absorberes af kroppen, uanset absorptionshastighed.

Autoradiografi: (helkropsautoradiografi): bruges til kvalitativt eller kvantitativt at lokalisere et radioaktivt testkemikalie i væv. I denne teknik anvendes røntgenfilm og nu også digital fosfor-imaging til at visualisere radioaktivt mærkede molekyler eller fragmenter af molekyler ved at registrere den stråling, der udsendes fra det undersøgte objekt. Kvantitativt helkropsautoradiografi har visse fordele sammenlignet med organdissekering, hvad angår evaluering af testkemikaliets fordeling og vurderingen af den samlede genfindning og opløsning af radioaktivt materiale i væv. Det er f.eks. en vigtig fordel, at teknikken kan bruges i forbindelse med pigmenterede dyremodeller til at vurdere en mulig sammenhæng mellem testkemikaliets og melanin, som kan binde visse molekyler. Teknikken kan give anvendelige helkropsbilleder af bindingssteder med høj kapacitet/lav affinitet, men den kan være mindre effektiv til at genkende specifikke steder, som f.eks. receptorbindingssteder, hvor detektering kræver relativt høj opløsning og sensitivitet. Når autoradiografi anvendes, gennemføres forsøg med henblik på at bestemme massebalancen af det administrerede stof som en separat gruppe eller i et forsøg, der er adskilt fra forsøget vedrørende fordeling i væv, hvor alle excreta (herunder evt. også udåndet luft) og hele kadavre homogeniseres og analyseres ved hjælp af væskescintillationstælling.

Udskillelse via galde: Udskillelse via galdegangen.

Bioakkumulering: se »Akkumulering«.

Biotilgængelighed: fraktion af den administrerede dosis, der når det systemiske kredsløb eller gøres tilgængeligt på stedet for fysiologisk aktivitet. Normalt henviser biotilgængeligheden af et testkemikalie til moderstoffet, men kan også henviser til dets metabolit. Det vedrører kun én kemisk form. *Bemærk:* Biotilgængelighed og absorption er ikke det samme. Forskellen mellem f.eks. oral absorption (dvs. tilstedeværelse i tarmvæg og portalkredsløb) og biotilgængelighed (dvs. tilstedeværelse i systemisk blod og væv) kan opstå ved kemisk nedbrydning som følge af bl.a. metabolisme i tarmvæg eller transport af efflux tilbage til tarm lumen eller præsystemisk metabolisme i leveren (10). Biotilgængelighed af den toksiske komponent (moderstof eller en metabolit) er en afgørende parameter, når en intern værdi af den eksterne NOAEL eller BMD (anvendt dosis) skal udledes i forbindelse med vurdering af risiko for mennesker (ekstrapolering fra høj til lav dosis eller ekstrapolering mellem administrationsveje). I forbindelse med levervirkninger efter oral administration er oral absorption tilstrækkelig. For alle andre virkninger end ved indgangsstedet er biotilgængelighed generelt en mere pålidelig parameter til brug i risikovurdering end absorption.

Biopersistens: se »Persistens«.

Biotransformation: kemisk (enzym)omdannelse af et undersøgt testkemikalie til et andet kemikalie i kroppen. Synonymt med »metabolisme«.

C_{max}: enten maksimal (spids)koncentration af blod (plasma/serum) efter administration eller maksimal (spids)udskillelse (i urin eller fæces) efter administration.

Clearance-hastighed: kvantitativ måling af den hastighed, hvormed et testkemikalie fjernes fra blod, plasma eller et bestemt væv pr. tidsenhed.

Rum: strukturel eller biokemisk del (eller enhed) af en krop, et væv eller en celle, der er adskilt fra resten.

Afgiftningsveje: serie af trin, der fører til eliminering af toksiske kemikalier i kroppen, enten ved metabolisk ændring eller udskillelse.

Fordeling: spredning af et testkemikalie og dets afledte stoffer i en organisme.

Enzymer/isozymer: proteiner, der katalyserer kemiske reaktioner. Isozymer er enzymer, der katalyserer lignende kemiske reaktioner, men som har en anden aminosyresekvens.

Enzymparametre: K_m : Michaelis-konstant og V_{max} : maksimal velocitet.

Udskillelse: proces(ser), hvorved et administreret testkemikalie og/eller dets metabolitter fjernes fra kroppen.

Eksogent: indført fra eller produceret uden for organismen eller systemet.

Ekstrapolering: følgeslutning af en eller flere ukendte værdier på grundlag af det, der er kendt, eller som er observeret.

Halveringstid ($t_{1/2}$): den tid, der går, inden koncentrationen af testkemikaliat er reduceret til det halve i et rum. Værdien henviser typisk til koncentrationen i plasma eller mængden af testkemikaliat i hele kroppen.

Induktion/enzyminduktion: enzymsyntese som respons på miljøpåvirkende eller inducerende molekyle.

Linearitet/lineær kinetik: En proces, der er lineær med hensyn til kinetik, når alle overførselshastigheder mellem rum er proportionale med de tilstedeværende mængder eller koncentrationer, dvs. første orden. Som følge deraf er clearance- og fordelingsvolumener konstante, og det samme gælder halveringstid. De opnåede koncentrationer er proportionale med doseringshastigheden (eksponering), og akkumulering er mere forudsigelig. Linearitet/ikke-linearitet kan vurderes ved at sammenligne relevante parametre, f.eks. AUC, efter forskellige doser eller efter enkelt og gentagen eksponering. Manglende dosisafhængighed kan indicere mætning af de enzymer, der er involveret i metabolismen af stoffet. En forøgelse af AUC efter gentagen eksponering sammenlignet med enkelt eksponering kan indicere inhibition af metabolisme, og en reduktion i AUC kan indicere induktion af metabolisme [se også (11)].

Massebalance: opgørelse af det testkemikalie, der tilføres og forlader systemet.

Materialebalance: se »Massebalance«.

Toksicitetsmekanisme (-måde)/virkningsmekanisme (-måde): virkningsmekanisme er specifikke biokemiske interaktioner, gennem hvilke et testkemikalie producerer sin virkning. Virkningsmåde henviser til mere generelle veje, der fører til et testkemikalies toksicitet.

Metabolisme: synonymt med »biotransformation«.

Metabolitter: produkter af metabolisme eller metaboliske processer.

Oral absorption: den procentdel af dosen af testkemikalie, der absorberes fra administrationsstedet (f.eks. mave-tarmkanalen). Denne kritiske parameter kan bruges til at bestemme den fraktion af det administrerede testkemikalie, der når portalvenen og efterfølgende leveren.

Fordelingskoefficient: kaldes også distributionskoefficienten og er et mål for et kemikalies differentierede opløselighed i to opløsningsmidler.

Peak-niveau i blod (plasma/serum): Maksimal (spids)koncentration i blod (plasma/serum) efter administration (se også » C_{max} «).

Persistens (biopersistens): Langvarig tilstedeværelse af et kemikalie (i et biologisk system) som følge af resistens mod nedbrydning/eliminering.

Analogislutning: information om effektparameter for et eller flere kemikalier bruges til at forudsige effektparameteren for målkemikaliat.

Mikroskopisk autoradiografi af receptor (eller Mikroautoradiografi af receptor): denne teknik kan bruges til at undersøge xenobiotisk interaktion med bestemte vævssteder eller cellepopulationer, f.eks. i forsøg vedrørende receptorbinding eller specifikke virkningsmåder, der kræver høj opløsning og høj sensitivitet, som ikke kan opnås med andre teknikker, som f.eks. helkropsautoradiografi.

Administrationsvej (oral, intravenøs, dermal, inhalation osv.): henviser til den måde, hvorpå kemikalier indgives i kroppen (f.eks. oralt med mavesonde, oralt via foderet, dermalt, ved inhalation, intravenøst osv.).

Mætning: tilstand, hvorved en eller flere af de kinetiske processer (f.eks. absorption, metabolisme eller clearance) er på deres højeste (dvs. »mættede«).

Sensitivitet: en metode eller et instruments evne til at skelne mellem måleresultater, som repræsenterer forskellige niveauer af en undersøgt variabel.

Steady state-niveau i blod (plasma): ikke-ligevægtstilstand for et åbent system, hvor alle kræfter, der påvirker systemet, præcist opvejes af modsatte kræfter på en sådan måde, at alle dets komponenter er stationære i koncentration, selv om stoffet strømmer gennem systemet.

Systemmodellering (fysiologibaseret toksikokinetisk, farmakokinetisk, fysiologibaseret farmakokinetisk, biologisk osv.): abstrakt model, der bruger matematisk sprog til at beskrive systemets funktion.

Målvæv: væv, hvor den primære skadelige virkning af en toksikant manifesteres.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Fordeling i væv: reversibel bevægelse af et testkemikalie fra et sted i kroppen til et andet. Fordeling i væv kan undersøges ved hjælp af organdissekering, homogenisering, forbrænding og væskescintillationstælling eller kvalitativ og/eller kvantitativ helkropsautoradiografi. Førstnævnte kan bruges til at fremskaffe oplysninger om koncentration og genfundne procentdel i væv og resten af kadaveret af de samme dyr, men ikke oplysninger om opløsning for alle væv, og kan have en samlet genfindning, der er mindre end ideel (< 90 %). Se definitionen af sidstnævnte ovenfor.

T_{max}: tid til at nå C_{max}.

Toksikokinetik (farmakokinetik): undersøgelse af absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse af kemikalier over tid.

Validering af modeller: proces, hvor det vurderes, om en model er egnet til ensartet at beskrive de tilgængelige toksikokinetiske data. Modeller kan evalueres ved statistisk og visuelt at sammenligne modelforudsigelser med forsøgs-værdier i forhold til en fælles uafhængig variabel (f.eks. tid). Omfanget af evaluering begrundes på baggrund af den tiltænkte anvendelse af modellen.«

8) Kapitel B.52 tilføjes:

»B.52. AKUT TOKSICITET (INHALATION) — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 436 (2009). Den første TG 403 for akut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 og er siden blevet revideret (se kapitel B.2 i dette bilag (1)). Efter vedtagelsen af akut toksicitetsklassemetoden (oral) (kapitel B.1.B i dette bilag) (5) vurderede man, at en akut toksicitetsklassemetode (inhalation) (ATC) skulle udvikles (2) (3) (4). En retrospektiv resultatvurdering af ATC-testmetoden for akut toksicitet ved inhalation viste, at metoden med fordel kan anvendes i forbindelse med klassificering og mærkning (6). ATC-testmetoden for inhalation er en trinvis metode, hvor der anvendes faste målkoncentrationer til at rangordne toksiciteten af testkemikallet. Letalitet er en central effektparameter, men dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser eller er døende, aflives humanitært for at mindske deres lidelser. Vejledning om parametre for human behandling af dyr findes i OECD Guidance Document No. 19 (7).
2. Vejledning i udførelse og fortolkning af forsøgene i forbindelse med denne testmetode findes i Guidance Document No. 39 (GD 39) (8).
3. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i tillæg 1 og GD 39 (8).
4. Testmetoden giver oplysninger om de farlige egenskaber og gør det muligt at rangordne og klassificere testkemikallet i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (9). Hvis der kræves punkttestimater af LC₅₀-værdier eller analyser af koncentration-respons, anvendes kapitel B.2 i dette bilag (1) som testmetode. Yderligere vejledning i valg af testmetode findes i GD 39 (8). Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af særlige materialer, som f.eks. tungtopløselige isometriske eller fiberholdige materialer eller fremstillede nanomaterialer.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Inden test i overensstemmelse med denne metode overvejes, bør alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliets, herunder eksisterende forsøg, hvis data understøtter, at der ikke udføres yderligere test, overvejes af testlaboratoriet med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Oplysninger, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige arter, stammer, køn, eksponeringsformer og testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede stoffer. Koncentrationer, der forventes at forvolde stærk smerte og lidelse, på grund af ætsende ⁽¹⁾ eller stærkt irriterende virkning, bør ikke testes ved hjælp af denne testmetode [se GD 39 (8)].

TESTENS PRINCIP

6. Metoden bygger på en trinvis fremgangsmåde, hvor der opnås tilstrækkelig information om teststoffets akutte toksicitet ved inhalation i en eksponeringsperiode på fire timer til, at det kan klassificeres. Andre eksponeringsvarigheder kan anvendes for at opfylde konkrete myndighedsbestemmelser. For hver af de fastlagte koncentrationstrin anvendes der tre dyr af hvert køn. Afhængigt af dyrenes dødelighed og/eller døende tilstand kan to trin være nok til at vurdere testkemikaliets akutte toksicitet. Hvis det dokumenteres, at det ene køn er mere modtageligt end det andet, kan testen fortsættes med kun det mest modtagelige køn. Resultatet af det forudgående trin afgør det efterfølgende trin, f.eks.:

a) ingen yderligere testning nødvendig

b) testning af tre dyr pr. køn eller

c) testning af seks dyr af det mest modtagelige køn, dvs. at kun de laveste estimater for toksisk klasse baseres på seks dyr pr. testkoncentrationsgruppe, uanset køn.

7. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, bør aflives humanitært og betragtes ved fortolkningen af testresultaterne på samme måde som dyr, der er døde under testen. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (7).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

8. Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Den foretrukne art er rotter, og der bør gives begrundelse, hvis en anden art anvendes.

Forberedelse af dyrene

9. Hunddyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På eksponeringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem 8 og 12 uger gamle, og deres kropsvægt bør være inden for $\pm 20\%$ af gennemsnitsvægten for hvert køn af tidligere eksponerede dyr i samme alder. Dyrene udtages på tilfældig måde og mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres. Dyrene holdes i deres bure i mindst fem dage, inden testen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene. Dyrene tilvænnes også testudstyret i en kort periode inden testen, da det vil mindske stress forårsaget af introduktionen til et nyt miljø.

Dyreopdræt og -sundhed

10. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødigt fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænnning til fastspændingsslangerne ikke

⁽¹⁾ Evalueringen af ætsende virkning kan af eksperter ved hjælp af dokumentation, som f.eks. erfaringer fra mennesker og dyr, eksisterende (in vitro-) data, f.eks. kapitel B.40 (10) og B.40.A (11) i dette bilag eller OECD TG 435 (12), pH-værdier, information fra lignende stoffer eller andre relevante data.

nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at test aerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

Inhalationskamre

11. Karakteren af testkemikaliets og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (8).

EKSPONERINGSBETINGELSER

Administration af koncentrationer

12. Der anbefales en fast eksponeringsvarighed på fire timer, ekskl. ækvilibreringstid. Der kan være behov for andre varigheder for at opfylde specifikke krav. Dette begrundes dog i forsøgsrapporten [se GD 39 (8)]. Dyr, der eksponeres i kamre til hele kroppen, bør holdes i individuelle bure for at undgå, at de indtager testkemikaliets som følge af soignering af de andre dyr. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.
13. Dyr eksponeres for testkemikaliets i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysiske-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliets. Hygroscopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer.

Partikelstørrelsesfordeling

14. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 4 μm med en geometrisk standardafvigelse (σ_g) i området fra 1,5 til 3,0 (8) (13) (14). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler, fibre og hygroscopiske materialer (som udvides i luftvejenes fugtige miljø) kan overstige standarden.

Fremstilling af testkemikalie i vehikel

15. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe et testkemikalie med den rigtige koncentration og partikelstørrelse i atmosfæren. Generelt foretrækkes vand. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at opnå den krævede partikelstørrelsesfordeling. Det skal dog omhyggeligt sikres, at testkemikaliets ikke dekomponerer eller ændres. Hvis mekaniske processer menes at have ændret teststoffets sammensætning (f.eks. ekstreme temperaturer som følge af friktion under formaling), bør testkemikaliets sammensætning kontrolleres analytisk. Kontaminering af testkemikaliets skal undgås. Det er ikke nødvendigt at teste granulat, der ikke er letsmuldrrende, og som netop er formuleret, så det ikke kan inhaleres. Der bør anvendes en slidtest til at dokumentere, at der ikke frembringes respirable partikler under håndteringen af granulat. Hvis en slidtest frembringer respirable partikler, bør der udføres en inhalationstoksicitetstest.

Kontroldyr

16. En sideløbende negativ (luft)kontrolgruppe er ikke nødvendig. Hvis et andet vehikel end vand bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe kun anvendes, hvis historiske inhalationstoksicitetsdata ikke foreligger. Hvis et toksicitetsforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration. Der er derfor ikke brug for en vehikelkontrol.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

Luftgennemstrømning i kammer

17. Luftgennemstrømningen gennem kammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Overvågningen af koncentrationen (eller stabiliteten) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for generering af atmosfæren. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås, hvis

luftgennemstrømningen gennem eksponeringssystemet ikke er tilstrækkelig til at tilvejebringe en dynamisk gennemstrømning i den kemiske testatmosfære. Der er fastlagte metodologier, der kan bruges til at påvise, at genindånding ikke finder sted under de valgte driftsbetingelser (8) (15). Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at disse standarder ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles.

Kammerets temperatur og relative fugtighed

18. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres mindst tre gange ved varigheder af op til fire timer og hver time ved kortere varigheder. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliet indvirkning på testmetoden.

Testkemikalie: nominel koncentration

19. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

Testkemikalie: faktisk koncentration

20. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet ved dyrenes vejtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode. Målkoncentrationer, nominelle koncentrationer og faktiske koncentrationer angives i forsøgsrapporten, men kun de faktiske koncentrationer bruges i de statistiske analyser til at beregne letale koncentrationer.
21. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).
22. Eksponeringsatmosfæren holdes så konstant som muligt og overvåges kontinuerligt og/eller i intervaller afhængigt af analysemetoden. Hvis intervalbaseret prøveudtagning anvendes, bør der udtages atmosfæreprøver i kammeret mindst to gange i løbet af et forsøg med en varighed på fire timer. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan en prøve udtages over hele eksponeringsperioden. Hvis der forekommer markante udsving fra prøve til prøve, bør der anvendes fire prøver pr. eksponering for de næste testede koncentrationer. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middeldkoncentrationen i kammeret med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer (t_{95}) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres, og det omfatter den tid, der kræves for at opnå t_{95} . Vejledning i beregning af t_{95} findes i GD 39 (8).
23. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af formålsbestemte slutprodukter/apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer, og der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for den samlede blanding og ikke kun for det aktive stof eller komponenten (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (8).

Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling

24. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst to gange i løbet af hver eksponering på fire timer ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse. Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlings effektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (8)]. Hvis ækvivalens kan påvises i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærd træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage en eksponering. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser (se afsnit 14).

FREM GANGSMÅDE**Hovedforsøg**

25. Der anvendes tre dyr pr. køn eller seks dyr af det mest modtagelige køn på hvert trin. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Det koncentrationsniveau, der anvendes som startdosis, vælges blandt de fire fastsatte niveauer, og det indledende koncentrationsniveau skal være det, der med størst sandsynlighed forventes at fremkalde toksicitet i nogle af de doserede dyr. Forsøgsplanerne for gasser, dampe og aerosoler (anført i tillæg 2-4) repræsenterer test med afskæringsværdierne for CLP-kategori 1-4 (9) for gasser (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (tillæg 2), for dampe (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (tillæg 3) og for aerosoler (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (tillæg 4). Kategori 5, som ikke er gennemført i forordning (EF) nr. 1272/2008 (9), vedrører koncentrationer over de pågældende grænsekonzentrationsniveauer. For hver startkoncentration gælder den pågældende forsøgsplan. I forsøgsplanen følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr, indtil en kategorisering kan foretages.
26. Tidsintervallet mellem eksponeringsgrupperne bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsættelse, varighed og sværhed. Eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau udsættes, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Der bør gå 3-4 dage mellem eksponeringerne på hvert koncentrationsniveau for at få den nødvendige tid til at iagttage en eventuel forsinket toksisk virkning. Tidsintervallet kan korrigeres efter behov, f.eks. hvis den opnåede respons er inkonklusiv.

Grænsetest

27. En grænsetest bruges, når testkemikallet vides eller forventes at være stort set ikke-toksisk, dvs. det fremkalder toksisk respons, der kun ligger over den fastsatte grænsekonzentration. Oplysninger om testkemikallets toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede stoffer eller blandinger, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om testkemikallets toksicitet, eller når testkemikallet forventes at være toksisk, bør hovedforsøget udføres [se GD 39 (8) for yderligere vejledning].
28. Ved hjælp af den sædvanlige fremgangsmåde eksponeres tre dyr pr. køn eller seks dyr af det mest modtagelige køn for koncentrationer på henholdsvis 20 000 ppm for gasser, 20 mg/l for dampe og 5 mg/l for støv/tåge (hvis det er muligt). Dette udgør grænsetesten for denne testmetode. Ved test af aerosoler bør det primære mål være at opnå en respirabel partikelstørrelse (dvs. MMAD på 1-4 µm). For de fleste testkemikalier er det muligt ved en koncentration på 2 mg/l. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (8)]. I henhold til GHS (16) bør test, der overstiger en grænsekonzentration, undgås af hensyn til dyrevelfærd. Test i GHS-kategori 5 (16), som ikke er gennemført i forordning (EF) nr. 1272/2008 (9), bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed, og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden grænsetesten, så det sikres, at betingelserne i kammeret for en grænsetest kan opnås.

OBSERVATIONER

29. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk i eksponeringsperioden. Efter eksponering bør kliniske observationer foretages mindst to gange på eksponeringsdagen eller hyppigere, hvis det begrundes af dyrenes respons på behandlingen, og derefter mindst én gang dagligt i sammenlagt 14 dage. Varigheden af observationsperioden er ikke fast, men bestemmes ud fra arten og tidspunktet for indtræden af kliniske tegn og varigheden af restitutionperioden. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsættelse og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer. Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Dyr, som findes at være døende, og dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant af hensyn til dyrevelfærd. Stor omhu bør udvises ved undersøgelser for kliniske tegn på toksicitet for at sikre, at indledningsvist dårligt udseende og forbigående

respirationsændringer, der er resultatet af selve eksponeringen, ikke forveksles med toksicitet relateret til testkemikaliet. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Humane Endpoints Guidance Document, skal ligeledes tages i betragtning (7). Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

30. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønstre. Hvis det er muligt, registreres evt. sondring mellem lokale og systemiske virkninger. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, krampes, spytlåb, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab.

Kropsvægt

31. Det enkelte dyrs vægt registreres én gang i tilvænningsperioden, på eksponeringsdagen inden eksponeringen (dag 0) og mindst på dag 1, 3 og 7 (og derefter ugentligt), og den registreres på tidspunktet for død eller aflivning, hvis det indtræder efter dag 1. Kropsvægt anerkendes som en kritisk indikator for toksicitet, og dyr med et vedvarende vægttab på $\geq 20\%$ sammenlignet med vægten for forsøget, overvåges nøje. Overlevende dyr vejes og aflives humanitært ved afslutningen af perioden efter eksponering.

Patologi

32. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller aflives og tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk obduktion. Hvis makroskopisk obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.
33. Yderligere undersøgelser, der på forhånd er medtaget som standard, kan overvejes for at udvide den fortolkningsmæssige værdi af undersøgelsen, f.eks. vejning af overlevende rotters lunger og tilvejebringelse af dokumentation for irritation ved hjælp af mikroskopisk undersøgelse af luftvejene. Undersøgte organer kan omfatte organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer hos dyr, som overlever i 24 timer eller længere, og organer, som vides eller forventes at være påvirket. Mikroskopisk undersøgelse af hele luftvejene kan give nyttige informationer i forbindelse med testkemikalier, der reagerer med vand, f.eks. syrer og hygroskopiske testkemikalier.

DATA OG RAPPORTERING

Data

34. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt og obduktionsfund. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund.

Testrapport

35. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Forsøgsdyr og pasning

- beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder
- anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte
- dyrenes antal, alder og køn
- randomiseringsmetode
- nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)
- beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

Testkemikalie

- fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)
- identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

Vehikel

- begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand
- historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

Inhalationskammer

- beskrivelse af inhalationskammeret, herunder dimensioner og rumfang
- oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære
- apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration
- luftkilde, behandling af tilført/udledt luft og konditioneringsystem
- metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære
- trykforskel (positiv eller negativ)
- eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)
- testatmosfærens tidsmæssige homogenitet/stabilitet
- placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer
- luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)
- information om det apparatur, der er anvendt til at måle ilt og kuldioxid, hvis det er relevant
- tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret (t_{95})
- antal volumenændringer pr. time
- evt. måleudstyr.

Eksponeringsdata:

- begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget
- nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)
- faktiske koncentrationer af testkemikaliets indsamlet fra dyrenes vejtrækningszone; for testblandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat
- alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/m³ osv.); volumenenheder (f.eks. ppm og ppb) kan også rapporteres i parentes
- partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (og), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

Testbetingelser

- nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet; hvis mekaniske processer har ændret testkemikaliet sammensætning, medtages resultaterne af analyser, som bekræfter testkemikaliet sammensætning
- en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren
- nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemedit)
- begrundelse for valget af testkoncentrationer.

Resultater

- opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer
- opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer
- opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og σ_g
- opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed og varighed)
- kropsvægten for det enkelte dyr registreret på forsøgsdage; dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før planlagt aflivning; for hvert dyr, toksiske virkninger indsætten, tidsforløb, og hvorvidt de er reversible
- for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund
- klassificering i CLP-kategori og afskæringsværdi for LC₅₀.

Diskussion og fortolkning af resultater

- Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.
- Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes
- Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.
- Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.
- Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (7).

LITTERATUR:

- (1) Kapitel B.2 i dette bilag, Akut toksicitet (Inhalation).
- (2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W og Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. Arch. Toxicol. 77: 243-254.
- (3) Diener W, Kayser D og Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537-549.

- (4) Diener W og Schleder E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. ALTEX 1: 129-134.
 - (5) Kapitel B.1 i dette bilag, Akut inhalationstoksicitet — Akut toksisitetsklassemetode.
 - (6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 105. Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OECD, Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (9) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.
 - (10) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).
 - (11) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: test med human hudmodel.
 - (12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Findes på: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
 - (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
 - (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.
 - (15) Pauluhn J og Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167
 - (16) FN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York og Genève. Findes på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

*Tillæg 2***Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for gasser (ppm/4h)**Generelle bemærkninger ⁽¹⁾

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 2a: startkoncentration er 100 ppm

Tillæg 2b: startkoncentration er 500 ppm

Tillæg 2c: startkoncentration er 2 500 ppm

Tillæg 2d: startkoncentration er 20 000 ppm

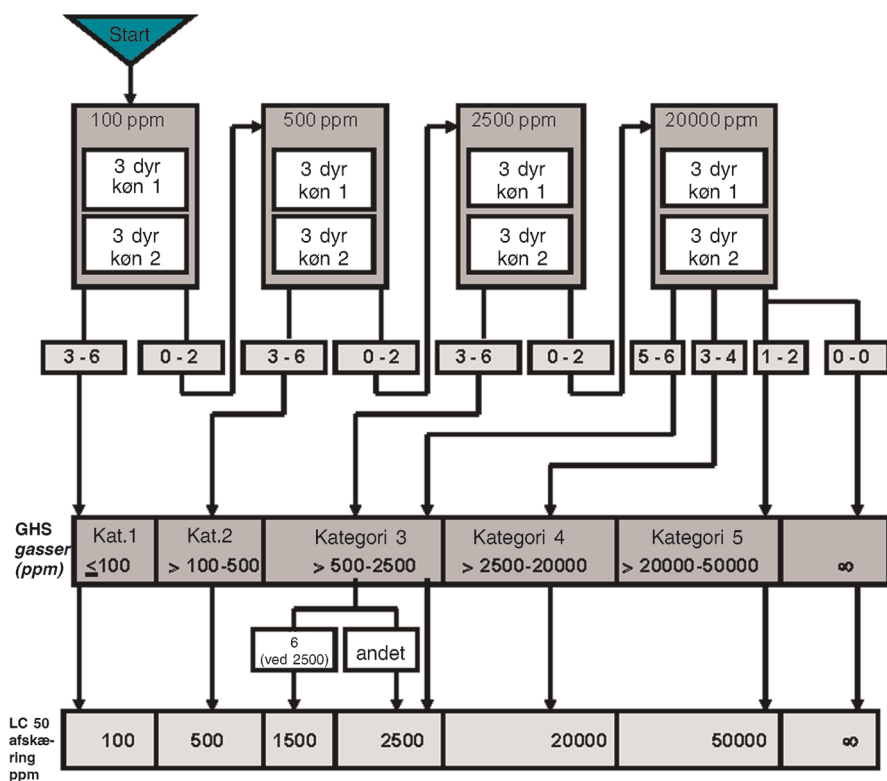
Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

⁽¹⁾ I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

Tillæg 2a

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 100 ppm/4 t for gasser

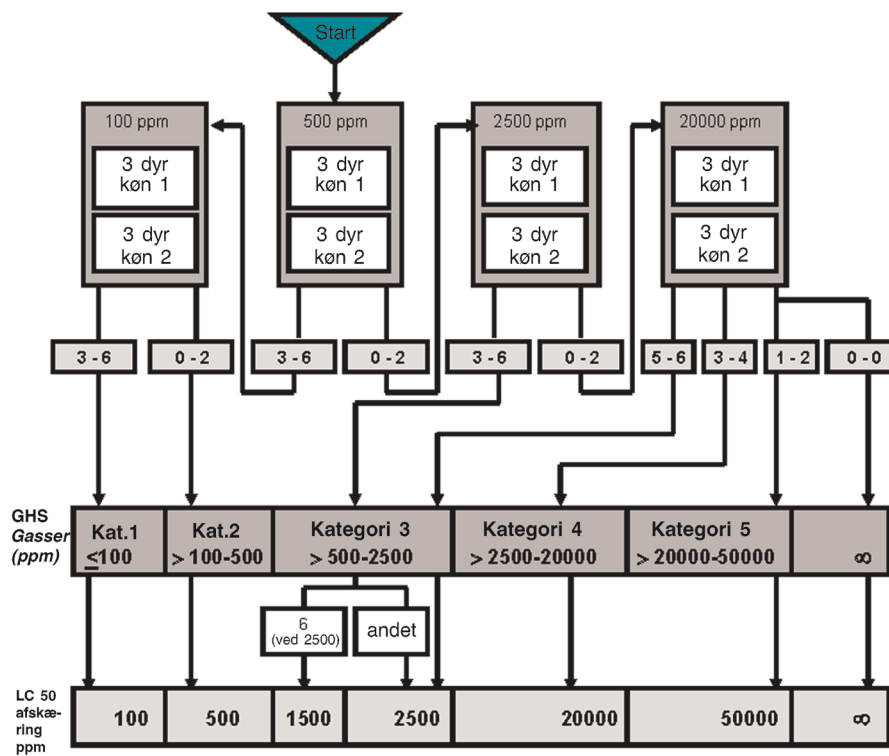


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: uklassificeret
- Testved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 2b

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 500 ppm/4 t for gasser

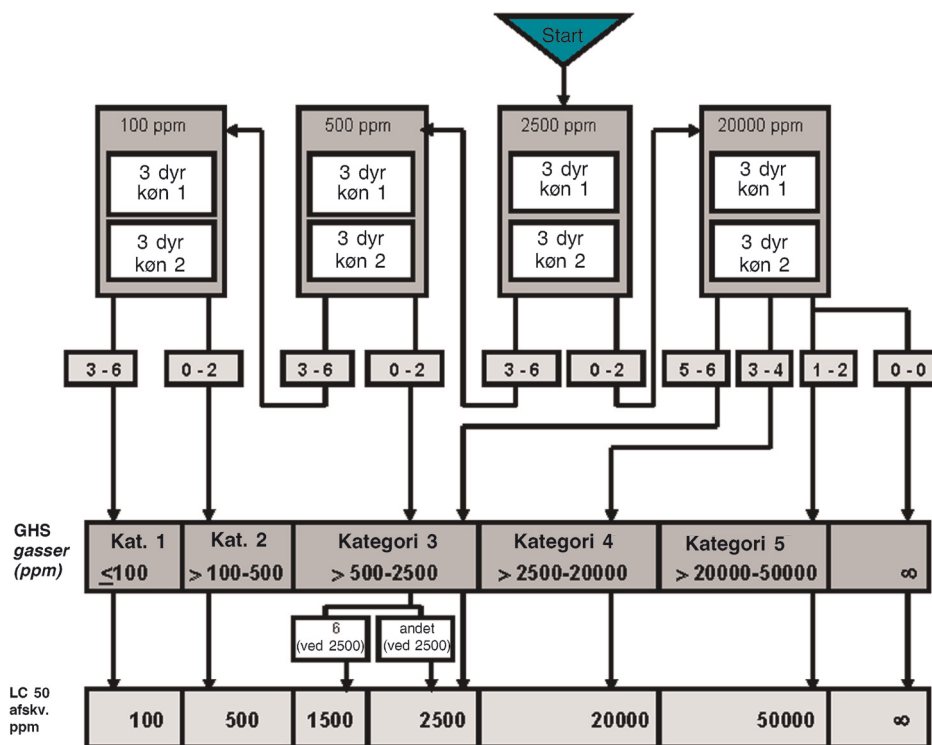


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 2c

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 2 500 ppm/4 t for gasser

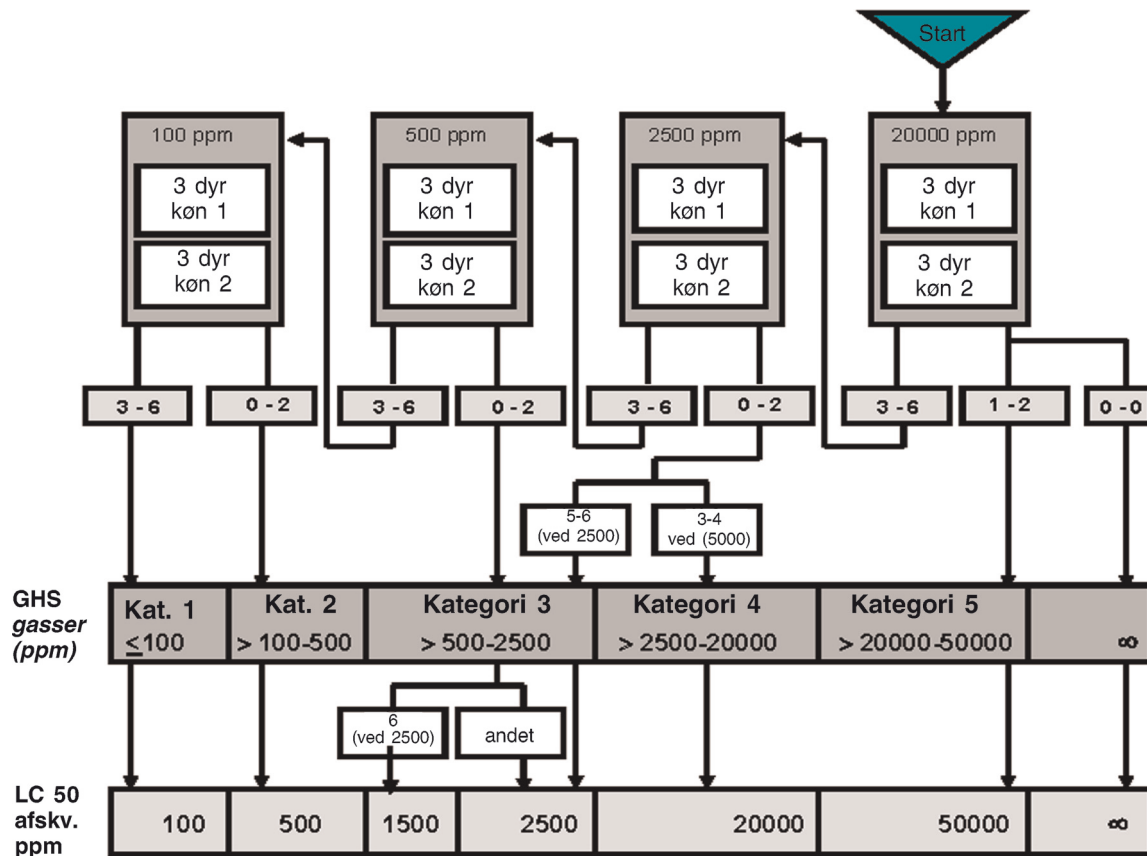


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 2d

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 20 000 ppm/4 t for gasser



- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 3

Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for dampe (mg/l/4h)Generelle bemærkninger ⁽¹⁾

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 3a: startkoncentration er 0,5 mg/l

Tillæg 3b: startkoncentration er 2,0 mg/l

Tillæg 3c: startkoncentration er 10 mg/l

Tillæg 3d: startkoncentration er 20 mg/l

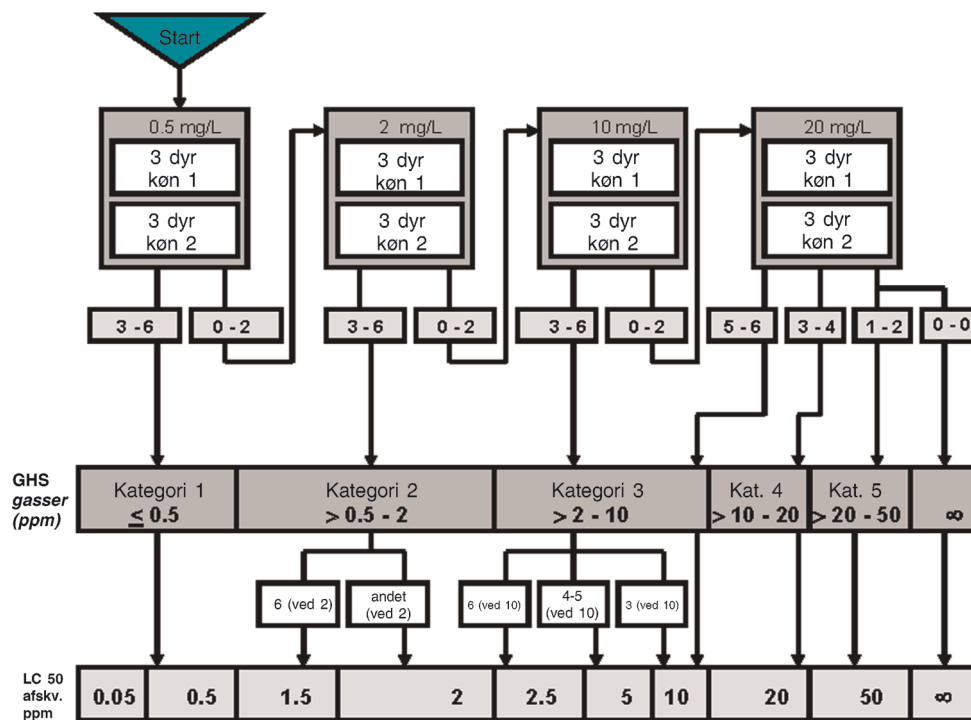
Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

⁽¹⁾ I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

Appendix 3a

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 0,5 mg/L/4 t for dampe

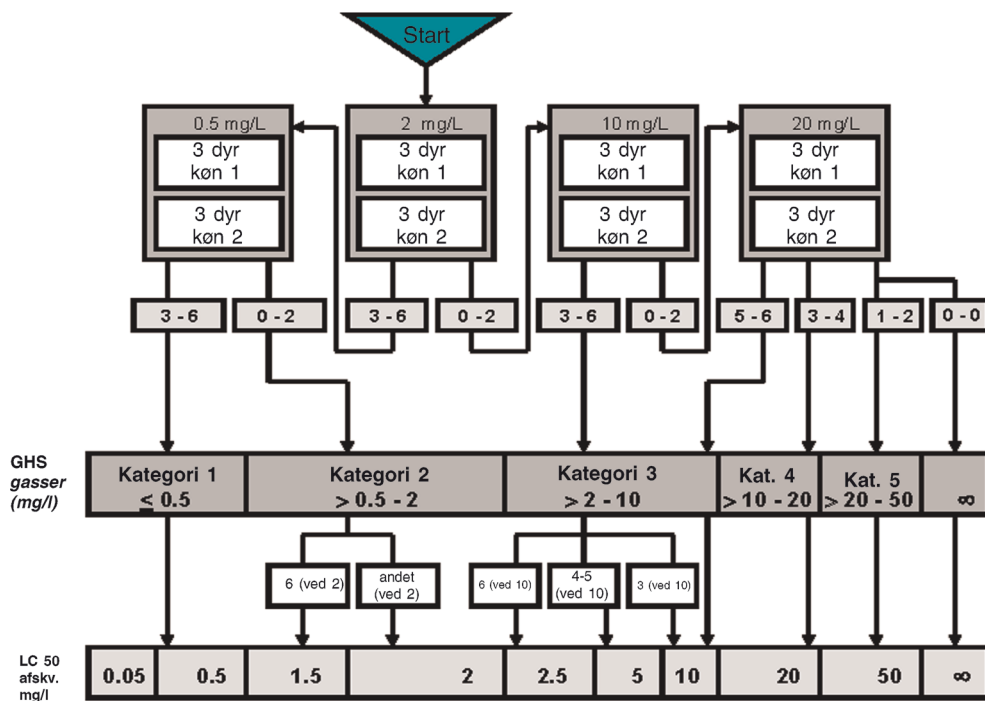


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 3b

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 2 mg/4 t for dampe

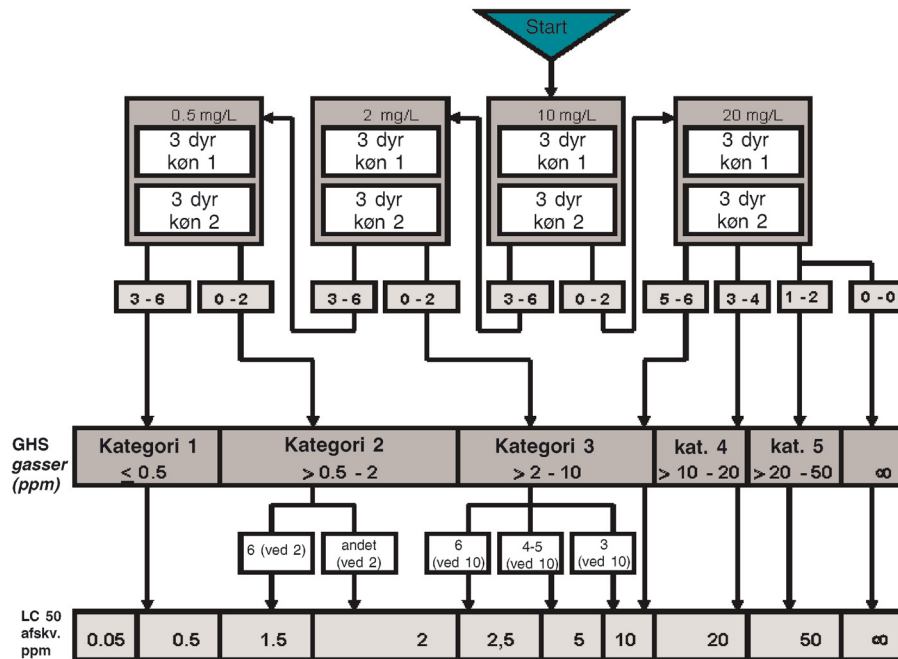


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 3c

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 10 mg/L/4 t for dampe

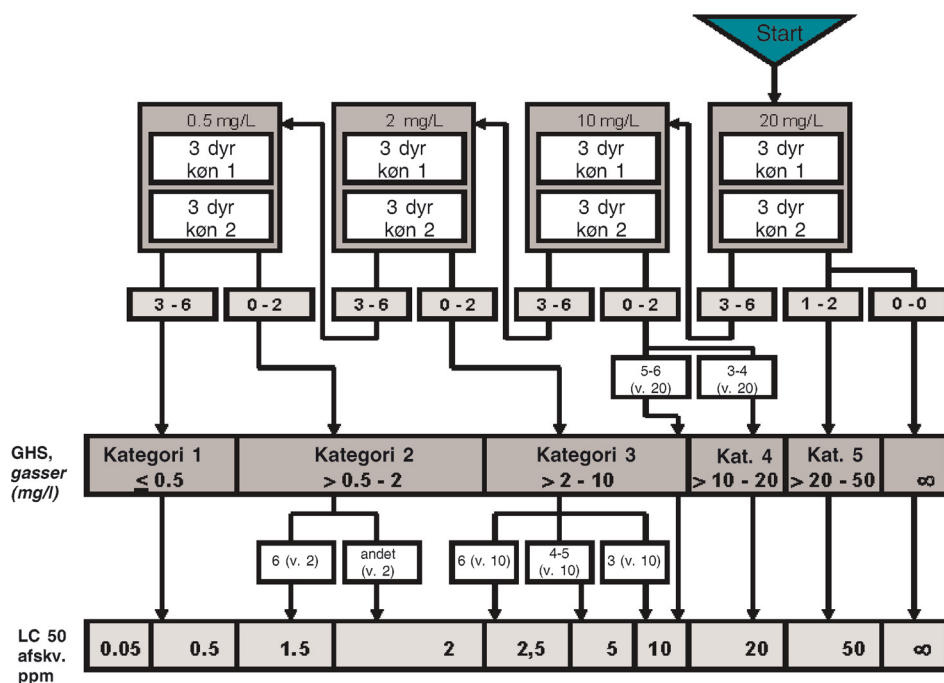


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 3d

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 20 mg/L/4 t for dampe



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

— Test ved 50 mg/L/4 t se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 4

Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for aerosoler (mg/l/4h)Generelle bemærkninger ⁽¹⁾

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 4a: startkoncentration er 0,05 mg/l

Tillæg 4b: startkoncentration er 0,5 mg/l

Tillæg 4c: startkoncentration er 1 mg/l

Tillæg 4d: startkoncentration er 5 mg/l

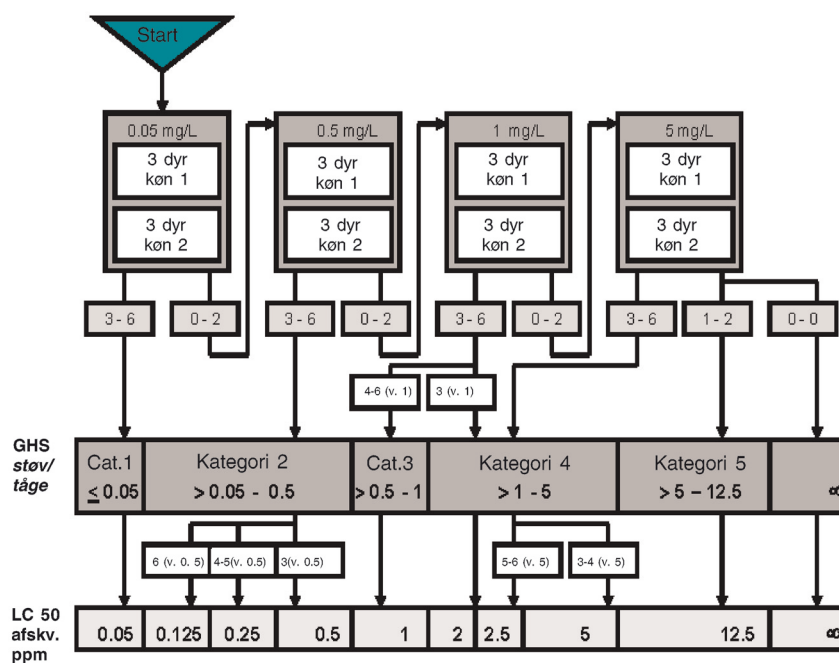
Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

⁽¹⁾ I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

Tillæg 4a

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 0,05 mg/L/4 t for dampe

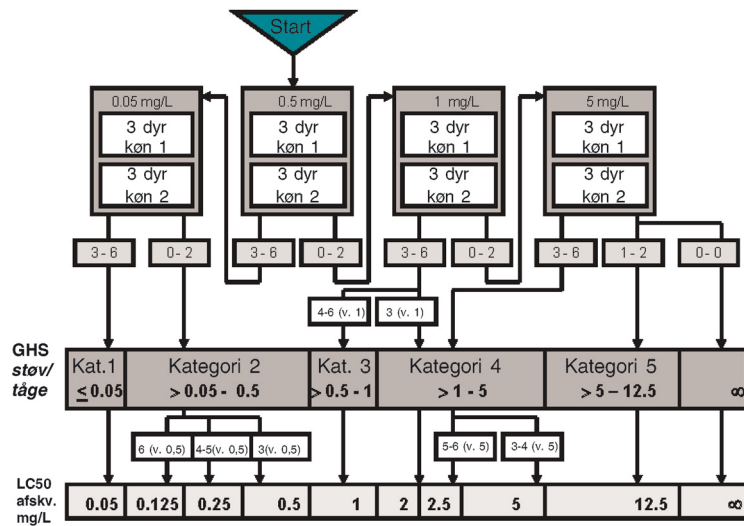


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 4b

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 0,5 mg/L/4 t for aerosoler

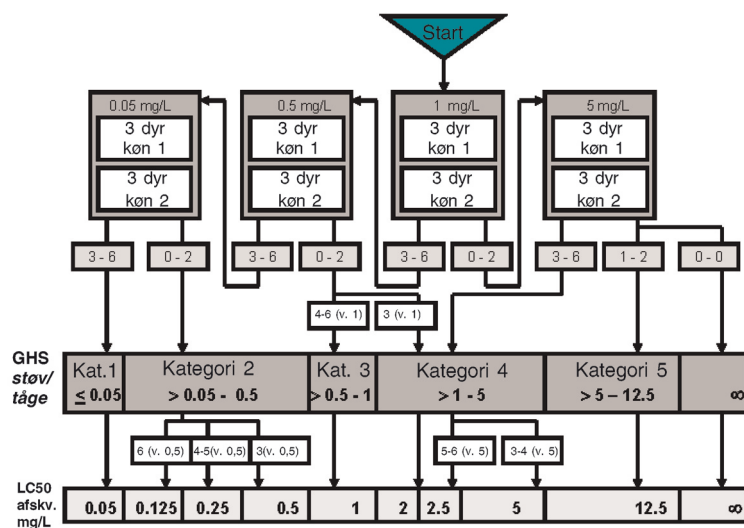


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: ikke klassificeret
- Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 4c

Akut toxicitet (inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 1 mg/L/4 t for aerosoler

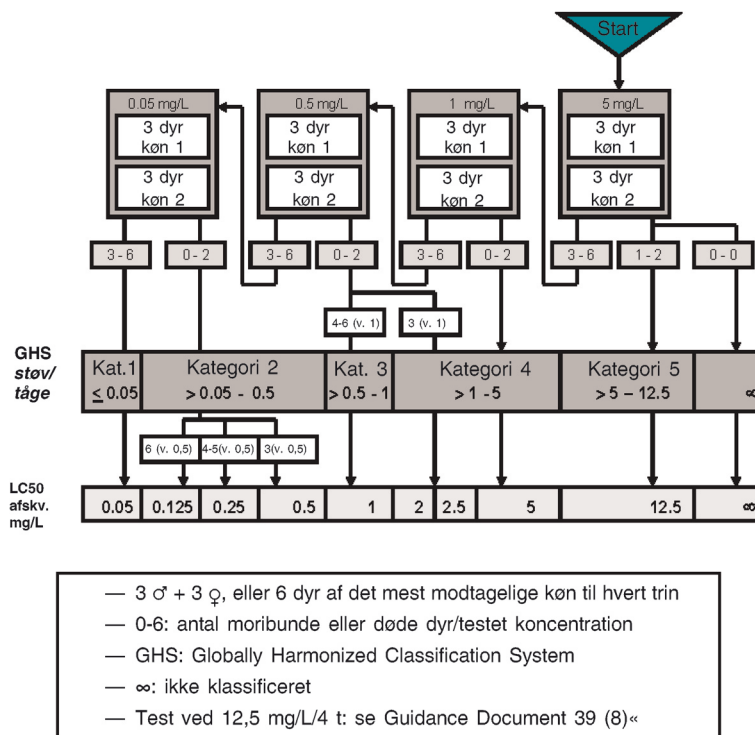


- 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
- 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞ : ikke klassificeret
- Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

Tillæg 4d

Akut Toxicitet (Inhalation):

Fremgangsmåde med startkoncentration på 5 mg/L/4 t for aerosoler



9) Kapitel C.10 affattes således:

»C.10. SIMULERINGSFORSØG VEDRØRENDE AEROB SPILDEVANDSRENSNING: C.10.A: AKTIVEREDE SLAMENHEDER — C.10.B: BIOFILM

C.10.A.: Aktiverede slamenheder

INDLEDNING

- Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 303 (2001). I 1950'erne opdagede man, at nye overfladeaktive stoffer forårsagede omfattende skumdannelse i spildevandsrensningsanlæg og i floder. De blev ikke fuldstændigt elimineret i den aerobe behandling, og i visse tilfælde begrænsede de elimineringen af andre organiske stoffer. På den baggrund blev der indledt mange undersøgelser af, hvordan overfladeaktive stoffer kunne fjernes fra spildevand, og om nye industrifremstillede kemikalier kunne indgå i spildevandsrensning. Til det blev der anvendt to modelenheder, der repræsenterede de to hovedtyper af aerob biologisk spildevandsrensning (aktiveret slam og nedsivningsfiltrering). Det ville have været umuligt og meget dyrt at distribuere alle nye kemikalier og overvåge store rensningsanlæg, selv på lokalt plan.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

Aktiverede slamenheder

- Modeller for aktiverede slamenheder er beskrevet i størrelser fra 300 ml op til ca. 2 000 ml. Nogle efterlignede nøje fuldskalaanlæg med tanke til bundfældning af slam, hvor det bundfældede slam blev pumpet tilbage til beluftningstanken, mens andre ikke var udstyret med bundfældningsanlæg, f.eks. Swisher (1). Størrelsen på forsøgsenhederne er et kompromis. De skal på den ene side være store nok til mekanisk drift og produktion af et tilstrækkeligt volumen af prøver, uden at det påvirker driften, og på den anden side må de ikke være så store, at det stiller for store krav til plads og materialeforbrug.

3. To typer forsøgsheder, der anvendes hyppigt og med tilfredsstillende resultat, er Husmann-enheder (2) og Porous Pot-enheder (porøse krukker) (3) (4), der først blev anvendt i forsøg med overfladeaktive stoffer. Begge disse typer er beskrevet i denne testmetode. Andre typer har også været anvendt med tilfredsstillende resultater, f.eks. Eckenfelder (5). På grund af de relativt høje omkostninger og den store arbejdsindsats, der kræves for at udføre denne simuleringstest, blev der parallelt med disse gennemført enklere og billigere screeningstest, som er beskrevet i kapitel C.4 A-F i dette bilag (6). Erfaringer med mange overfladeaktive stoffer og andre kemikalier har vist, at de stoffer, der bestod screeningstestene (let bionedbrydelige), også blev nedbrudt i simuleringstesten. Nogle af de stoffer, der ikke bestod screeningstestene, bestod testene for iboende bionedbrydelighed (kapitel C.12 (7) og C.19 (8) i dette bilag), men kun nogle fra denne gruppe blev nedbrudt i simuleringstesten, hvorimod de kemikalier, der ikke bestod testene for iboende bionedbrydelighed, ikke blev nedbrudt i simuleringstestene (9) (10) (11).
4. I visse tilfælde er det tilstrækkeligt at gennemføre simuleringstests under et enkelt sæt driftsbetingelser. Resultaterne udtrykkes som den procentvise eliminering af testkemikallet eller af opløst organisk kulstof (DOC). En sådan test beskrives i denne testmetode. I modsætning til den foregående version af dette kapitel, der kun beskrev én type forsøgsheder til behandling af syntetisk spildevand i koblet tilstand, der anvendte en forholdsvis grov slamoverløbsmetode, giver denne tekst mulighed for en række variationer. Alternativer til typen af forsøgsheder, virkningsmåde samt spildevands- og slambortskaffelse beskrives. Denne tekst ligger tæt op ad teksten i ISO 11733 (12), der blev nøje gennemgået i forbindelse med forberedelsen. Metoden har dog ikke været underkastet en ringtest.
5. Til andre formål skal koncentrationen af testkemikallet i udløbet kendes mere præcist, og der er derfor behov for en mere omfattende metode. Overløbsprocenten for slam skal f.eks. kontrolleres mere præcist hele døgnet og i løbet af hele testperioden, og enhederne skal fungere ved forskellige overløbsprocenter. For at opnå en fyldstgørende metode bør testene ligeledes gennemføres ved to eller tre forskellige temperaturer. En sådan metode er beskrevet af Birch (13) (14) og sammenfattet i tillæg 6. Den nuværende viden er imidlertid ikke tilstrækkelig til at afgøre, hvilken af de kinetiske modeller der kan anvendes i forbindelse med bionedbrydning af kemikalier ved spildevandsrensning og i vandmiljøet generelt. Anvendelsen af Monod-kinetik, der beskrives i tillæg 6 som et eksempel, er begrænset til kemikalier, der forekommer i en koncentration på 1 mg/l og derover, men dette er efter nogle forskeres opfattelse endnu ikke dokumenteret. Tillæg 7 omhandler test ved koncentrationer, der mere realistisk afspejler koncentrationerne i spildevand. Disse test og testene i tillæg 6 er dog anført i tillæg og ikke som separate testmetoder.

Filtre

6. Det har været meget mindre fokus på modeller med nedsivningsfiltre. Det skyldes sandsynligvis, at de er mere besværlige og ikke så kompakte som modeller baseret på aktiveret slam. Gerike et al. har udviklet nedsivningsfiltre og anvendt dem i koblet tilstand ((15). Disse filtre var relativt store (højde 2 m, volumen 60 l), og hvert filter krævede en spildevandsmængde på helt op til 2 l/h. Baumann et al. (16) simulerede nedsivningsfiltre ved at sætte strips af »polyesterfleece« ind i rør på 1 m (14 mm indvendig diameter), efter at stripsene havde været nedsænket i koncentreret aktiveret slam i 30 minutter. Testkemikallet blev som eneste C-kilde i en opløsning af mineralsalte hældt ned i det lodrette rør, hvorefter den biologiske nedbrydning blev vurderet ud fra målinger af DOC i udløbet og CO₂ i den udledte gas.
7. Biofiltre er blevet simuleret på en anden måde (15). De indre overflader af roterende rør, der var skråtstillet i en spids vinkel i forhold til vandret, blev tilført spildevand (ca. 250 ml/h) med og uden testkemikallet. De opsamlende udløb blev derefter analyseret for opløst organisk kulstof (DOC) og/eller det specifikke testkemikalie.

TESTENS PRINCIP

8. Denne metode er udviklet til at bestemme elimineringen og den primære og/eller ultimative biologiske nedbrydning af vandopløselige organiske kemikalier ved hjælp af aerobe mikroorganismer i et kontinuerligt drevet testsystem, der simulerer processen for aktiveret slam. Et let biologisk nedbrydeligt organisk materiale og det organiske testkemikalie forsyner mikroorganismene med kulstof og energi.
9. To kontinuerligt drevne testenheder (anlæg med aktiveret slam eller porøse krukker) køres parallelt under identiske betingelser, der vælges, så de passer til testens formål. Normalt er den gennemsnitlige hydrauliske retentionstid seks timer, og den gennemsnitlige slamalder (slamretentionstid) er 6-10 dage. Slam bortskaffes ved hjælp af én af to metoder, hvor testkemikallet normalt tilsættes indløbet (organisk medium) på den ene enhed i en koncentration på mellem 10 mg/l DOC og 20 mg/l DOC. Den anden enhed bruges som kontrolenhed for at bestemme den biologiske nedbrydning af det organiske medium.
10. I hyppigt udtagne prøver af udløbet bestemmes først og fremmest det opløste organiske kulstof eller det kemiske iltforbrug (COD). Ligeledes bestemmes ud fra specifikke analyser koncentrationen af testkemikallet (hvis påkrævet) i spildevandet fra den enhed, der får tilført testkemikallet. Det antages, at forskellen mellem koncentrationerne af DOC eller COD i udløbet fra test- og kontrolenhederne skyldes testkemikallet eller dets organiske metabolitter. Forskellen sammenlignes med koncentrationen af DOC eller COD i indløbet, der skyldes det tilførte testkemikalie, med henblik på at bestemme elimineringen af testkemikallet.

11. Bionedbrydning kan normalt adskilles fra bioadsorption ved omhyggeligt at undersøge kurven for elimineringsstid og bekræftes normalt af en test for umiddelbar bionedbrydning, hvor der anvendes et akklimatiseret inokulum fra den enhed, der får tilført testkemikaliets.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

12. Testkemikaliets renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionsegenskaber skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt. Normalt kan flygtige og uopløselige kemikalier ikke testes, medmindre der træffes særlige forholdsregler (se tillæg 5). Den kemiske struktur, eller i det mindste den empiriske formel, skal også kendes for at kunne beregne de teoretiske værdier og/eller kontrollere parametrene målte værdier, f.eks. teoretisk iltforbrug (ThOD), opløst organisk kulstof (DOC) og kemisk iltforbrug (COD).
13. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer (se tillæg 4) kan bruges ved valg af hensigtsmæssige testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

TÆRSKELVÆRDIER

14. I den første anvendelse af denne simuleringstest (kontroltest) i forbindelse med primær bionedbrydning af overfladeaktive stoffer skal der fjernes over 80 % af det specifikke kemikalie, inden det overfladeaktive stof må markedsføres. Hvis værdien 80 % ikke opnås, kan denne simuleringstest (kontroltest) anvendes, og det overfladeaktive stof må markedsføres, hvis over 90 % af det specifikke kemikalie er elimineret. For kemikalier er der generelt ikke tale om at bestå/dumpe, og derfor kan den opnåede værdi for eliminering benyttes i forbindelse med omtrentlige beregninger af den sandsynlige koncentration i miljøet, der kan bruges i vurderinger af risici fra kemikalier. Resultater har en tendens til at følge et mønster med alt eller intet. I en række forsøg med rene kemikalier viste den procentvise eliminering af DOC sig at være over 90 % i mere end tre fjerdedele og over 80 % i mere end 90 % af de kemikalier, der viste sig at have en signifikant værdi for bionedbrydelighed.
15. Der er relativt få kemikalier (f.eks. overfladeaktive stoffer) til stede i spildevand i de koncentrationer (ca. 10 mg C/l), der anvendes i denne test. Nogle kemikalier kan være hæmmende ved disse koncentrationer, mens kinetikken for eliminering af andre kemikalier kan være forskellig ved lave koncentrationer. En mere præcis vurdering af nedbrydningen kunne gennemføres ved hjælp af modificerede metoder, hvor man benytter realistisk lave koncentrationer af testkemikaliets, og de indsamlede data kunne bruges til at beregne kinetiske konstanter. De nødvendige forsøgsteknikker er imidlertid endnu ikke fuldt validerede, og de kinetiske modeller, der beskriver reaktionerne med hensyn til bionedbrydning, er heller ikke udarbejdet (se tillæg 7).

REFERENCEKEMIKALIER

16. For at sikre, at forsøget gennemføres korrekt, bør kemikalier, hvis opførsel kendes, jævnligt testes sideløbende med undersøgelsen af testkemikalier. Sådanne kemikalier omfatter adipinsyre, 2-phenylphenol, 1-naphthol, diphensyre, 1-naphthoesyre osv. (9) (10) (11).

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

17. Der har udarbejdet langt færre rapporter om simuleringstest end om test for let bionedbrydelighed. Reproducerbarheden mellem (samtidige) replikater er god (inden for 10-15 %) for testkemikalier, der er nedbrudt 80 % eller mere, mens der for mindre nedbrudte kemikalier er større variationer. Ligeledes er der i forbindelse med visse borderline-kemikalier konstateret meget spredte resultater (f.eks. 10 % og 90 %) på forskellige tidspunkter i løbet af testperioden på ni uger.
18. Der er konstateret meget begrænset forskel i de resultater, der er opnået med de to typer forsøgsenheder. Visse kemikalier er dog i højere grad og mere konsistent blevet nedbrudt i forbindelse med husholdningsspildevand end med syntetisk spildevand som defineret af OECD.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Apparatur

Testsystem

19. Testsystemet for et enkelt testkemikalie består af en testenhed og en styreenhed. I de tilfælde, hvor der kun gennemføres specifikke analyser (primær bionedbrydning), kræves der dog kun en testenhed. En og samme styreenhed kan benyttes til flere forskellige testenheder, der modtager enten de samme eller forskellige testkemikalier. I tilfælde af kobling (tillæg 3) skal hver enkelt testenhed have sin egen styreenhed. Testsystemet kan være en aktivslamanlægsmodel, dvs. en Husmann-enhed (tillæg 1, figur 1) eller en porøs krukke (tillæg 1, figur 2). I begge tilfælde kræves opbevaringstanke af tilstrækkelig størrelse til indløb og udløb, og der kræves pumper til dosering af indløbet enten blandet med opløsningen af testkemikaliets eller separat.

20. Hver aktivslamanlægsenhed består af en beluftningstank med en kendt kapacitet på ca. 3 l aktiveret slam og en separator (sekundær klaringstank), der indeholder ca. 1,5 l. De anførte volumener kan i et vist omfang ændres ved at justere separatorens højde. Tanke af forskellige størrelser tillades, hvis de benyttes med tilsvarende hydrauliske belastninger. Hvis det ikke er muligt at holde temperaturen i testlokalet inden for det ønskede område, anbefales det at benytte tanke med vandkappe med temperaturreguleret vand. En luftpumpe eller doseringspumpe pumper det aktiverede slam fra separatoren over i beluftningstanken enten kontinuerligt eller intermitterende med regelmæssige intervaller.
21. Systemet med porøse krukker består af en indre porøs cylinder med en konisk bund, der er monteret inde i en lidt større tank af samme form, men som er fremstillet af et vandtæt plastmateriale. Et velegnet materiale til en porøs krukke er porøs polyethylen med en maksimal porestørrelse på 90 µm og en tykkelse på 2 mm. Slammet adskilles fra det behandlede organiske materiale i kraft af differentieret passage gennem den porøse væg. Udløbet opsamles i det ringformede rum, hvorfra det løber over i opsamlingstanken. Der sker ingen bundfældning, og der intet returløb af slam. Hele systemet kan opstilles i et termostatstyret vandbad. Porøse krukker kan i starten blive tilstoppede og dermed løbe over. I så fald skal den porøse foring udskiftes med en ren foring, efter at slammet er suget fra krukken over i en ren spand, og den tilstoppede foring er fjernet. Efter aftørring af den vandtætte udvendige cylinder monteres en ren foring, og slammet returneres til krukken. Slam, der sidder fast på siderne af den tilstoppede foring, skræbes også omhyggeligt af og hældes tilbage. Rengør først tilstoppede krukker med en tynd vandstråle, så fastsiddende slam fjernes. Nedsænk derefter krukkerne i en fortyndet opløsning af natriumhypochlorit og dernæst i vand, og afskyl dem til sidst omhyggeligt i vand.
22. Der kræves særlige teknikker til beluftning af slammet i beluftningstankene i begge systemer, f.eks. sintrede klodser (diffusionssten) og trykluft. Luften skal renses, eventuelt ved at passere et særligt filter, og skylles. En passende luftmængde skal passere gennem systemet for at opretholde de aerobe betingelser og for at holde slammet konstant i suspension i løbet af testen.

Filtreringsapparat eller centrifuge

23. Apparatur til filtrering af prøver ved hjælp af membranfiltre med passende porøsitet (nominel åbningsdiameter 0,45 µm) til adsorption af opløselige organiske kemikalier med mindst mulig frigivelse af organisk kulstof. Hvis der benyttes filtre, som frigiver organisk kulstof, vaskes disse filtre omhyggeligt med varmt vand for at fjerne afgivet organisk kulstof. Alternativt kan der benyttes en centrifuge med en kapacitet på 40 000 m/s².

Analysedstyr

24. Apparatur, der bruges til bestemmelse af:

- DOC (opløst organisk kulstof) og TOC (samlet organisk kulstof) eller COD (kemisk iltforbrug)
- specifikt kemikalie, hvis påkrævet
- suspenderede stoffer, pH, iltkoncentration i vand
- temperatur, syreindhold og alkalinitet
- ammoniak, nitrit og nitrat, hvis testen gennemføres under nitrificerende forhold.

Vand

25. Ledningsvand, der indeholder under 3 mg/l DOC. Bestem alkalinitet, hvis den ikke allerede er kendt.
26. Deioniseret vand, der indeholder under 2 mg/l DOC.

Organisk materiale

27. Syntetisk spildevand, husholdningsspildevand eller en blanding heraf kan anvendes som organisk materiale. Det er påvist (11) (14), at anvendelsen af husholdningsspildevand alene ofte medfører øget eliminering af DOC i procent og endda eliminering og bionedbrydning af visse kemikalier, som ikke nedbrydes biologisk, når der anvendes syntetisk spildevand som defineret af OECD. Endelig stabiliserer konstant eller intermitterende tilsætning af husholdningsspildevand ofte det aktiverede slam og dermed den vigtige evne til effektiv bundfældelse. Derfor anbefales brugen af husholdningsspildevand. Mål koncentrationen af DOC eller COD i alle nye batches med organisk materiale. Det organiske materiales aciditet eller alkalinitet bør være kendt. Det organiske materiale skal muligvis tilsættes en velegnet buffer (natriumhydrogencarbonat eller kaliumdihydrogenfosfat), hvis materialets aciditet eller alkalinitet er lav, for at holde en pH-værdi på ca. $7,5 \pm 0,5$ i beluftningstanken under udførelsen af testen. Mængden af buffer, der skal tilsættes, og tidspunktet for, hvornår den skal tilsættes, afgøres i hvert enkelt tilfælde. Når blandinger benyttes enten kontinuerligt eller intermitterende, skal DOC (eller COD) i blandingen holdes på et nogenlunde konstant niveau, f.eks. ved hjælp af fortynding med vand.

Syntetisk spildevand

28. Opløs i én liter ledningsvand: pepton: 160 mg; kødekstrakt: 110 mg; urinstof: 30 mg; vandfrit dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4): 28 mg; natriumchlorid (NaCl): 7 mg; calciumchloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$): 4 mg; magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$): 2 mg. Dette eksempel på syntetisk spildevand som defineret af OECD giver en middel DOC-koncentration i indløbet på ca. 100 mg/l. Der kan også benyttes andre sammensætninger med ca. den samme DOC-koncentration, og som ligger tættere på rigtigt spildevand. Hvis der kræves et knapt så koncentreret indløb, kan det syntetiske spildevand fortyndes (f.eks. 1:1) med ledningsvand for at opnå en koncentration på ca. 50 mg/l. Et sådant svagere indløb vil give mulighed for en bedre vækst af nitrificerende organismer, og denne modifikation bør anvendes, hvis simuleringen af nitrificerende spildevandsplanter skal undersøges. Dette syntetiske spildevand kan fremstilles ved hjælp af destilleret vand i koncentreret form og opbevares ved ca. 1 °C i op til én uge. Fortynd efter behov med ledningsvand. (Dette materiale er ikke tilfredsstillende. Kvælstofkoncentrationen er f.eks. meget høj, og kulstofindholdet relativt lavt, men der er ikke foreslået en bedre løsning, bortset fra tilførsel af mere fosfat som buffer og ekstra pepton).

Husholdningsspildevand

29. Benyt frisk bundfældet spildevand, der indsamles dagligt fra et rensningsanlæg, der hovedsagelig modtager husholdningsspildevand. Spildevandet indsamles før den primære sedimentering fra overløbskanalen ved den primære sedimenteringstank eller fra indløbet til aktivslamanlægget, og det skal stort set være uden grove partikler. Spildevandet kan benyttes efter flere dages opbevaring (normalt dog højst syv dage) ved ca. 4 °C, hvis det dokumenteres, at DOC (eller COD) ikke falder væsentligt (dvs. med mindre end 20 %) under opbevaringen. For at begrænse forstyrrelserne af systemet bør DOC (eller COD) af hver ny batch justeres inden brug, så der opnås en passende konstant værdi, f.eks. ved fortynding med ledningsvand.

Aktiveret slam

30. Aktiveret slam til inokulering indsamles fra beluftningstanken i et velfungerende spildevandsanlæg eller fra en aktiveret slamenhed i laboratorieskala, der hovedsagelig behandler husholdningsspildevand.

Stamopløsninger af testkemikaliet

31. I forbindelse med kemikalier, der er tilstrækkelig opløselige, fremstilles stamopløsninger i passende koncentrationer (f.eks. 1-5 g/l) i demineraliseret vand eller i den mineralske del af det syntetiske spildevand. Oplysninger om uopløselige og flygtige kemikalier findes i tillæg 5. Bestem DOC og samlet organisk kulstof (TOC) i stamopløsningen, og gentag målingerne for hver ny batch. Hvis forskellen mellem DOC og TOC er større end 20 %, skal testkemikaliet vandopløselighed kontrolleres. Sammenlign DOC eller koncentrationen af testkemikaliet målt ved hjælp af specifik analyse af stamopløsningen med den nominelle værdi for at fastslå, hvorvidt genfindingen er god nok (normalt kan > 90 % forventes). Især for dispersioner skal det fastslås, hvorvidt DOC kan benyttes som analytisk parameter, eller om der kun kan anvendes en analyseteknik, der er specifik for det pågældende testkemikalie. Centrifugering af prøverne er obligatorisk i forbindelse med dispersioner. For hver ny batch skal DOC, COD eller testkemikaliet måles med specifikke analyser.
32. Bestem pH-værdien i stamopløsningen. Ekstreme værdier viser, at tilsætningen af kemikaliet kan påvirke pH-værdien af det aktiverede slam i testsystemet. I det tilfælde neutraliseres stamopløsningen med små mængder af uorganisk syre eller base for at opnå en pH-værdi på $7 \pm 0,5$. Undgå dog udfældning af testkemikaliet.

FREMANGSMÅDE

33. Fremgangsmåden er beskrevet for aktiverede slam anlæg. Den skal tilpasses på enkelte områder til brug i systemet med porøse krukker.

Fremstilling af inokulum

34. Ved begyndelsen af testen podes testsystemet med aktiveret slam eller med et inokulum, der indeholder en lav koncentration af mikroorganismer. Hold inokulum beluftet ved stuetemperatur, indtil det er opbrugt, og brug det inden for 24 timer. I det første tilfælde udtages en prøve af aktiveret slam fra beluftningstanken i et effektivt drevet biologisk spildevandsrensningsanlæg eller et laboratorierensningsanlæg, der primært modtager husholdningsspildevand. Hvis nitrificerende forhold skal simuleres, udtages slam fra et nitrificerende spildevandsrensningsanlæg. Bestem koncentrationen af suspenderede stoffer, og koncentrer om nødvendigt slammet ved bundfældning, så testsystemet tilføres et minimalt volumen. Sørg for, at udgangskoncentrationen af faststof er ca. 2,5 g/l.
35. I det andet tilfælde anvendes 2-10 ml/l udløb fra et biologisk anlæg til rensning af husholdningsspildevand som inokulum. For at få så mange forskellige bakteriearter som muligt kan det være nyttigt at tilføje inokula fra forskellige andre kilder, f.eks. overfladevand. I så fald vil det aktiverede slam udvikle sig og vokse i testsystemet.

Dosering af organisk materiale

36. Sørg for, at beholdere til indløb og udløb samt rørsystem fra indløbstanke og til udløbstanke er omhyggeligt rengjorte for at fjerne mikrobiel vækst fra starten og i løbet af testen. Testsystemerne samles på et sted, hvor temperaturen er kontrolleret (normalt inden for 20-25 °C). Hvis det ikke er muligt, benyttes testanlæg med vandkappe. Fremstil en tilstrækkelig mængde af det krævede organiske materiale (afsnit 27-29). Fyld først beluftningstank og separator med det organiske materiale, og tilsæt inokulum (afsnit 34 og 35). Start beluftningen, så slammet holdes opslæmmet og i aerob tilstand, og påbegynd dosering af indløb og genanvendelse af det bundfældede slam. Hæld organisk materiale fra opbevaringstankene over i beluftningstankene (afsnit 20 og 21) i test- og kontrolenhederne, og opsaml de respektive udløb i tilsvarende opbevaringstanke. For at opnå den normale hydrauliske retentionstid på seks timer pumpes det organiske materiale ved 0,5 l/h. Denne hastighed bekræftes ved at måle den daglige mængde organisk materiale og registrere reduktionen i volumen af materialet i opbevaringstankene. Andre doseringsmetoder anvendes, hvis virkningen af intermitterende frigivelse og »chok«-tilsætning af kemikalier skal bestemmes.
37. Hvis det organiske materiale er fremstillet til brug i en periode længere end én dag, skal det nedkøles til ca. 4 °C eller konserveres på anden måde for at forhindre mikrobiel vækst og bionedbrydning uden for testenhederne (afsnit 29). Hvis der benyttes syntetisk spildevand, kan en koncentreret stamopløsning fremstilles og opbevares ved ca. 4 °C (f.eks. 10 gange den normale koncentration, afsnit 28). Denne stamopløsning kan omhyggeligt opblandes med den korrekte mængde ledningsvand inden brug. Den kan også tilføres direkte, mens den korrekte mængde ledningsvand tilføres separat.

Dosering af testkemikalie

38. Tilsæt den korrekte mængde stamopløsning af testkemikallet (afsnit 31) til opbevaringstanken med indløb, pump det direkte med en separat pumpe over i beluftningstanken. Den normale gennemsnitlige testkoncentration i indløbet bør være mellem 10 mg/l og 20 mg/l DOC med en højeste koncentration på maks. 50 mg/l. Hvis vandopløseligheden af testkemikallet er lav, eller hvis der er sandsynlighed for, at der vil opstå toksiske virkninger, skal koncentrationen reduceres til 5 mg/l DOC eller mindre, men kun hvis der benyttes en relevant specifik analysemetode (dispergerede testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, kan tilsættes ved hjælp af særlige tilsætningsteknikker, se tillæg 5).
39. Begynd at tilsætte testkemikallet efter en periode, hvor systemet har stabiliseret sig og effektivt reducerer DOC i det organiske materiale (ca. 80 %). Det er vigtigt at kontrollere, at alle enheder fungerer lige effektivt, inden testkemikallet tilsættes. Hvis de ikke gør det, hjælper det normalt at blande de enkelte slamportioner og derefter fordele slammet i lige store portioner til de enkelte enheder. Når et inokulum af (ca.) 2,5 g/l (tørvægt) aktiveret slam er brugt, kan testkemikallet tilsættes fra begyndelsen af testen, idet direkte tilsætning af stigende mængder fra begyndelsen har den fordel, at det aktiverede slam bedre kan tilpasse sig testkemikallet. Uanset hvordan testkemikallet tilsættes, bør gennemstrømningshastigheden og/eller volumen i opbevaringstankene måles med regelmæssige intervaller.

Håndtering af aktiveret slam

40. I løbet af testen stabiliserer koncentrationen af faststofferne i aktiveret slam sig normalt mellem grænseværdier, uanset det anvendte inokulum, i intervallet mellem 1 og 3 g/l (tørvægt) afhængigt af kvalitet og koncentration af det organiske materiale, driftsbetingelser, de anvendte mikroorganismers fysiske tilstand og påvirkningen fra testkemikallet.
41. Bestem enten de suspenderede stoffer i beluftningstankene bestemmes mindst én gang om ugen, og bortskaf det overskydende slam for at holde koncentrationen på 1 g/l til 3 g/l (tørvægt), eller kontroller den gennemsnitlige slamalder ved en konstant værdi, normalt inden for intervallet 6 til 10 dage. Hvis der f.eks. er valgt en slamretentionstid på otte dage, skal der dagligt fjernes og bortskaffes 1/8 af det aktiverede slams volumen i beluftningstanken. Dette skal udføres dagligt eller fortrinsvis ved hjælp af en automatisk intervaldrevet pumpe. Selv om koncentrationen af suspenderede stoffer holdes konstant eller inden for et snævert interval, opnås der ikke en konstant slamretentionstid (SRT), som er den driftsvariabel, der bestemmer værdien af koncentrationen af testkemikallet i udløbet.
42. I løbet af hele testen skal slam, der sidder på væggene i beluftningstank og separator, fjernes, så det igen suspenderes. Kontroller og rengør regelmæssigt alle rør og slanger for at forhindre dannelsen af biofilm. Recirkuler det bundfældede slam fra separatoren til beluftningstanken, helst ved hjælp af intermitterende pumpning. Der sker ingen recirkulation i systemet med porøse krukker. Det skal dog kontrolleres, at der er indsat rene indvendige krukker, inden volumen i tanken stiger væsentligt (afsnit 21).
43. Der kan forekomme dårlig bundfældning og tab af slam i Husmann-enhederne. Dette kan afhjælpes ved samtidig at udføre en eller flere af de handlinger, der er anført nedenfor, i test- og kontrolenheder:

- Frisk slam eller flokkuleringsmiddel (f.eks. 2 ml/krukke på 50 g/l FeCl_3) tilsættes med regelmæssige mellemrum, f.eks. hver uge. Det skal dog kontrolleres, at der ikke sker nogen reaktion eller udfældning af testkemikalien med FeCl_3 .
- Trykløftpumpen kan erstattes med en slangepumpe, således at slam kan recirkuleres i en strøm, der omtrentligt svarer til den krævede indløbsstrøm, og således at der kan dannes en anaerob zone i det bundfældede slam (trykløftpumpens geometri begrænser minimumsgennemstrømningen af returslam til ca. det 12-dobbelte af indløbs).
 - Slammet kan intermitterende pumpes fra separatoren til beluftningstanken, f.eks. 5 minutter hver 2,5 time for at recirkulere 1-1,5 l/h.
 - Et ikke-toksisk skumdæpningsmiddel i mindste koncentration kan bruges til at forhindre tab som følge af skumdannelse (f.eks. silikoneolie).
 - Luft kan presses gennem slammet i separatoren i korte chokbølger (f.eks. 10 sekunder hver time).
 - Det organiske materiale kan tilsættes beluftningstanken med bestemte intervaller (f.eks. 3-10 minutter hver time).

Kontrol og analyse

44. Med regelmæssige mellemrum måles den opløste iltkoncentration, temperaturen og pH-værdien af det aktiverede slam i beluftningstankene. Sørg for, at der altid er tilstrækkeligt ilt til stede ($> 2 \text{ mg/l}$), og at temperaturen holdes inden for det krævede interval (normalt $20\text{--}25^\circ\text{C}$). Hold pH på $7,5 \pm 0,5$ ved at tilsætte små mængder uorganisk base eller syre til beluftningstanken eller til indløbet eller ved at øge det organiske materials bufferkapacitet (se afsnit 27). I forbindelse med nitrifikation udvikles syre. Oxidering af 1 mg N producerer en mængde, der svarer til ca. 7 mg CO_3^{2-} . Målefrekvensen afhænger af den parameter, der skal måles, og af systemets stabilitet og kan variere mellem daglige og ugentlige målinger.
45. Måling af DOC eller COD i indløb til kontrol- og testbeholdere. Koncentrationen af testkemikalie i testindløbet måles ved hjælp af specifik analyse, eller den anslås ud fra koncentrationen i stamopløsningen (afsnit 31), den anvendte mængde og mængden af spildevand, der tilføres testenheden. Det anbefales, at koncentrationen af testkemikalien beregnes for at reducere variabiliteten i koncentrationsdata.
46. Der udtages relevante prøver fra det indsamlede udløb (f.eks. sammensatte prøver over 24 timer), og de filtreres gennem en membran med en porestørrelse på $0,45 \mu\text{m}$. De kan også centrifugeres ved ca. $40\,000 \text{ m/s}^2$ i ca. 15 minutter. Centrifugering bør benyttes, hvis filtrering er besværlig. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC eller COD for at måle den ultimative bionedbrydning og evt. den primære bionedbrydning ved hjælp af en analyse, der er specifik for testkemikalien.
47. Anvendelsen af COD kan medføre analyseproblemer ved lave koncentrationer og anbefales derfor kun, hvis der benyttes en tilstrækkelig høj testkoncentration (ca. 30 mg/l). Ved kraftigt adsorberende kemikalier anbefales det ligeledes, at mængden af adsorberet kemikalie i slammet måles ved hjælp af en analyseteknik, der er specifik for testkemikalien.
48. Hyppigheden af prøvetagning afhænger af testens forventede varighed. En anbefalet hyppighed er tre gange pr. uge. Når enhederne kører effektivt, kan der gå fra en uge til højst seks uger efter tilsætning af testkemikalien, inden tilpasningsfasen har nået et stabilt niveau (steady state). Der indsamles mindst 15 gyldige værdier i plateaufasen (afsnit 59), som normalt varer tre uger, inden testresultatet evalueres. Testen kan gennemføres, hvis der opnås en tilstrækkelig elimineringsgrad (f.eks. $> 90\%$), og disse 15 værdier, som repræsenterer analyser, der er udført hver arbejdsdag i tre uger, er tilgængelige. Testvarigheden bør normalt ikke overstige 12 uger efter tilsætning af testkemikalien.
49. Hvis slammet nitrificerer, og hvis testkemikaliet indvirkning på nitrificeringen skal undersøges, analyseres prøverne fra test- og kontrolenhedernes udløb mindst én gang om ugen, for så vidt angår ammoniak og/eller nitrit samt nitrat.
50. Alle analyser gennemføres så hurtigt som muligt, især målinger af nitrogen. Hvis analyserne forsinkes, opbevares prøverne mørkt ved ca. 4°C i flasker med tætsluttende låg. Hvis prøverne skal opbevares i mere end 48 timer, skal de konserveres ved hjælp af dybfrysning, syring (f.eks. 10 ml/l af en opløsning på 400 g/l af svovlsyre) eller tilsætning af et hensigtsmæssigt toksisk stof (f.eks. 20 ml/l af en 10 g/l -opløsning af kviksølv (II)-chlorid). Det sikres, at konserveringsteknikken ikke påvirker analyseresultaterne.

Kobling af testenheder

51. Hvis kobling (tillæg 3) anvendes, skal der dagligt udveksles den samme mængde aktiveret slam (150-1 500 ml for beluftningstanke med 3 l væske) mellem testenhedens beluftningstank og kontrolenhedens beluftningstank. Hvis testkemikallet adsorberer kraftigt til slammet, er det kun separatorernes svømmelag, der skal skiftes. I begge tilfælde skal der benyttes en korrektionsfaktor for at beregne testresultaterne (afsnit 55).

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

52. Beregn procentdelen af DOC- eller COD-eliminering af testkemikallet for hver tidsbaseret vurdering ved hjælp af ligningen:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

hvor

D_t = % eliminering af DOC eller COD på tidspunktet t

C_s = DOC eller COD i indløb, der skyldes testkemikallet, fortrinsvis anslået ud fra stamopløsningen (mg/l)

E = målt DOC- eller COD-værdi i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

E_o = målt DOC- eller COD-værdi i kontroludløb på tidspunktet t (mg/l)

53. Graden af DOC- eller COD-eliminering af det organiske materiale i kontrolenheden er nyttig viden i forbindelse med vurderingen af den biologiske nedbrydning af det aktiverede slam i løbet af testen. Beregn den procentvise eliminering ved hjælp af ligningen:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

hvor

D_B = % eliminering af DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolenheden på tidspunktet t

C_M = DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolindløbet (mg/l)

Beregn evt. den procentvise eliminering af DOC eller COD fremkaldt af det organiske materiale plus testkemikallet i testenheden ved hjælp af ligningen:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

hvor

D_T = % eliminering af DOC eller COD i samlet testindløb

C_T = DOC eller COD af samlet testindløb eller beregnet ud fra stamopløsning (mg/l)

54. Beregn elimineringen af testkemikallet målt ved hjælp af en specifik analysemetode på hvert vurderingstidspunkt ved hjælp af ligningen:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

hvor

D_{ST} = % primær eliminering af testkemikalie på tidspunktet t

S_i = målt eller estimeret koncentration af testkemikalie i testindløb (mg/l)

S_e = målt koncentration af testkemikalie i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

55. Hvis der er benyttet koblet tilstand, skal der kompenseres for fortyndingen af testkemikallet i beluftningstanken som følge af slamudskiftning ved hjælp af en korrektionsfaktor (se tillæg 3). Hvis der er benyttet en gennemsnitlig hydraulisk retentionstid på seks timer, og halvdelen af volumen af det aktiverede slam er udskiftet i beluftningstanken, skal de fastsatte daglige elimineringsværdier (D_t , afsnit 52) korrigeres for at opnå en korrekt elimineringsgrad, D_{tc} , af testkemikallet ved hjælp af ligningen:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Angivelse af testresultater

56. Indtegn den procentvise eliminering D_t (eller D_{tc}) og eventuelt D_{st} i forhold til tiden (se tillæg 2). Ud fra formen på testkemikallets elimineringskurve (i sig selv eller som DOC) kan der drages en række konklusioner om elimineringsprocessen.

Adsorption

57. Hvis der konstateres en høj DOC-eliminering af testkemikallet fra begyndelsen af testen, elimineres testkemikallet sandsynligvis ved adsorption til de aktiverede faststoffer i slam. Dette kan bevises ved at bestemme det adsorberede testkemikalie ved hjælp af specifikke analyser. Sædvanligvis forbliver DOC-elimineringen af adsorberbare kemikalier ikke høj i løbet af hele testen. Normalt sker der en høj grad af eliminering i starten, hvorefter den falder til en ligevægtsværdi. Hvis det adsorberbare testkemikalie på en eller anden måde kan forårsage akklimatisering af den mikrobielle population, vil DOC-elimineringen af testkemikallet efterfølgende stige og nå op på en høj plateauværdi.

Lag-fase

58. Som ved statiske screeningstest kræver mange testkemikalier en lag-fase, inden der sker fuld bionedbrydning. I lag-fasen sker der en akklimatisering eller tilpasning af de nedbrydende bakterier næsten uden eliminering af testkemikallet, og derefter begynder disse bakteriers indledningsvise vækst. Denne fase afsluttes, og nedbrydningsfasen indledes, når ca. 10 % af den oprindelige mængde testkemikalie er elimineret (efter mulighed for eventuel adsorption). Lag-fasen er ofte stærkt varierende og vanskelig at reproducere.

Plateaufase

59. En elimineringskurves plateaufase i en kontinuerlig test defineres som den fase, hvor den maksimale nedbrydning finder sted. Plateaufasen bør være mindst tre uger og have ca. 15 målte gyldige værdier.

Middelimineringsgrad for testkemikalie

60. Beregn middelværdien ud fra elimineringsværdierne (D_t) for testkemikallet i plateaufasen. Afrundet til nærmeste heltal (1 %) angiver den graden af eliminering af testkemikallet. Det anbefales endvidere at beregne 95 %-konfidensintervallet af middelværdien.

Eliminering af organisk materiale

61. Indtegn procentdelen af eliminering af DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolenheden (D_B) i forhold til tiden. Angiv middelgraden af eliminering på samme måde som for testkemikallet (afsnit 60).

Indikation for bionedbrydning

62. Hvis testkemikallet ikke tydeligt adsorberes til det aktiverede slam, og elimineringskurven har en typisk form for en bionedbrydningskurve med lag-, nedbrydnings- og plateaufaser (afsnit 58 og 59), kan den målte eliminering med sikkerhed tilskrives bionedbrydning. Hvis der er sket en høj eliminering i starten, kan simuleringstesten ikke differentiere mellem biologiske og abiotiske elimineringsprocesser. I sådanne tilfælde, og hvis der i øvrigt er tvivl om den biologiske nedbrydning (f.eks. hvis der optræder stripping), skal de adsorberede testkemikalier analyseres, eller yderligere statiske test af bionedbrydning gennemføres baseret på parametre, der klart indikerer biologiske processer. Sådanne test omfatter metoder til oxygenoptagelse [kapitel C.4 D, E og F i dette bilag (6)], test med måling af kuldioxidproduktion [kapitel C.4 C i dette bilag (6)] eller ISO Headspace-metoden (18), der benytter et præeksponeret inokulum fra simuleringstesten. Hvis både DOC-elimineringen og den specifikke eliminering af kemikallet er målt, indikerer signifikante forskelle (hvis førstnævnte er lavere end sidstnævnte) mellem de eliminerede procentdele, at der i udløbet forekommer mellemliggende organiske produkter, som kan være sværere at nedbryde end det oprindelige kemikalie.

Testresultaternes validitet

63. Oplysninger om den normale biologiske nedbrydningsproces af inokulum fås, når elimineringsgraden af det organiske materiale (afsnit 53) i kontrolenheden fastlægges. Testen anses for at være gyldig, hvis graden af DOC- eller COD-eliminering i kontrolenhederne er $> 80\%$ efter to uger, og der ikke er gjort unormale observationer.
64. Hvis der er benyttet et let biologisk nedbrydeligt kemikalie (reference), bør graden af bionedbrydning (D_t , afsnit 52) være $> 90\%$.
65. Hvis testen gennemføres under nitrificerende forhold, bør middelkoncentrationen i udløb være < 1 mg/l ammoniak-N og < 2 mg/l nitrit-N.
66. Hvis disse kriterier (afsnit 63-65) ikke opfyldes, gentages testen ved hjælp af et inokulum fra en anden kilde, hvorefter et referencekemikalie testes, og alle forsøgsprocedurer kontrolleres.

Testrapport

67. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

- identifikationsdata
- fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber.

Testbetingelser:

- typen af testsystem; evt. modificeringer for test af uopløselige og flygtige kemikalier
- typen af organisk materiale
- art og andel af industrispildevand i spildevandet, hvis kendt
- inokulum, art og prøvetagningssted(er), koncentration og evt. forkonditionering
- stamopløsning af testkemikalie: DOC- og TOC-indhold; tilberedning i tilfælde af suspension; anvendt testkoncentration; årsager, hvis uden for intervallet 10-20 mg/l DOC; tilsætningsmetode; dato for første tilsætning; evt. ændringer
- gennemsnitlig slamalder og gennemsnitlig hydraulisk retentionstid, slamoverløbsmetode, metoder til afhjælpning af fyldning, tab af slam osv.
- anvendte analyseteknikker
- testtemperatur
- kvaliteter af slamfyld, slamvolumenindeks (SVI), faste stoffer, der er suspenderet (MLSS)
- enhver afvigelse fra standardprocedurer og alle omstændigheder, der kan have påvirket resultaterne.

Testresultater:

- alle målte data (DOC, COD, specifikke analyser, pH-værdi, temperatur, iltkoncentration, suspenderede stoffer og N-kemikalier, hvis det er relevant)
- alle beregnede værdier af D_t (eller D_{t0}), D_B og D_{St} opstillet i tabelform og elimineringskurver
- oplysninger om lag- og plateaufaser, testvarighed, elimineringsgraden af testkemikallet og det organiske materiale i kontrolenheden, statistiske oplysninger og udtryk for biologisk nedbrydelighed og testens validitet
- diskussion af resultater.

LITTERATUR:

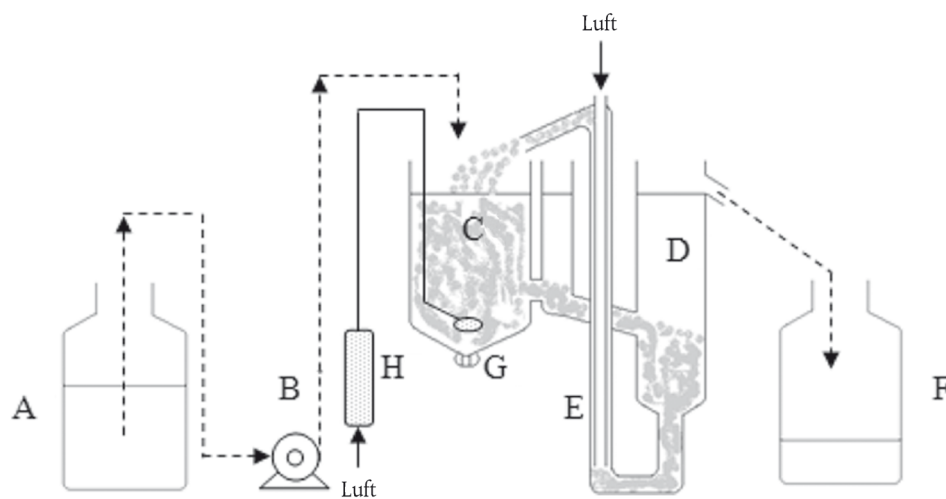
- (1) Swisher RD (1987). »Surfactant Biodegradation«, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 s.
 - (2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.
 - (3) Painter HA og King EF (1978a). WRC porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Det Forenede Kongerige.
 - (4) Painter HA og King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.
 - (5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
 - (6) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.
 - (7) Kapitel C.12 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — modificeret SCAS-test.
 - (8) Kapitel C.19 i dette bilag, Bestemmelse af adsorptionskoefficienten (K_{OC}) i jord og i kloakslam med HPLC (high performance liquid chromatography).
 - (9) Gerike P og Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.
 - (10) Gerike P og Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
 - (11) Painter HA og Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s 113-138, i: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
 - (12) ISO 11733 (1995; revideret 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium — activated sludge simulation test.
 - (13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
 - (14) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
 - (15) Gerike P, Fischer WK og Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.
 - (16) Baumann U, Kuhn G og Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
 - (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91-98 ISBN 011 751661 9.
 - (18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.
-

Tillæg 1

Figur 1

Udstyr til vurdering af bionedbrydelighed

Husmann-enhed

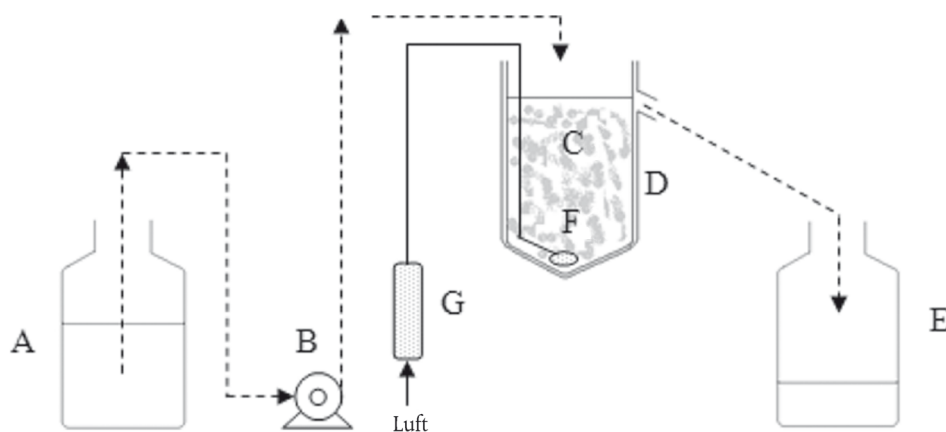


- | | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| A. Opbevaringstank | E. Trykluftpumpe |
| B. Doseringspumpe | F. Opsamlingstank |
| C. Beluftningskammer (kapacitet: 3 l) | G. Beluftningsanordning |
| D. Sedimentationsbeholder | H. Flowmeter |

Figur 2

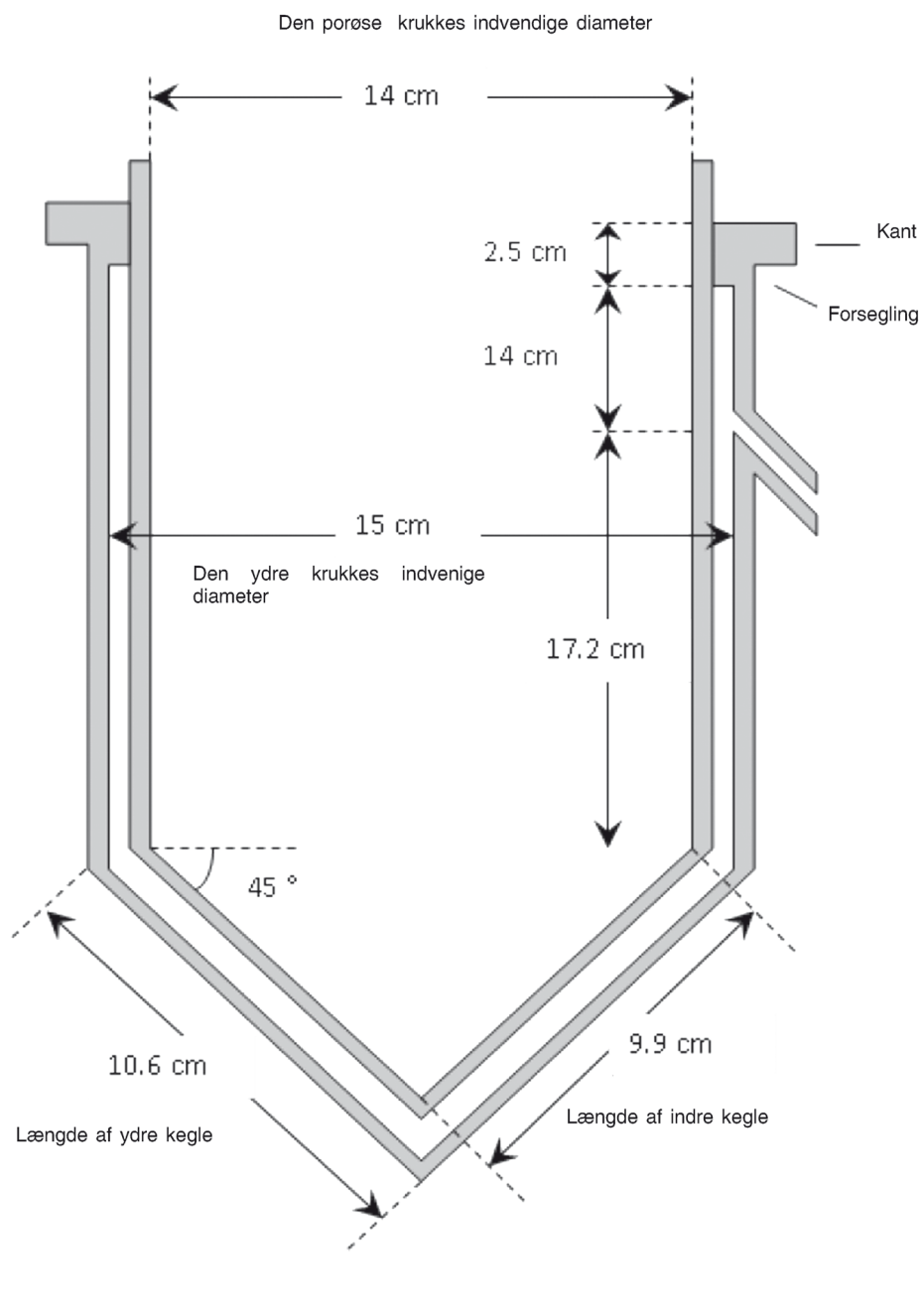
Udstyr til vurdering af bionedbrydelighed

Porøse krukker



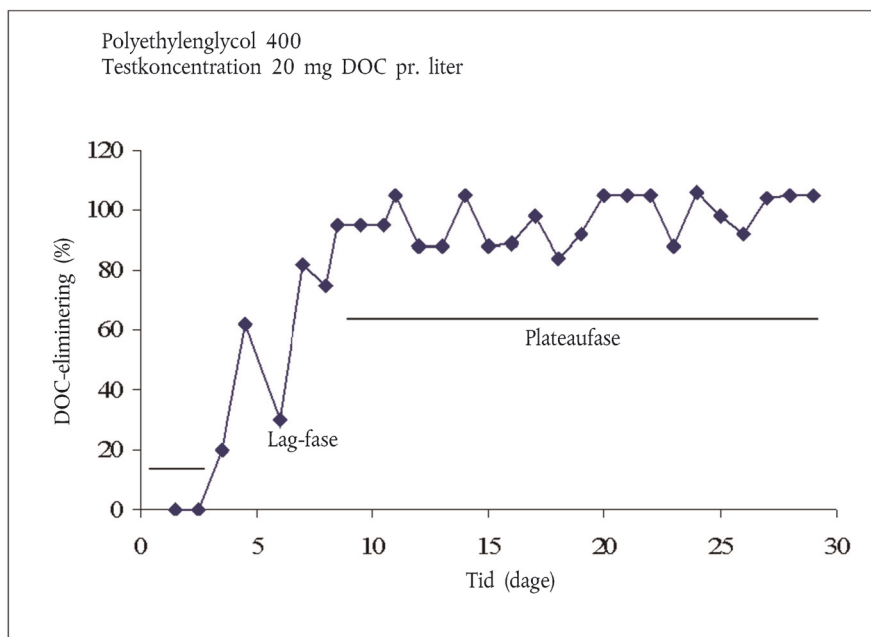
- | | |
|--------------------------|-------------------|
| A. Opbevaringstank | E. Opsamlingstank |
| B. Doseringspumpe | F. Diffuser |
| C. Porøs beluftningstank | G. Flowmeter |
| D. Ydre tæt beholder | |

Figur 3

Porøs krukke som beluftningstank – 31

Tillæg 2

Eksempel på en elimineringskurve



Tillæg 3

[TIL ORIENTERING]

KOBLING AF TESTENHEDER

For at forsøge at udligne de mikrobielle populationer i slam i en testenhed, der tilføres spildevand og et testkemikalie, og i en kontrolenhed, der kun tilføres spildevand, blev der indført en daglig udskiftning af slam (1). Proceduren kaldes kobling, og metoden er kendt som koblede enheder. Kobling blev i starten udført ved hjælp af aktiverede slamenheder (Husmann), men det anvendes også i forbindelse med porøse krukker (2) (3). Der er ikke konstateret væsentlige forskelle i resultaterne mellem ikke-koblede og koblede enheder, hverken med Husmann-enheder eller porøse krukker, så der opnås ingen fordel ved at bruge tid og energi på at koble enhederne.

Udveksling af slam kan give indtryk af en ret omfattende eliminering, idet nogle af testkemikalierne overføres, og koncentrationerne af testkemikaliets i test- og kontroludløbet bliver næsten ens. Der skal derfor anvendes korrektionsfaktorer, som afhænger af den andel, der udskiftes, og den hydrauliske middelretentionstid. Der er offentliggjort nærmere oplysninger om beregningen (1).

Beregn den korigerede DOC- eller COD-elimineringsgrad ved hjælp af den generelle formel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12) / (1 - a \cdot r/12) \%$$

hvor

D_{tc} = korigeret % DOC- eller COD-eliminering

D_t = konstateret % DOC- eller COD-eliminering

a = udskiftningens andel af de aktiverede slamenheders volumen

r = gennemsnitlig hydraulisk retentionstid (t)

Eksempel: Hvis halvdelen af beluftningstankens volumen udskiftes ($a = 0,5$), og den gennemsnitlige hydrauliske retentionstid er seks timer, anvendes følgende korigerende formel:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITTERATUR

- (1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.
- (2) Painter HA og Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113-138. I: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Det Forenede Kongerige.

Tillæg 4

EVALUERING AF HÆMNINGEN AF DET AKTIVEREDE SLAM

Proces med testkemikalier

1. Visse kemikalier (eller spildevand) bliver muligvis ikke nedbrudt eller elimineret i simuleringstesten, og de kan endog have en hæmmende effekt på slammets mikroorganismer. Andre kemikalier nedbrydes biologisk ved lave koncentrationer, men er hæmmende ved højere koncentrationer (hormese). Der kan være påvist hæmmende effekter på et tidligere stadium, eller det kan være bestemt ved hjælp af en toksicitetstest, hvor der er anvendt et inokulum, der svarer til eller er identisk med det, der blev anvendt i simuleringstesten (1). Eksempler på sådanne metoder er hæmning af iltoptagelse [kapitel C.11 i dette bilag (2) og ISO 8192(3)] eller hæmning af vækst af slamorganismer [ISO 15522 (4)].
2. I simuleringstesten vil enhver hæmning vise sig ved, at forskellen i opløst organisk kulstof (DOC) eller kemisk iltforbrug (COD) mellem udløbet fra testbeholderen og udløbet fra kontrollen er større end det DOC, der er tilsat som testkemikalie. Udtrykt på en anden måde vil den procentvise eliminering af DOC (og det biokemiske iltforbrug (BOD), COD og/eller NH_4^+) af det organiske materiale blive reduceret ved behandling i kraft af tilstedeværelsen af testkemikaliet. Hvis det sker, gentages testen, hvor koncentrationen af testkemikaliet reduceres, indtil der nås et niveau, hvor der ikke sker nogen hæmning, og måske reduceres yderligere, indtil testkemikaliet er biologisk nedbrudt. Hvis testkemikaliet (eller spildevandet) imidlertid har negative virkninger på processen ved alle testede koncentrationer, tyder det på, at kemikaliet er svært og muligvis umuligt at behandle biologisk. Det er dog værd at gentage testen med aktiveret slam fra en anden kilde og/eller underkaste slammene en langsommere akklimatisering.
3. Hvis testkemikaliet omvendt elimineres biologisk i første forsøg i simuleringstesten, skal koncentrationen forøges, hvis der skal indsamles viden om, hvorvidt kemikaliet kan være hæmmende.
4. Når man forsøger at bestemme grader af hæmning, skal man være opmærksom, at den aktiverede slampopulation kan undergå forandringer, så mikroorganismerne over tid kan udvikle en tolerance over for et hæmmende kemikalie.
5. Beregning af hæmningsgrad:

Den overordnede procentvise eliminering R_o , af BOD, DOC, COD osv., kan for test- og kontrolenheder beregnes ved hjælp af ligningen:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

hvor:

I = indløbs koncentration af BOD, DOC, COD mv. i forbindelse med test- eller kontrolbeholdere (mg/l)

E = udløbs koncentrationer (mg/l).

I og E skal korrigeres for DOC, der skyldes testkemikaliet i testenhederne. Ellers vil beregningerne af den procentvise hæmning ikke blive korrekt.

Graden af hæmning forårsaget af tilstedeværelsen af testkemikaliet kan beregnes ved hjælp af ligningen:

$$\% \text{ hæmning} = 100 (R_c - R_t)/R_c$$

hvor:

R_c = procentvis eliminering i kontrolbeholderne

R_t = procentvis eliminering i testbeholderne.

LITTERATUR

- (1) Reynolds L et al. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.
- (2) Kapitel C.11 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest.
- (3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- (4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

Tillæg 5

Testkemikalier, der er tungtopløselige i vand — flygtige kemikalier**Kemikalier, der er tungtopløselige i vand**

Der er tilsyneladende kun offentliggjort enkelte rapporter om test af vandopløselige og uopløselige kemikalier i forbindelse med spildevandsrensning (1) (2) (3).

Der findes ingen enkeltstående metode til dispergering af testkemikalier, der kan benyttes på alle uopløselige kemikalier. To af de fire metodetyper, der er beskrevet i ISO 10634 (4), kan muligvis bruges til at dispergere testkemikalier med henblik på simuleringstest. Det drejer sig om brug af emulgeringsmidler og/eller ultralyd. Det skal godtgøres, at den resulterende dispergering er stabil i perioder på mindst 24 timer. Velstabiliserede dispergeringer, der etableres under konstant omrøring i en beholder (afsnit 38), skal derefter overføres til en beluftningstank, der holdes adskilt fra husholdningsspildevand (eller syntetisk spildevand).

Hvis dispergeringerne er stabile, undersøges det, hvordan testkemikallet kan bestemmes i dispergeret form. Det er ikke sandsynligt, at DOC vil være velegnet. Der skal derfor etableres en specifik analysemetode for testkemikallet, som kan anvendes på udløb, faststoffer i udløb og aktiveret slam. Testkemikallets skæbne i simuleringen af processen for aktiveret slam bestemmes derefter i flydende og faste faser. Derefter fastsættes en »massebalance« med henblik på at afgøre, om testkemikallet er blevet biologisk nedbrudt. Det indikerer dog kun den primære biologiske nedbrydning. Påvisning af ultimativ biologisk nedbrydning sker ved at anvende af en respirometertest for let biologisk nedbrydelighed (kapitel C.4 i dette bilag (5) C, F eller D), hvor inokulumslam eksponeres for testkemikallet i simuleringstesten.

Flygtige kemikalier

Udførelsen af simuleringer af spildevandsrensning på flygtige kemikalier er både kontroversiel og problematisk. Ligesom for testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, er der offentliggjort meget få rapporter, der beskriver simuleringstest af flygtige kemikalier. En konventionel type apparatur til fuldstændig opblanding tilpasses ved at forsegle beluftnings- og sedimentationstankene, måle og styre luftstrømmen ved hjælp af flowmetre og lede den udgangsgas gennem udskillere med henblik på at indsamle flygtigt organisk materiale. I nogle tilfælde benyttes en vakuumpumpe til at suge udgangsgassen gennem en »kold« udskiller eller en udsugningsudskiller med Tenax og silicagel med henblik på gaskromatografiske analyser. Testkemikallet i udskilleren kan bestemmes analytisk.

Testen udføres i to etaper. Først kører enhederne uden slam, men hvor syntetisk spildevand og testkemikallet pumpes ind i beluftningstanken. Prøver fra indløb, udløb og udgangsgas indsamles og analyseres for testkemikallet i et par dage. Ud fra de indsamlede data kan den procentdel (R_{VP}) af testkemikallet, der strippes fra systemet, beregnes.

Derefter gennemføres den normale biologiske test (med slam) under samme driftsbetingelser som stripningsundersøgelsen. Der udføres ligeledes DOC- eller COD-målinger for at kontrollere, at enhederne fungerer effektivt. Der udføres lejlighedsvis analyser for at bestemme testkemikallet i indløb, udløb og udgangsgas i den første del af testen. Efter akklimatisering gennemføres hyppigere analyser. Ud fra steady state-data beregnes procentdelen af den eliminering af testkemikallet fra væskefasen, der sker som følge af alle processer (R_T) (fysisk og biologisk), og andelen af (R_V), der er strippes fra systemet.

Beregning:

- a) I den ikke-biologiske test beregnes procentdelen (R_{VP}) af det testmateriale, der strippes fra systemet, ved hjælp af ligningen:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

hvor

R_{VP} = eliminering af testkemikalie ved fordampning (%)

S_{VP} = testkemikalie opsamlet i udskiller udtrykt som tilsvarende koncentration i væskefasen (mg/l)

S_{IP} = koncentration af testkemikalie i indløb (mg/l).

- b) I den biologiske test beregnes procentdelen (R_V) af det testmateriale, der strippes fra systemet, ved hjælp af ligningen:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

hvor

R_V = eliminering af testkemikalie ved fordampning i biologisk test (%)

S_V = testkemikalie opsamlet i udskiller i biologisk test udtrykt som tilsvarende koncentration i det flydende indløb (mg/l)

S_I = koncentration af testkemikalie i indløb (mg/l).

- c) I den biologiske test beregnes den procentdel (R_T) af testkemikaliets, der fjernes af alle processer, ved hjælp af ligningen:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

hvor

S_E = koncentration af testkemikalie i det (flydende) udløb (mg/l).

- d) Den procentdel (R_{BA}), der fjernes ved bionedbrydning plus adsorption, beregnes ved hjælp af ligningen:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Der udføres separate test for at bestemme, om testkemikaliets er adsorberet. Hvis det er tilfældet, skal der foretages yderligere korrektion.

- e) En sammenligning mellem den andel af testkemikalie, der stripes fra de biologiske (R_v) og de ikke-biologiske testsystemer (R_{vp}), viser den generelle virkning, som biologisk behandling har på emissionen af testkemikaliets i atmosfæren.

Eksempel: Benzen

Slamretentionstid = 4 dage

Syntetisk spildevand: retentionstid = 8 timer

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} \quad (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ µg/l}$$

Således ...

$$R_{VP} = 100 \%, R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ og } R_{BA} = 85 \%$$

Benzen anses derfor ikke til at blive adsorberet til slam.

LITTERATUR

- (1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (5) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

Tillæg 6

Virkninger af slamretentionstid (SRT) på mulighederne for at behandle kemikalier

INDLEDNING

1. Den metode, der beskrives i selve teksten, har til formål at afdække, om de testede kemikalier (normalt kemikalier, der er inhærent biologisk nedbrydelige, men ikke let biologisk nedbrydelige) kan nedbrydes biologisk inden for de rammer, der eksisterer i større spildevandsanlæg. Resultaterne udtrykkes som procentvis eliminering og procentvis bionedbrydning. Driftsforholdene i aktivslamenhederne og valget af indløb giver mulighed for temmelig store variationer i koncentrationen af testkemikaliets i udløbet. Testene udføres ved kun én nominel koncentration af slamfaststoffer eller én nominel slamretentionstid (SRT), og de beskrevne slamoverløbssystemer kan bevirke, at SRT-værdien varierer betydeligt i løbet af testen, både fra dag til dag og i løbet af dagen.
2. I denne variant (1) (2) holdes SRT inden for meget snævrere grænser i løbet af hver periode på 24 timer (på samme måde som i stort forhold), hvilket fører til en mere konstant koncentration i udløb. Det anbefales at bruge husholdningsspildevand, idet det giver mere konsistente og højere procentvis eliminering. Virkningerne af en række SRT-værdier undersøges, og i en mere detaljeret undersøgelse kan virkningerne af forskellige temperaturintervaller på forskellige udløbs koncentration bestemmes.
3. Der er endnu ikke generel enighed om de anvendelige kinetiske modeller, når kemikalier bionedbrydes i forbindelse med spildevandsrensning. Monod-modellen for bakteriel vækst og substratudnyttelse blev valgt (1) (2) til brug på de indsamlede data, idet metoden var beregnet til kun at blive brugt på kemikalier, der var produceret i store mængder, og som resulterede i spildevandskoncentrationer over 1 mg/l. Validiteten af den forenkledte model og de angivne beregninger blev bekræftet ved hjælp af en serie alkoholethoxylater med varierende grader af primær bionedbrydelighed (2) (3).

Bemærk: Denne variantmetode ligger tæt op ad teksten til denne testmetode C.10-A, og det er kun de afvigende oplysninger, der herefter angives.

TESTENS PRINCIP

4. Enheder med porøse krukke til aktiveret slam, som er beregnet til at lette (næsten) kontinuerligt overløb af blandet væske, således at slamretentionstiden (SRT eller θ_c) kan styres meget præcist, anvendes i ikke-koblet tilstand over et interval af SRT'er og evt. et interval af temperaturer. Retentionstiden er normalt 2-10 dage, og temperaturen ligger mellem 5 og 20 °C. Spildevandet, helst husholdningsspildevand, tilsættes sammen med en opløsning af testkemikaliets separat til enhederne i intervaller for at opnå den krævede retentionstid for spildevandet (3-6 timer) og den krævede koncentration af testkemikaliets i indløbet. Kontrolenheder, der ikke tilføres testkemikalier, kører parallelt med henblik på sammenligning.
5. Andre former for apparatur kan benyttes, men der skal udvises stor omhu for at opnå effektiv styring af SRT. Hvis der anvendes anlæg, som omfatter en sedimenteringsenhed, skal der f.eks. tages højde for tab af faststoffer via anlæggets udløb. Endelig skal der også tages særlige forholdsregler for at undgå fejl forårsaget af variationer i mængden af slam i sedimenteringsenheden.
6. Enhederne drives ved hvert af de valgte sæt betingelser. Når ligevægtstilstanden er nået, opnås de gennemsnitlige steady state-koncentrationer af testkemikaliets i udløbet og evt. DOC i løbet af en periode på ca. tre uger. Ud over at vurdere den procentvis eliminering af testkemikaliets og evt. DOC udtrykkes forholdet mellem driftsforholdene i et anlæg og koncentrationen i udløbet grafisk. På den baggrund kan tentative kinetiske konstanter beregnes, og de betingelser, hvorunder testkemikaliets kan behandles, kan forudsiges.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Kapitel C.10 A, afsnit 12 og 13, finder anvendelse.

TÆRSKELVÆRDIER

8. Kapitel C.10 A, afsnit 14 og 15, finder anvendelse.

REFERENCETESTKEMIKALIE

9. Kapitel C.10 A, afsnit 16, finder anvendelse.

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

10. Kapitel C.10 A, afsnit 17 og 18, finder anvendelse.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

11. En velegnet enhed er det modificerede system med porøse krukke (tillæg 6.1). Det består af en indvendig beholder (eller foring) fremstillet af porøst polypropylen med en tykkelse på 3,2 mm og en porestørrelse på ca. 90 µm. Samlingen er stumpsvejset. (Det giver en mere robust enhed end den, der er beskrevet i afsnit 21 i dette kapitel, C.10 A.) Foringen er indsat i en tæt ydre beholder af polyethylen, der består af to dele: en cirkelrund fod, hvori der er boret huller til to luftslanger og en slange til slamoverløb, samt en påmonteret cylinder, der skrues fast på foden, og som er forsynet med et udløb, der er placeret, så der opnås et bestemt volumen (3 l) i den porøse krukke. En af luftslangerne er udstyret med en diffuser-sten, og den anden afslutter åbent og er placeret vinkelret på stenen i krukken. Dette system frembringer turbulens, der sikrer, at krukken indhold blandes effektivt, og at der opnås koncentrationer af opløst ilt over 2 mg/l.
12. Et passende antal enheder opbevares ved kontrollerede temperaturer i intervallet fra 5-20 °C (± 1 °C) enten i vandbad eller i lokaler med konstant rumtemperatur. Ved hjælp af pumper tilføres opløsningen af testkemikaliet og bundfældet spildevand til beluftningstankene i de angivne doser (0-1,0 ml/min. og 0-25 ml/min.), og ved hjælp af en tredje pumpe fjernes affaldsslam fra beluftningstankene. Den nødvendige meget lave strømningshastighed for affaldsslam opnås ved hjælp af en pumpe, der indstilles til en højere hastighed og kun kører i intervaller styret af en timer. Pumpen kører f.eks. pumpen i 10 sekunder pr. minut, hvor den pumper med 3 ml/min., hvilket giver en strømningshastighed for affaldsslam på 0,5 ml/min.

Filtreringsapparat eller centrifuge

13. Kapitel C10 A, afsnit 23, finder anvendelse.

Analyseudstyr

14. Kapitel C.10 A, afsnit 24, finder anvendelse.

Vand

15. Kapitel C.10 A, afsnit 25 og 26, finder anvendelse.

Organisk materiale

16. Kapitel C.10 A, afsnit 27, finder anvendelse.

Syntetisk spildevand

17. Kapitel C.10 A, afsnit 28, finder anvendelse.

Husholdningsspildevand

18. Kapitel C.10 A, afsnit 29, finder anvendelse.

Aktiveret slam

19. Kapitel C10 A, afsnit 30, finder anvendelse.

Stamopløsninger af testkemikaliet

20. Kapitel C.10 A, afsnit 31 og 32, finder anvendelse.

FREMGANGSMÅDE

Fremstilling af inokulum

21. Kapitel C.10 A, kun afsnit 34, finder anvendelse — brug aktiveret slam (ca. 2,5 g/l).

Antal testenheder

22. Til en enkel test, f.eks. måling af den procentvise eliminering, kræves kun en enkelt SRT. Hvis der skal indsamles data til beregning af tentative kinetiske konstanter, kræves der dog fire eller fem SRT-værdier. Der vælges normalt værdier mellem 2 og 10 dage. I praksis udføres en test med fire eller fem SRT'er samtidig ved én temperatur. Ved udvidede forsøg benyttes de samme SRT-værdier eller måske et andet interval af værdier ved andre temperaturer inden for et

interval fra 5-20 °C. Ved primær bionedbrydning (hovedanvendelse) kræves normalt kun én enhed pr. sæt betingelser. For at opnå den ultimative biologiske nedbrydelighed kræves en kontrolenhed for hvert sæt betingelser, og denne enhed tilføres spildevand, men ikke testkemikalie. Hvis testkemikalien anses for at være til stede i det brugte spildevand, skal der anvendes kontrolenheder i forbindelse med vurderingen af den primære biologiske nedbrydning, hvorefter beregningerne korrigeres som nødvendigt.

Dosering af organisk materiale og testkemikalie

23. Kapitel C.10 A, afsnit 36-39, finder anvendelse. Det bør dog bemærkes, at opløsningen af testkemikalier doseres separat, og at der benyttes forskellige overløbsprocenter for slam. Strømningshastigheder for indløb, udløb og slamoverløb overvåges og justeres eventuelt inden for $\pm 10\%$ f.eks. to gange om dagen. Hvis der opstår problemer i forbindelse med analysemetoderne, når der benyttes husholdningsspildevand, kan testen gennemføres med syntetisk spildevand. Det skal dog sikres, at de forskellige medier giver sammenlignelige kinetiske data.

Håndtering af enheder til aktiveret slam

24. Kapitel C.10 A, afsnit 40 til 43, finder anvendelse. SRT kontrolleres dog kun ved »konstant« slamoverløb.

Prøvetagning og analyse

25. Kapitel C.10 A, afsnit 44-50, finder anvendelse. Dog skal koncentrationen af testkemikalien og evt. DOC bestemmes. COD bør ikke anvendes.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

26. Kapitel C.10 A, afsnit 52-54, finder anvendelse.

Angivelse af testresultater

27. Kapitel C.10 A, afsnit 56-62, finder anvendelse.

Beregning af kinetiske konstanter

28. Det er mere realistisk at anføre testkemikaliet gennemsnitlige steady state-koncentration i udløbet og beskrive, hvordan denne værdi varierer med driftsforhold, end at anføre den procentvise primære biologiske nedbrydning. Dette kan gøres ved hjælp af ligningen (6) i tillæg 6.2, der kan give værdier til K_S , μ_m og ϑ_{SC} , den kritiske slamretentionstid.

(Alternativt kan de omtrentlige værdier for K_S og μ_m fås ved hjælp af et simpelt computerprogram, som tilpasser den teoretiske kurve, der er beregnet ud fra ligning 2 (tillæg 6.2), til de målte forsøgsværdier. Selv om en given løsning ikke vil være unik, kan der fås en brugbar tilnærmelse af K_S og μ_m .)

Resultaters variabilitet

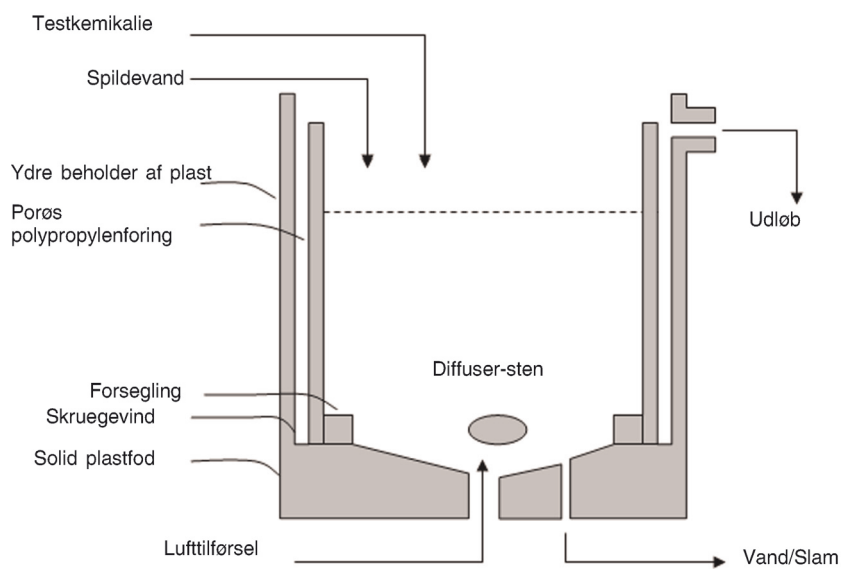
29. Det er velkendt, at der opnås variable værdier for kinetiske parametre for forskellige kemikalier. Det antages, at de forhold, som slammet er udviklet under, og de aktuelle betingelser i testen (som i afsnit 5 og i andre testforløb) i væsentlig grad påvirker de resulterende værdier. Et af aspekterne ved denne variabilitet er blevet behandlet af Grady et al. (4), der har foreslået, at udtrykkene »extant« og »intrinsic« burde anvendes i forbindelse med to ekstreme forhold, der repræsenterer grænserne for den fysiologiske tilstand, en dyrkning kan opnå i forbindelse med et kinetisk eksperiment. Hvis tilstanden ikke må ændres under testen, afspejler de kinetiske parameterværdier de forhold i miljøet, hvorfra mikroorganismen blev udtaget. Disse værdier kaldes »extant« eller i daglig tale »eksisterende«. Ved det andet ekstreme forhold, hvor testens betingelser går ud på at tillade den fulde udvikling af proteinsyntese-systemet og tillade den størst mulige vækstrate, kaldes de opnåede kinetiske parametre »intrinsic«, og de er kun afhængige af substratets tilstand og bakterietyperne i dyrkningen. Som en vejledning kan man tænke på, at »extant values« opnås ved at holde forholdet mellem koncentrationen af substrat og kompetente mikroorganismer (S_0/X_0) lavt, f.eks. 0,025, hvorimod der er tale om »intrinsic values«, når forholdet er højt, f.eks. mindst 20. I begge tilfælde skal S_0 være lig med eller større end den relevante værdi for K_S (halvmætningskonstanten).

30. Variabilitet og andre facetter ved bionedbrydningskinetik blev for nylig diskuteret i forbindelse med en SETAC-workshop (5). Disse forsøg — rapporterede og planlagte — vil give et klarere indblik i kinetikken i spildevandsrensingsanlæg og medvirke til at give en bedre forståelse af eksisterende data, ligesom de vil medvirke til mere relevante designs til fremtidige testmetoder.

LITTERATUR:

- (1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.
 - (2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.
 - (3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.
 - (4) Grady CPL, Smets BF og Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.
 - (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop hos Port Sunlight, Det Forenede Kongerige. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4.-6. sept. 1996. SETAC-Europe, Bruxelles.
-

Tillæg 6.1

Porøs krukke med SRT-styring

Tillæg 6.2

Beregning af kinetiske konstanter

1. Når det antages, at Monod-kinetik gør sig gældende, og på baggrund af en massebalance af aktive faststoffer og substrat i det aktiverede slamsystem (1) kan der opnås følgende steady state-udtryk:

$$\frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

eller

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

hvor:

S_1 = koncentration af substrat i udløb, (mg/l)

K_s = halvmætningskonstant, den koncentration, hvor $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifik vækstrate (d^{-1})

μ_m = maksimumsværdi for μ_m (d^{-1})

K_d = specifik henfaldsrate for aktive faststoffer (d^{-1})

ϑ_s = slammets gennemsnitlige retentionstid, SRT (d)

En undersøgelse af denne ligning fører til følgende konklusioner:

- i) Udløbets koncentration er uafhængig af koncentrationen i indløbet (S_0). Derfor varierer den procentvis biologiske nedbrydning med indløbets koncentration, S_0 .
- ii) Den eneste parameter for anlægsstyring, der påvirker S_1 , er slamretentionstiden, ϑ_s .
- iii) For en given koncentration i indløbet, S_0 , vil der være en kritisk slamretentionstid:

$$\frac{1}{\vartheta_{sc}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

hvor:

ϑ_{sc} = kritisk slamretentionstid, under hvilken de kompetente mikroorganismer vaskes ud af anlægget.

- iv) Da de andre parametre i ligning (2) er knyttet til vækstkinetik, vil temperaturen sandsynligvis påvirke substratniveauet i udløbet og den kritiske slamalder, dvs. at den slamretentionstid, der er nødvendig for at opnå en bestemt behandlingsgrad, stiger med faldende temperatur.
2. På baggrund af en massebalance af faststoffer i systemet med porøse krukker og forudsat, at faststofkoncentration i anlæggets udløb, X_2 , er lav i forhold til koncentrationen i beluftningstanken, X_1 , vil slamretentionstiden være

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

og

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

hvor:

V = beluftningstankens volumen (l)

X_1 = faststofkoncentration i beluftningstank (mg/l)

X_2 = faststofkoncentrationen i udløb, (mg/l)

Q_0 = gennemstrømningshastighed for indløb (l/d)

Q_1 = gennemstrømningshastighed for affaldsslam (l/d)

Derved kan slamretentionstiden styres ved enhver forudvalgt værdi ved at styre gennemstrømningshastigheden for affaldsslam, Q_1 .

Konklusioner:

- Testens hovedformål er derfor at kunne forudsige udløbets koncentration og dermed niveauerne af testkemikalie i det modtagende vand.
- Ved at afsætte S_1 i forhold til ϑ_s kan den kritiske slamretentionstid, ϑ_{SC} , nogle gange evalueres direkte, f.eks. kurve 3 i figur 1. Når dette ikke er muligt, kan ϑ_{SC} beregnes, sammen med omtrentlige værdier for μ_m og K_s , ved at afsætte S_1 i forhold til $S_1 \cdot \vartheta_s$.

En ændring af ligningen (1) giver

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

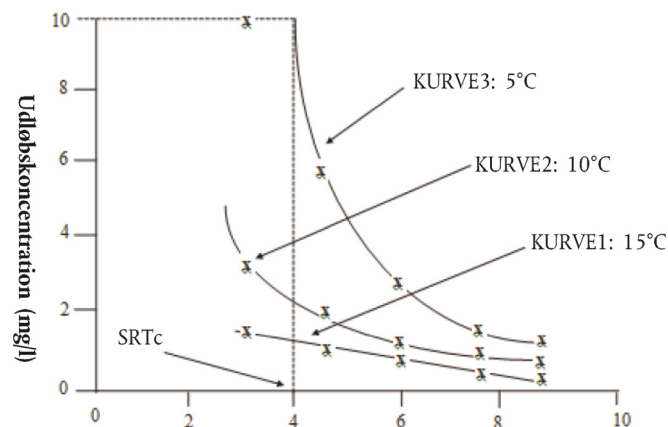
Hvis K_d er lille, bliver $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ og [5]:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

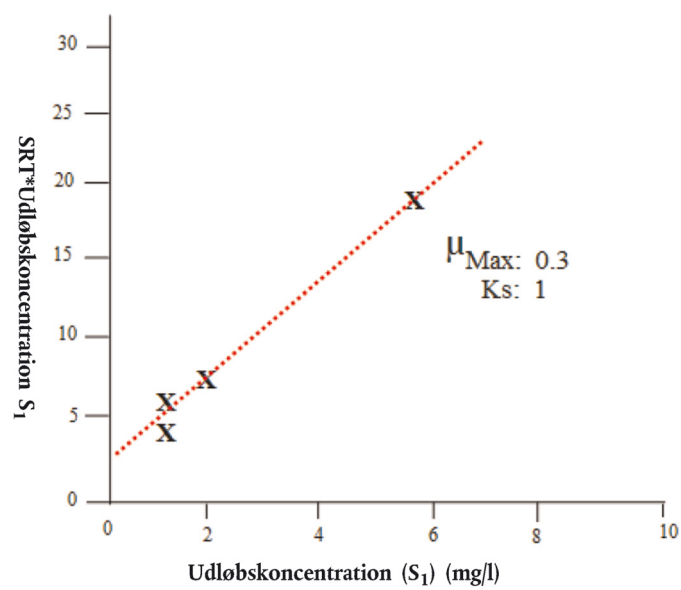
Grafen skulle dermed blive en lige linje (se figur 2) af hældningen $1/\mu_m$ og skære K_s/μ_m — altså $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$.

Figur 1

Tre temperaturer; fem SRT'er



Figur 2

Regressionslinje $SRT \cdot S_1$ over for S_1 ved $T = 5^\circ\text{C}$ 

Ordliste:
Udløbskoncentration
Kurve.

Tillæg 7

TEST VED LAVT (µg/l) KONCENTRATIONSOMRÅDE

1. Mange kemikalier er normalt til stede i vandmiljøet i meget lave koncentrationer (µg/l) — selv i spildevand. Ved disse koncentrationer fungerer de sandsynligvis ikke som primære substrater, der fremmer vækst. Der er større sandsynlighed for, at de nedbrydes som sekundære substrater uden vækst sideløbende med en række forskellige naturligt forekommende kulstofkemikalier. Nedbrydningen af sådanne kemikalier passer derfor ikke ind i den model, der er beskrevet i tillæg 6. Der findes mange modeller, der kan anvendes, og der kan anvendes flere modeller samtidig under de betingelser, der gælder i spildevandsrensningssystemer. Der kræves betydeligt mere forskning at belyse dette problem.
2. I mellemtiden kan den fremgangsmåde, der er beskrevet i selve teksten (kapitel C.10 A), følges, men kun i forbindelse med primær biologisk nedbrydelighed, hvor der er tale om passende lave koncentrationer (< 100 µg/l) og en valideret analysemetode. Den procentvise biologiske nedbrydning kan beregnes (se afsnit 54 i testmetoden), når blot der tages højde for de abiotiske processer (adsorption, flygtighed osv.). Et eksempel er den undersøgelse, der blev gennemført af Nyholm m.fl. (1) (2), der benyttede en firetimers cyklus i et fill and draw-system. De rapporterede om pseudo-førsteordenskonstanter for fem kemikalier, der blev tilsat syntetisk spildevand i en mængde fra 5 til 100 µg/l. I forbindelse med ultimativ biologisk nedbrydelighed kan der anvendes ¹⁴C-mærkede testkemikalier. En beskrivelse af dette ligger uden for omfanget af denne testmetode, idet der endnu ikke er fastlagt alment accepterede fremgangsmåder, selv om et forslag til en metode for ISO 14592 (3) indeholder en vejledning om brugen af ¹⁴C-mærkede kemikalier.

SCAS-test

3. Senere blev en enkel totrinstest foreslået (4) (5) (6). Metoden med semikontinuerligt aktiveret slam (SCAS) benyttes i kortvarige kinetiske test på prøver, der er udtaget fra SCAS-enhederne. SCAS-systemet kører med kendte værdier for slamoverløb (i modsætning til den oprindelige C.12-testmetode) og tilføres modificeret syntetisk spildevand som defineret af OECD eller husholdningsspildevand. Det syntetiske spildevand blev modificeret (på grund af en ændret pH-værdi og slammets dårlige sedimentationsevne) ved at tilføre fosfat som buffer, gærekstrakt, jernklorid (III), sporstoffer og salte, og dets COD blev forøget til ca. 750 mg/l ved at forøge koncentrationen af pepton og kødekstrakt. Enhederne kørte i en 24-timers cyklus: beluftning i 23 timer, slamoverløb, sedimentering, eliminering af supernatant (udløb) efterfulgt af tilsætning af syntetisk spildevand plus testkemikalie, op til 100 µg/l (dvs. ved ca. samme koncentration som i den kortvarige test). En gang om ugen udskiftes 10 % af den samlede mængde slam med frisk slam for at opretholde en afbalanceret mikrobiel population.
4. Koncentrationerne af testkemikalien i starten og ved afslutningen af beluftningen måles, og testen fortsættes, indtil der opnås en konstant eliminering af testkemikalien. Det kan tage fra en uge til flere måneder.

Kortvarig test

5. En kortvarig test (f.eks. 8 timer) gennemføres for at bestemme den (pseudo) første ordens kinetiske hastighedskonstant for henfaldet af testkemikalien i aktiveret slam af kendte, men andre oprindelser og historikker. Der udtages slamprøver fra SCAS-reaktorerne — ved afslutningen af en beluftningsperiode, når koncentrationen af organisk substrat er lav — i løbet af et akklimatiseringsforsøg (afsnit 3 og 4). Med henblik på sammenligning kan slam også udtages fra en parallel SCAS-enhed, der ikke er eksponeret for testkemikalien. Blandinger af slam og testkemikalie, der tilsættes i to eller flere koncentrationer i området 1-50 µg/l, beluftes uden tilførsel af syntetisk spildevand eller andre organiske substrater. Den tilbageværende mængde testkemikalie i opløsningen bestemmes med regelmæssige intervaller, f.eks. hver time afhængigt af kemikaliet nedbrydning, i en periode på højst 24 timer. Prøverne centrifugeres inden relevant analyse.

Beregninger

6. Data fra SCAS-enhederne anvendes til beregning af den procentvise eliminering af testkemikalien (afsnit 54). En gennemsnitlig hastighedskonstant, K_1 , (normaliseret med hensyn til koncentration af suspenderede faststoffer) kan beregnes ved hjælp af:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

hvor:

t = beluftningstid (23 timer)

C_e = koncentration ved afslutning af beluftningsperiode (µg/l)

C_i = koncentration ved start af beluftning (µg/l)

SS = koncentration af faststof i aktiveret slam (g/l)

7. I den kortvarige test afsættes den tilbageværende log %-koncentration i forhold til tid, og hældningen af den første del (10-50 % nedbrydning) af kurven svarer til K_1 , (pseudo) første ordens konstant. Konstanten normaliseres med hensyn til koncentrationen af slamfaststoffer ved at dividere hældningen med koncentrationen af slamfaststoffer. Det rapporterede resultat skal også indeholde oplysninger om startkoncentrationer af testkemikalien og de suspenderede faststoffer, slamretentionstid, slamtilførsel og kilde samt oplysninger om (evt.) præeksposering for testkemikalien.

Resultaters variabilitet

8. Variabilitet og andre facetter ved bionedbrydningskinetik blev for nylig diskuteret i forbindelse med en SETAC-workshop (7). Disse forsøg — rapporterede og planlagte — vil give et klarere indblik i kinetikken i spildevandsrensingsanlæg og medvirke til at give en bedre forståelse af eksisterende data, ligesom de vil medvirke til mere relevante designs til fremtidige testmetoder.

LITTERATUR

- (1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A og Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. *Biodegradability. Wat. Res.* 26: 339-353.
- (2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O og Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res.* 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.
- (4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP og Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.
- (5) Berg UT og Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Miljøstyrelsen. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Miljø- og Energiministeriet, København.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop hos Port Sunlight, Det Forenede Kongerige. Eds. Hales, SG. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4.-6. sept. 1996. SETAC- Europe, Bruxelles.

C.10-B: Biofilm**INDLEDNING**

1. Simuleringstest anvendes normal i forbindelse med kemikalier, der ikke har bestået en screeningtest for let bionedbrydelighed (kapitel C.4 A-F i dette bilag (9)), men som har bestået en test for iboende bionedbrydelighed. I enkelte tilfælde anvendes simuleringstest ligeledes i forbindelse med et kemikalie, som man ønsker flere oplysninger om, især kemikalier, der forekommer i store mængder, og normalt anvendes testen af aktiveret slam (C.10 A). Under visse omstændigheder kræves der dog specifikke oplysninger om, hvordan et kemikalie reagerer over for forskellige metoder til spildevandsrensning, som f.eks. biofilm, nedsivnings- eller nedrislingsfiltre, roterende biologiske kontaktorer og fluide bede. Der er udviklet forskellige former for apparatur til dette formål.
2. Gerike et al. (1) benyttede store nedsivningsfiltre i pilotanlægsstørrelse i sammenkoblet tilstand. Disse filtre var meget pladskrævende og krævede relativt store mængder spildevand eller syntetisk spildevand. Truesdale et al. (2) har beskrevet mindre filtre (diameter: 6 fod × 6 tommer), hvortil der blev tilført overfladeaktivt naturligt spildevand, men disse filtre var stadig ret pladskrævende. Der krævedes hele 14 uger til at udvikle en »moden« biofilm, og der krævedes yderligere 4-8 uger efter den første tilsætning af det overfladeaktive teststof, inden akklimatiseringen fandt sted.
3. Baumann et al. (3) udviklede et meget mindre filter, hvori der blev anvendt »polyester-fleece«, som var dyppet i aktiveret slam som det inaktive medie til at støtte biofilmen. Testkemikalien blev anvendt som eneste kulstofkilde, og bionedbrydeligheden blev vurderet ud fra målinger af opløst organisk kulstof (DOC) i indløb og udløb og ud fra mængden af CO₂ i udgangsgassen.
4. En helt anden tilgang blev benyttet af Gloyna et al. (4), som opfandt den roterende røreaktor. På den indvendige overflade af det roterende rør dyrkes en biofilm på det kendte overfladeareal ved passage af indløb tilføjet i toppen af røret, der er skråtstillet i en lille vinkel i forhold til vandret. Reaktoren er blevet brugt dels til at undersøge den biologiske nedbrydelighed af overfladeaktive stoffer (5) og dels til at undersøge den optimale tykkelse af biofilm og diffusionen gennem filmen (6). Forfatterne har videreudviklet reaktoren og modificeret den, så man kan bestemme mængden af CO₂ i udgangsgassen.

5. Den roterende rørreaktor er anerkendt af den britiske »Standing Committee of Analysts« som en standardmetode til vurdering af både den biologiske nedbrydelighed af kemikalier (7) og muligheder for spildevandsrensning og toksicitet i spildevand (8). Fordelene ved den metode, der beskrives her, er, at den er enkel, kompakt og reproducerbar, og at den kun kræver relativt små mængder af organisk materiale.

TESTENS PRINCIP

6. Syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand sammen med testkemikalie, iblandet eller alene, tilføres den indvendige overflade af et langsomt roterende skråtstillet rør. På den indvendige overflade dannes et lag af mikroorganismer, der ligner dem, der findes på medier i biofiltre. Reaktorens driftsbetingelser vælges, så man opnår en passende eliminering af organisk stof og eventuelt oxidation af ammoniak.
7. Udløbet fra røret opsamles, hvorefter det enten sedimenteres og/eller filtreres for organisk opløst kulstof (DOC) og/eller for testkemikalie ved hjælp af en specifik metode, inden det analyseres. Kontrolenheder, der ikke får tilført testkemikalier, kører parallelt under samme forhold med henblik på sammenligning. Forskellen mellem koncentrationerne af DOC i udløbet fra test- og kontrolenhederne antages at skyldes testkemikaliet og stoffets organiske metabolitter. Denne forskel sammenlignes med koncentrationen af det tilsatte testkemikalie (som DOC) for at beregne elimineringen af testkemikaliet.
8. Biologisk nedbrydelighed kan normalt skelnes fra biologisk adsorption ved omhyggelig undersøgelse af kurven for elimineringstid. Der kan normalt opnås bekræftelse ved at gennemføre en test for let biologisk nedbrydelighed (iltoptagelse eller kuldioxidproduktion) ved hjælp af et akklimatiseret inokulum, der er udtaget ved afslutningen af testen fra de reaktorer, der får tilført testkemikaliet.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

9. Testkemikaliets renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionskarakteristik skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt.
10. Flygtige og tungtopløselige kemikalier kan ikke testes, medmindre der tages særlige forholdsregler (se tillæg 5 til kapitel C.10 A). Den kemiske struktur, eller i det mindste den empiriske formel, skal ligeledes være kendt, hvis man vil beregne de teoretiske værdier og/eller kontrollere parametrenes målte værdier, f.eks. teoretisk iltforbrug (ThOD), DOC.
11. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer (se tillæg 4 til kapitel C.10 A) kan anvendes i forbindelse med valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

TÆRSKELVÆRDIER

12. Den primære biologiske nedbrydning af de overfladeaktive stoffer skulle oprindeligt nå op på 80 % eller mere, inden kemikaliet kunne markedsføres. Hvis værdien 80 % ikke opnås, kan denne simuleringstest (kontroltest) anvendes, og det overfladeaktive stof kan markedsføres, hvis over 90 % af det specifikke kemikalie er elimineret. For kemikalier er der generelt ikke tale om at bestå/dumpe, og derfor kan den opnåede værdi for fjernelse benyttes i forbindelse med omtrentlige beregninger af den sandsynlige koncentration i miljøet, der kan bruges i vurderinger af risici fra kemikalier. I en række forsøg med rene kemikalier viste den procentvise eliminering af DOC sig at være over 90 % i mere end tre fjerdedele og over 80 % i mere end 90 % af de kemikalier, der viste sig at have en signifikant værdi for biologisk nedbrydelighed.

REFERENCEKEMIKALIER

13. For at sikre korrekt udførelse af forsøget kan det være nyttigt med jævne mellemrum at teste referencekemikalier, hvis adfærd er velkendt. Sådanne kemikalier omfatter adipinsyre, 2-phenylphenol, 1-naphthol, diphensyre og 1-naphthoesyre.

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

14. Den relative standardafgivelse mellem test blev af et laboratorium i Det Forenede Kongerige målt til at være 3,5 % og mellem testene 5 % (7).

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

Roterende rørreaktorer

15. Apparaturet (se figur 1 og 2 i tillæg 8) består af en samling akrylrør, der hver måler 30,5 cm i længden og har en indvendig diameter på 5 cm. Rørene er anbragt på gummihjul, der er monteret på en metalramme. Hvert rør har en udvendig flange, ca. 0,5 cm dyb, der skal fastholde det på hjulene. Den indvendige overflade er gjort ru ved hjælp af groft ståluld, og der er en 0,5 cm dyb indvendig flange i rørets øverste ende (indløb) til at holde på

væsken. Rørene er skråtstillede i en vinkel på ca. én grad i forhold til vandret for at opnå den nødvendige kontakttid, når testmediet ledes ind i et rent rør. Hjulene med gummidaek roteres ved hjælp af en langsom motor med variabel hastighed. Temperaturen i rørene styres ved at installere apparaturet i konstant rumtemperatur.

16. Ved at placere hvert enkelt rørreaktor inde i et lidt større lukket rør og gøre forbindelserne gastætte kan CO₂-udgangsgassen opsamles i en alkalisk opløsning til efterfølgende måling (6).
17. For hvert rør opbevares forsyning til 24 timer af et organisk materiale, evt. tilsat et testkemikalie, i en 20 l opbevaringsbeholder (A) (se figur 2). Opløsningen af testkemikalie kan evt. doseres separat. Tæt på bunden i hver opbevaringsbeholder er der en udgang, hvorfra der går et rørsystem af f.eks. silikonegummi via en slangepumpe (B) til et glas eller akrylrør, der går 2-4 cm ind i den øverste ende (tilløb) af det skrå rør (C). Udløb kan dryppe fra den nederste ende af det skrå rør og opsamles i en anden opbevaringsbeholder (D). Udløbet sedimenteres eller filtreres inden analyse.

Filtreringsapparat eller centrifuge

18. Apparatur til filtrering af prøver ved hjælp af membranfiltre med passende porøsitet (nominel åbningsdiameter 0,45 µm) til adsorption af organiske kemikalier med mindst mulig frigivelse af organisk kulstof. Hvis der benyttes filtre, som frigiver organisk kulstof, vaskes disse filtre omhyggeligt med varmt vand for at fjerne afgivet organisk kulstof. Alternativt kan der benyttes en centrifuge med en kapacitet på 40 000 m/s².
19. Analyseudstyr til bestemmelse af:

- DOC/samlet organisk kulstof (TOC) eller kemisk iltforbrug (COD)
- specifikt kemikalie (HPLC, GC osv.), hvis påkrævet
- pH, temperatur, syreindhold og alkalinitet
- ammoniak, nitrit og nitrat, hvis testene gennemføres under nitrificerende forhold.

Vand

20. Ledningsvand, der indeholder under 3 mg/l DOC.
21. Destilleret eller deioniseret vand, der indeholder under 2 mg/l DOC.

Organisk materiale

22. Syntetisk spildevand, husholdningsspildevand eller en blanding heraf kan anvendes som organisk materiale. Det er påvist, at anvendelsen af husholdningsspildevand alene ofte medfører øget eliminering af DOC i procent (i aktiveret slam) og endda bionedbrydning af visse kemikalier, som ikke nedbrydes biologisk, når der anvendes syntetisk spildevand som defineret af OECD. Derfor anbefales brugen af husholdningsspildevand. Mål koncentrationen af DOC (eller COD) i alle nye batches med organisk materiale. Det organiske materiales aciditet eller alkalinitet bør være kendt. Det organiske materiale skal muligvis tilsættes en velegnet buffer (natriumhydrogencarbonat eller kaliumhydrogenfosfat), hvis mediets aciditet eller alkalinitet er lav, for at holde en pH-værdi på ca. 7,5 ± 0,5 i reaktoren i løbet af testen. Mængden af buffer og tidspunktet for, hvornår den skal tilsættes, afgøres i hvert enkelt tilfælde.

Syntetisk spildevand

23. Opløs i én liter ledningsvand: pepton: 160 mg; kødekstrakt: 110 mg; urinstof: 30 mg; vandfrit dikaliumhydrogenfosfat (K₂HPO₄): 28 mg; natriumchlorid (NaCl): 7 mg; calciumchloriddihydrat (CaCl₂·2H₂O): 4 mg; magnesiumsulfatheptahydrat (Mg₂SO₄·7H₂O): 2 mg. Dette eksempel på syntetisk spildevand som defineret af OECD giver en middel DOC-koncentration i indløbet på ca. 100 mg/l. Der kan også benyttes andre sammensætninger med ca. den samme DOC-koncentration, og som ligger tættere på rigtigt spildevand. Dette syntetiske spildevand kan fremstilles ved hjælp af destilleret vand i koncentreret form og opbevares ved ca. 1 °C i op til én uge. Fortynd efter behov med ledningsvand. (Dette materiale er ikke tilfredsstillende. Kvælstofkoncentrationen er f.eks. meget høj, og kulstofindholdet relativt lavt, men der er ikke foreslået en bedre løsning, bortset fra tilførsel af mere fosfat som buffer og ekstra pepton).

Husholdningsspildevand

24. Benyt frisk bundfældet spildevand, der indsamles dagligt fra et rensningsanlæg, der hovedsageligt modtager husholdningsspildevand. Det indsamles fra overløbskanalen på den primære sedimenteringstank eller fra indløbet til aktivslamanlægget, og det skal stort set være uden grove partikler. Spildevandet kan benyttes efter flere dages opbevaring ved ca. 4 °C, hvis det dokumenteres, at DOC (eller COD) ikke falder væsentligt (dvs. med mindre end 20 %) under opbevaringen. For at begrænse forstyrrelserne af systemet bør DOC (eller COD) af hver ny batch justeres inden brug, så der opnås en passende konstant værdi, f.eks. ved fortynding med ledningsvand.

Smøremiddel

25. Glycerol eller olivenolie kan bruges til smøring af rullerne i slangepumpen. Begge smøremidler kan bruges på rør af silikonegummi.

Stamopløsninger af testkemikaliet

26. I forbindelse med kemikalier, der er tilstrækkelig opløselige, fremstilles stamopløsninger i passende koncentrationer (f.eks. 1-5 g/l) i demineraliseret vand eller i den mineralske del af det syntetiske spildevand. Se tillæg 5 i kapitel C.10-A om uopløselige kemikalier. Denne metode er ikke velegnet til flygtige kemikalier uden at være modificeret til de rørformede reaktorer (afsnit 16). Bestem DOC og samlet organisk kulstof (TOC) i stamopløsningen, og gentag målingerne for hver ny batch. Hvis forskellen mellem DOC og TOC er større end 20 %, skal testkemikaliets vandopløselighed kontrolleres. Sammenlign DOC eller koncentrationen af testkemikaliet målt ved hjælp af specifik analyse af stamopløsningen med den nominelle værdi for at fastslå, hvorvidt genfindingen er god nok (normalt kan > 90 % forventes). Især for dispersioner skal det fastslås, hvorvidt DOC kan benyttes som analytisk parameter, eller om der kun kan anvendes en analyseteknik, der er specifik for det pågældende testkemikalie. Centrifugering af prøverne er obligatorisk i forbindelse med dispersioner. For hver ny batch skal DOC, COD eller testkemikaliet måles med specifikke analyser.
27. Bestem pH-værdien i stamopløsningen. Ekstreme værdier viser, at tilsætningen af kemikaliet kan påvirke pH-værdien af det aktiverede slam i testsystemet. I det tilfælde neutraliseres stamopløsningen med små mængder af uorganisk syre eller base for at opnå en pH-værdi på $7 \pm 0,5$. Undgå dog udfældning af testkemikaliet.

*FREMGANGSMÅDE**Tilberedning af organisk materiale til dosering*

28. Sørg for, at beholdere til indløb og udløb samt rørsystem fra indløbstanke og til udløbstanke er omhyggeligt rengjorte for at fjerne mikrobiel vækst fra starten og i løbet af testen.
29. Det syntetiske spildevand (afsnit 23) skal fremstilles frisk hver dag, enten af faststofferne eller af den koncentrerede stamopløsning i en passende fortynding med ledningsvand. Afmål den korrekte mængde i en cylinder, og hæld det i en ren indløbstank. Tilsæt om nødvendigt den nødvendige mængde stamopløsning af testkemikaliet eller referencekemikaliet til det syntetiske spildevand før fortynding. Hvis det er mere praktisk eller nødvendigt for at undgå spild af testkemikaliet, kan der fremstilles en separat fortyndet opløsning af testkemikaliet i en separat beholder, som tilføres de skråstillede rør ved hjælp af en anden doseringspumpe.
30. Alternativt (og fortrinsvis) kan der benyttes sedimenteret husholdningsspildevand (afsnit 24), der opsamles frisk hver dag, hvis det er muligt.

Brug af roterende rørreaktorer

31. Der kræves to identiske rørreaktorer til vurdering af ét testkemikalie, og de opstilles i et rum med konstant rumtemperatur, normalt 22 ± 2 °C.
32. Juster slangepumperne til at pumpe 250 ± 25 ml/h af det organiske materiale (uden testkemikalie) over i de skråstillede rør, der roteres ved 18 ± 2 rpm. Smøremidlet (afsnit 25) smøres på pumperørene inden brug og med jævne mellemrum i løbet af testen for at sikre korrekt funktion og for at forlænge rørenes levetid.
33. Juster rørenes hældningsvinkel til vandret for at give mulighed for en residentid på $125 \pm 12,5$ sek. for det tilførte materiale i et rent rør. Anslå retentionstiden ved at tilsætte en ikke-biologisk markør (f.eks. NaCl, inaktivt farvestof). Den tid, det tager at nå spidskoncentrationen i udløbet, antages at være den gennemsnitlige retentionstid (når der er mest muligt film til stede, kan retentionstiden nå op på ca. 30 minutter).
34. Formålet med disse værdier, hastigheder og tider er at nå frem til tilstrækkelig eliminering (> 80 %) af DOC (eller COD) og for at kunne opnå nitrificerede udløb. Gennemstrømningshastigheden ændres, hvis elimineringen ikke er tilstrækkelig, eller hvis der ydelsen på et bestemt rensningsanlæg skal simuleres. I sidstnævnte tilfælde justeres tilsætningen af det organiske materiale, indtil ydelsen i reaktoren passer til ydelsen i rensningsanlægget.

Inokulation

35. Luftbåren inokulation kan være tilstrækkelig til at starte væksten af mikroorganismer, når der benyttes syntetisk spildevand, men ellers tilsættes 1 ml/l sedimenteret spildevand til tilløbet i tre dage.

Målinger

36. Med regelmæssige mellemrum kontrolleres det, at dosering og rotationshastighed ligger inden for de angivne grænser. Ligeledes måles pH-værdien i udløbet, især hvis der forventes nitrifikation.

Prøvetagning og analyse

37. Metode, mønster og frekvens for prøvetagning vælges i overensstemmelse med testens formål. Tag f.eks. stikprøver af indløb og udløb, eller indsamle prøver over en længere periode f.eks. 3-6 timer. I den første periode — uden testkemikalie — tages prøverne to gange om ugen. Filtrer prøverne gennem membraner eller i centrifuge ved ca. 40 000 m/s² i ca. 15 minutter (afsnit 18). Det kan være nødvendigt at lade prøverne bundfældes og/eller at grovfiltrere prøverne inden membranfiltrering. Foretag som minimum dobbeltbestemmelse af DOC (eller COD) samt BOD, ammoniak og nitrit/nitrat, hvis det er påkrævet.
38. Alle analyser udføres hurtigst muligt efter indsamling og tilberedning af prøverne. Hvis analyserne forsinkes, opbevares prøverne mørkt ved ca. 4 °C i flasker med tætsluttende låg. Hvis prøverne skal opbevares i mere end 48 timer, skal de konserveres ved hjælp af dybfrysning, syring eller ved tilsætning af et velegnet toksisk kemikalie (f.eks. 20 ml/l af en 10 g/l opløsning af kviksølv (II) chlorid). Det sikres, at konserveringsteknikken ikke påvirker analyseresultaterne.

Indkøringsperiode

39. I denne periode vokser overfladen på biofilmen, så den opnår en optimal tykkelse. Dette varer normalt ca. to uger og bør ikke vare længere end seks uger. Elimineringen (afsnit 44) af DOC (eller COD) tiltager og når en plateauværdi. Når plateauet er nået med samme værdi i begge rør, udvælges et af dem til at være kontrol for resten af testen, hvor deres ydelse skal forblive konsistent.

Tilsætning af testkemikalie

40. På dette tidspunkt tilsættes testkemikaliets til den anden reaktor i den korrekte koncentration, normalt 10-20 mg C/l. Kontrollen tilføres fortsat kun organisk materiale.

Akklimatiseringsperiode

41. Foretag fortsat analyser for DOC (eller COD) to gange om ugen. Hvis den primære biologiske nedbrydningsevne skal vurderes, måles koncentrationen af testkemikaliets også ved hjælp af en specifik analyse. Lad der gå fra en til seks uger (eller længere under særlige forhold), efter at testkemikaliets første gang blev tilsat, for at opnå akklimatisering. Når den procentvise eliminering (afsnit 43-45) når op på maksimumsværdi, registreres 12-15 gyldige værdier i plateaufasen over ca. 3 uger med henblik på at evaluere den gennemsnitlige procentvise eliminering. Testen betragtes for afsluttet, hvis der er opnået en tilstrækkelig høj grad af eliminering. Testen bør normalt ikke vare mere end 12 uger efter den første tilsætning af testkemikaliets.

Skred på filmen

42. Der sker med relativt regelmæssige mellemrum en pludselig eliminering af større mængder af overskydende film fra rørene, også kaldet skred. For at sammenligneligheden mellem resultaterne ikke påvirkes, gennemføres testene over mindst to fulde cyklusser med vækst og skred.

DATA OG RAPPORTERING**Behandling af resultater**

43. Beregn procentdelen af DOC- eller COD-eliminering af testkemikaliets for hver tidsbaseret vurdering ved hjælp af ligningen:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

hvor:

D_t = procentvis eliminering af DOC eller COD på tidspunktet t

C_s = koncentration af DOC eller COD i indløb, der skyldes testkemikaliets, fortrinsvis anslået ud fra koncentrationen og den tilførte mængde i stamopløsningen (mg/l)

E = målt DOC eller COD i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

E_o = målt DOC eller COD i kontroludløb på tidspunktet t (mg/l).

Gentag beregningen for referencekemikaliet, hvis det testes.

Kontrolreaktorens ydelse

44. Graden af DOC- eller COD-eliminering (D_B) af det organiske materiale i kontrolreaktoren er nyttig viden i forbindelse med vurderingen af den biologiske nedbrydning af biofilmen i løbet af testen. Beregn den procentvise eliminering ved hjælp af ligningen:

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m) \%$$

hvor:

C_m = DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolindløb (mg/l).

45. Beregn elimineringen (D_{ST}) af testkemikaliet (hvis den måles) målt ved hjælp af en specifik analysemetode på hvert vurderingstidspunkt ved hjælp af ligningen:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

hvor:

S_i = målt eller fortrinsvis estimeret koncentration af testkemikalie i testindløb (mg/l)

S_e = målt koncentration af testkemikalie i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

Hvis analysemetoden giver en positiv værdi i uændret spildevand svarende til S_c mg/l, beregnes den procentvise eliminering (D_{SC}) ved hjælp af ligningen:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

Angivelse af testresultater

46. Indtegn den procentvise eliminering D_t og D_{ST} (eller D_{SC}) i forhold til tiden (se tillæg 2 til kapitel C.10- A). Aflæs gennemsnitsafvigelsen (afrundet til nærmeste heltal) og standardafvigelsen af 12-15 værdier for D_t (og evt. for D_{ST}) fra plateaufasen som den procentvise eliminering af testkemikaliet. Ud fra formen på elimineringskurven kan der drages en række konklusioner om elimineringsprocesserne.

Adsorption

47. Hvis der konstateres en høj DOC-eliminering af testkemikaliet fra begyndelsen af testen, elimineres testkemikaliet sandsynligvis ved adsorption til biofilmen. Dette kan bevises ved at bestemme det adsorberede testkemikalie i faststoffer, der er skredet af filmen. Sædvanligvis forbliver elimineringen af DOC af adsorberbare kemikalier ikke høj i løbet af hele testen. Normalt sker der en høj grad af eliminering i starten, hvorefter den falder til en ligevægtsværdi. Hvis det adsorberbare testkemikalie kan forårsage akklimatisering af den mikrobielle population, vil DOC-elimineringen af testkemikaliet efterfølgende stige og nå op på en høj plateauværdi.

Lag-fase

48. Som ved statiske screeningstest kræver mange testkemikalier en lag-fase, inden der sker fuld bionedbrydning. I lag-fasen sker der en akklimatisering eller tilpasning af de kompetente bakterier næsten uden eliminering af testkemikaliet, og derefter begynder disse bakteriers indledningsvise vækst. Denne fase afsluttes, og nedbrydningsfasen antages vilkårligt at begynde, når ca. 10 % af den oprindelige mængde testkemikalie er elimineret (efter mulighed for eventuel adsorption). Lag-fasen er ofte stærkt varierende og vanskelig at reproducere.

Plateaufase

49. En elimineringskurves plateaufase i en kontinuerlig test defineres som den fase, hvor den maksimale nedbrydning finder sted. Denne fase bør være mindst tre uger og have ca. 12-15 målte gyldige værdier.

Middelelimineringsgrad for testkemikaliet

50. Beregn middelværdien ud fra elimineringsværdierne D_t (og evt. D_{90}) for testkemikaliet i plateaufasen. Afrundet til nærmeste heltal (1 %) angiver det graden af eliminering af testkemikaliet. Det anbefales endvidere at beregne 95 %-konfidensintervallet af middelværdien. På tilsvarende måde beregnes middelværdien (D_B) for eliminering af det organiske materiale i kontrolbeholderen.

Indikation for bionedbrydning

51. Hvis testkemikaliet ikke tydeligt adsorberer til biofilmen, og elimineringskurven har en typisk form for en bionedbrydningskurve med lag-, nedbrydnings- og plateaufaser (afsnit 48 og 49), kan den målte eliminering med sikkerhed tilskrives bionedbrydning. Hvis der er sket en høj eliminering i starten, kan simuleringstesten ikke differentiere mellem biologiske og abiotiske elimineringsprocesser. I sådanne tilfælde, og hvis der i øvrigt er tvivl om den biologiske nedbrydning (f.eks. hvis der optræder stripping), skal de adsorberede testkemikalier analyseres i filmprøver, eller yderligere statistiske test af bionedbrydning gennemføres baseret på parametre, der klart indikerer biologiske processer. Sådanne test omfatter metoder til oxygenoptagelse (kapitel C.4 i dette bilag D, E og F) (9) eller en test, der måler CO_2 -produktion (kapitel C.4-C i dette bilag eller Headspace-metoden) (10). Som inokulum anvendes præeksponeret biofilm fra den relevante reaktor.
52. Hvis både DOC-elimineringen og den specifikke eliminering af kemikaliet er målt, indikerer signifikante forskelle (hvis førstnævnte er lavere end sidstnævnte) mellem de eliminerede procentdele, at der i udløbet forekommer mellemliggende organiske produkter, som kan være sværere at nedbryde end det oprindelige kemikalie.

Testresultaternes validitet

53. Testen anses for at være gyldig, hvis graden af DOC- eller COD-eliminering (D_B) i kontrolenhederne er $> 80 \%$ efter to uger, og der ikke er gjort unormale observationer.
54. Hvis der er testet et let biologisk nedbrydeligt (reference) kemikalie, bør graden af biologisk nedbrydelighed være $> 90 \%$, og forskellen mellem dobbeltværdier bør ikke overstige 5 %. Hvis disse to kriterier ikke opfyldes, gennemgås forsøgsprocedurerne, og/eller husholdningsspildevand indhentes fra en anden kilde.
55. Tilsvarende bør forskellene mellem værdier for biologisk nedbrydelighed fra eventuelle dobbeltenheder, der behandler et testkemikalie, ikke afvige mere end 5 %. Hvis dette kriterium ikke opfyldes, men eliminering er høj, fortsættes analysen i yderligere tre uger. Hvis elimineringen er lav, undersøges de hæmmende effekter på testkemikaliet, hvis de ikke er kendte. Testen gentages med en lavere koncentration af testkemikalie, hvis det er muligt.

Testrapport

56. Testrapporten skal indeholde følgende:

Testkemikalie:

- identifikationsdata
- fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber.

Testbetingelser:

- enhver modifikation af testsystemet, især hvis der testes uopløselige eller flygtige stoffer
- typen af organisk materiale
- art og andel af industriaffald i spildevandet (hvis anvendt og kendt)
- inokulationsmetode
- stamopløsning af testkemikalie — indhold af DOC (opløst organisk kulstof) og TOC (samlet organisk kulstof); hvordan blev den fremstillet (hvis suspension); anvendte testkoncentration(er), hvis uden for intervallet 10-20 mg/l DOC, angives årsager; tilsætningsmetode; dato for første tilsætning; enhver ændring i koncentrationen

- gennemsnitlig hydraulisk retentionstid (uden vækst), rørets rotationshastighed, omtrentlig vinkel på hældning, hvis muligt
- oplysninger om skred (tid og intensitet)
- testtemperatur og -interval
- anvendte analyseteknikker.

Testresultater:

- alle målte, relevante data (DOC, COD, specifikke analyser, pH-værdi, temperatur og N-kemikalier)
- alle beregnede værdier af D_t (eller D_{tC}), D_B og D_s opstillet i tabelform og elimineringskurver
- oplysninger om lag- og plateaufaser, testvarighed, elimineringsgraden af testkemikaliet, referencekemikaliet (hvis testet) og det organiske materiale i kontrolenheden, statistiske oplysninger og udtryk for biologisk nedbrydelighed og testens validitet
- diskussion af resultater.

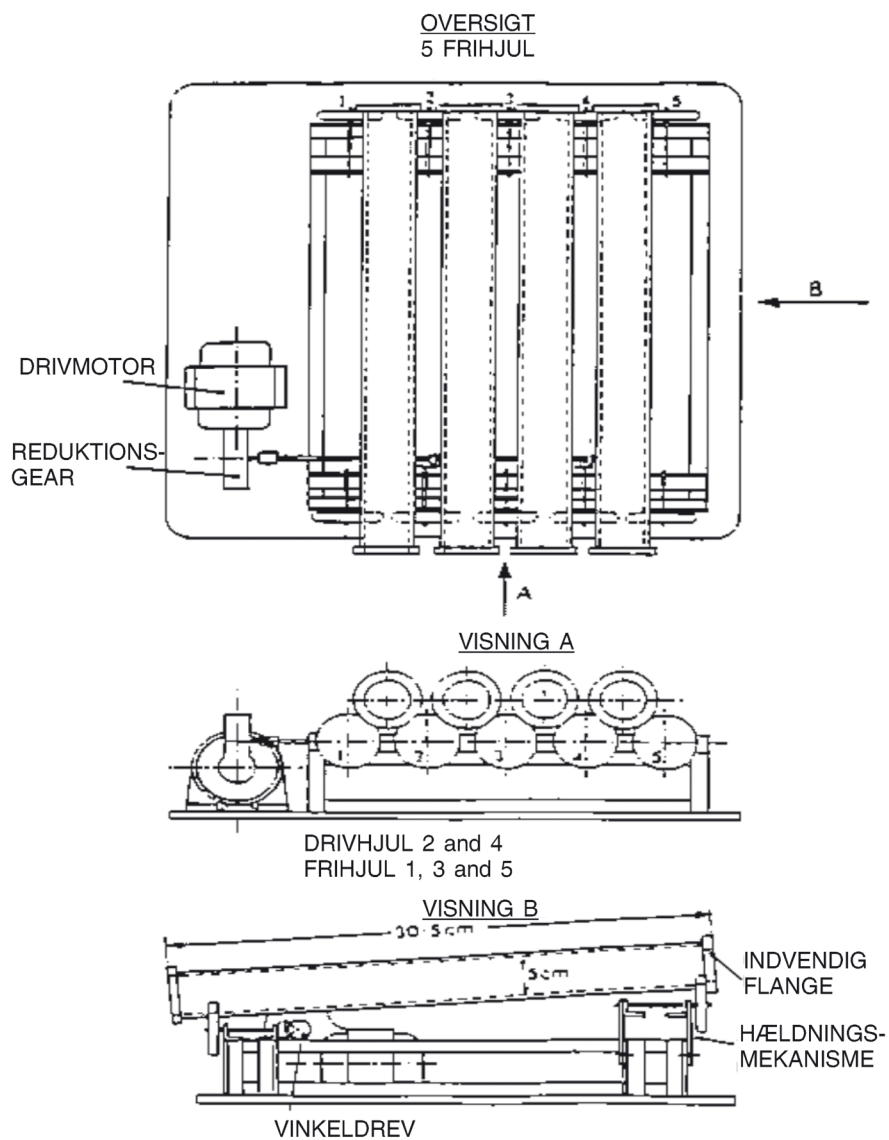
LITTERATUR:

- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
 - (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.
 - (3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
 - (4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
 - (5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92-94.
 - (6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.
 - (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
 - (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
 - (9) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed A-F.
 - (10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.
-

Tillæg 8

Figur 1

Roterende rør



Ordliste:

Oversigt

Visning A/B

Drivhjul

Frihjul

Drivmotor

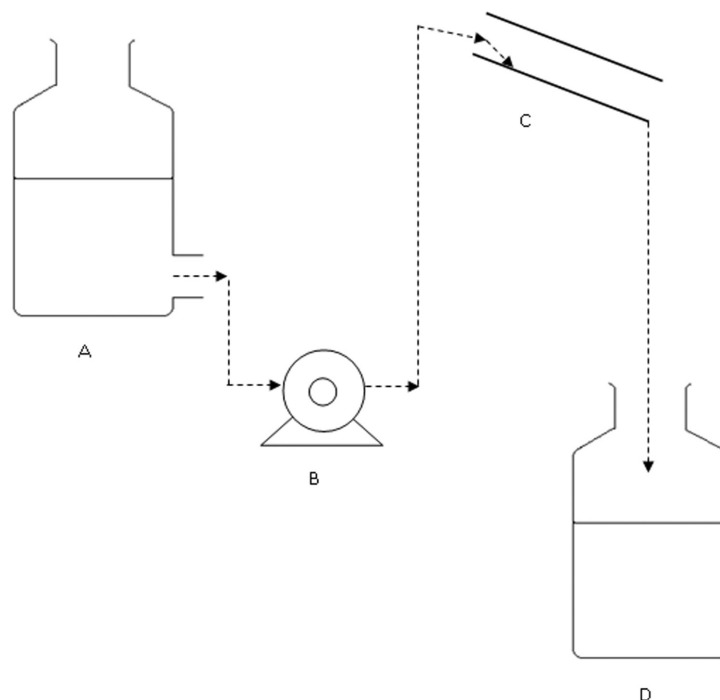
Reduktionsgear

Indvendig flange

Hældningsmekanisme

Vinkeldrev

Figur 2
Strømningsdiagram



A: Tilsætningstank

B: Slangepumpe

C: Roterende rør

D: Opsamlingsbeholder til udløb

DEFINITIONER

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Kemikalier: »Det bør bemærkes, at termen »kemikalie« er brugt i bred forstand i UNCED-aftalerne og de efterfølgende dokumenter og omfatter stoffer, produkter, blandinger, præparater eller alle andre termer, der anvendes i eksisterende systemer til at angive dækning«.

10) Følgende tilføjes som kapitel C.27, C.28, C.29 og C.30:

»C.27. TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 218 (2004). Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på larver af ferskvandsdipteraen *Chironomus* sp., der lever i sediment, af forlænget eksponering for kemikalier. Den er baseret på de eksisterende toksicitetstestprotokoller for *Chironomus riparius* og *Chironomus tentans*, der er blevet udviklet i Europa (1) (2) (3) og Nordamerika (4) (5) (6) (7) (8) og ringtestet (1) (6) (9). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af sediment med teststoffet. Valget af det mest velegnede eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Scenariet med sedimentspiking har til formål at simulere akkumulerede niveauer af kemikalier i sedimentet. Dette eksponeringssystem omfatter spiking af sediment i et sediment/vand-testsystem.
3. Stoffer, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad forskellige veje. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af de fysisk-kemiske egenskaber af det pågældende kemikalie. Ved stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med $\log K_{ow} > 5$) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en

væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile stoffer kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af teststoffet. For at tage alle potentielle eksponeringsveje i betragtning fokuserer denne testmetode på langtidseksponering. Testens varighed er 20-28 dage for *C. riparius* og *C. yoshimatsui* og 28-65 dage for *C. tentans*. Hvis der kræves korttidsdata til særlige formål, f.eks. for at undersøge virkningerne af et ustabil kemikalie, kan yderligere replikater fjernes efter en periode på 10 dage.

4. De målte effektparametre er det samlede antal voksne, der har udviklet sig, og tiden, der er gået med udvikling. Det anbefales, at målinger af larvers overlevelse og vækst kun udføres efter en periode på 10 dage, hvis der kræves yderligere korttidsdata, ved hjælp af eventuelle yderligere replikater.
5. Det anbefales at anvende formuleret sediment. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:
 - udsvingene i forsøgene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikke-kontaminerede og rene sedimentkilder
 - testene kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna; brugen af formuleret sediment reducerer også omkostningerne i forbindelse med opsamling af tilstrækkelige mængder sediment i felten til rutinetest
 - anvendelsen af formuleret sediment gør det muligt at sammenligne toksicitet og rangordne stoffer i overensstemmelse hermed.
6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

TESTENS PRINCIP

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af testkemikaliets i sediment/vand-systemer. Teststoffet tilsættes sedimentet, og æglarverne overføres derefter til bægerglas, hvor sediment- og vandkoncentrationerne er blevet stabiliseret. Emergens- og udviklingstiden for chironomider måles ved afslutningen af testen. Larvernes overlevelse og vægt kan om nødvendigt også måles efter 10 dage (ved brug af yderligere replikater). Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at anslå den koncentration, der vil forårsage en reduktion på % i emergens, larveoverlevelse eller larvewækst (f.eks. EC_{15} , EC_{50} osv.), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme en NOEC/LOEC. Sidstnævnte kræver sammenligning af effektværdier med kontrolværdier ved hjælp af statistiske test.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

8. Teststoffets vandopløselighed, damptryk, målt eller beregnet, fordeling i sediment samt stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantificering af teststoffet i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter teststoffets strukturformel og renhed. Teststoffets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttige oplysninger. For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (12).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at testprotokollen og -betingelserne er pålidelige. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTENS VALIDITET

10. Testens validitet forudsætter følgende:
 - emergensen i kontrolbeholderne skal være mindst 70 % ved testens afslutning (1) (6)
 - emergensen af *C. riparius* og *C. yoshimatsui* til voksne fra kontrolglassene skal ske mellem 12 og 23 dage efter deres overførsel til testglassene; for *C. tentans* kræves der en periode på 20-65 dage

- ved testens afslutning måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hvert bægerglas. Koncentrationen af opløst ilt skal være mindst 60 % af værdien for mætning med luft (ASV) ved den anvendte temperatur, og pH i det overliggende vand skal være i intervallet 6-9 i alle bægerglas
- vandtemperaturen må højst variere med $\pm 1,0$ °C. Vandtemperatur kan styres ved at anvende et isotermisk rum, og i det tilfælde bekræftes rumtemperaturen med passende tidsintervaller.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testglas

11. Forsøget udføres i 600 ml bægerglas med en diameter på 8 cm. Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sedimentoverfladen skal være tilstrækkelig (2 til 3 cm² pr. larve). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Testglas og andet udstyr, der kommer i berøring med testsystemet, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. Teflon).

Valg af fiskeart

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan også anvendes, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. *Chironomus yohimatsui* kan også anvendes. Detaljer om dyrkningsmetoder findes i tillæg 2 vedrørende *Chironomus riparius*. Oplysninger om dyrkningsbetingelser findes også for andre arter, dvs. *Chironomus tentans* (4) og *Chironomus yohimatsui* (11). Identifikation af arten skal bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismer kommer fra en intern bestand.

Sediment

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomiderne. Inden naturligt sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på den syntetiske jord, der anvendes i testmetode C.8 (14), i denne test (1) (15) (16):

- a) 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret
- b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit
- c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μ m)
- d) deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %
- e) kemisk rent calciumcarbonat (CaCO₃) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på $7,0 \pm 0,5$. Det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % ($\pm 0,5$ %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litera a) og c).

14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske fosforforbindelser osv.). Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

Vand

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens

begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som CaCO_3 . Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand skal anvendes i hele forsøget. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

Stamopløsninger — forurenede sediment

16. Forurenede sediment af den valgte koncentration fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af teststoffet tilsættes sedimentet direkte. En stamopløsning af teststoffet opløst i deioniseret vand blandes med det formulerede sediment ved brug af valsning, en foderblander eller manuel blanding. Hvis teststoffet er tungtopløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform). Denne opløsning blandes derefter med 10 g fint kvartssand til et testglas. Vent, indtil opløsningsmidlet er fordampet, og fjern det helt fra sandet. Derefter blandes sandet med den passende mængde sediment pr. testglas. Kun midler, der let fordamper, kan bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Det sand, der findes i teststoffet og sandblandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sediment skal således fremstilles med mindre sand). Det skal sikres, at det teststof, der tilsættes sediment, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Om nødvendigt kan delprøver analyseres for at bestemme homogeniteten.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau samt antal larver pr. testglas. Design til beregning af EC-punkter, beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest beskrives.

Design til regressionsanalyse

18. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{15} , EC_{50}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliet virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer (EC_x) vil være mest nøjagtig og gyldig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. Ekstrapolering langt under den laveste positive koncentration eller over den højeste koncentration bør undgås. En præliminær test til bestemmelse af koncentrationsområdet kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende (se afsnit 27).
19. Hvis EC_x skal bestemmes, skal der testes mindst fem koncentrationer og tre replikater for hver koncentration. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosiskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen. Der kræves yderligere replikater, hvis larveoverlevelse og -vækst skal anslås for en periode på 10 dage.

Design til beregning af NOEC/LOEC

20. Hvis LOEC eller NOEC skal beregnes, anvendes fem testkoncentrationer med mindst fire replikater, og faktoren mellem koncentrationerne bør højst være to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % ($p = 0,05$). I forbindelse med udviklingshastigheden er en ANOVA-analyse normalt velegnet, f.eks. Dunnett-testen eller Williams-testen (17) (18) (19) (20). I forbindelse med emergensforholdet kan Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen anvendes.

Grænsetest

21. En grænsetest kan udføres (med en testkoncentration og kontrol), hvis der ikke blev observeret virkninger i den præliminære test til bestemmelse af koncentrationsområdet. Formålet med grænsetesten er at udføre en test ved en koncentration, der er høj nok til, at beslutningstagere kan udelukke mulige toksiske virkninger af teststoffet, og grænsen fastsættes til en koncentration, der ikke forventes at forekomme under nogen omstændigheder. 1 000 mg/kg (tør vægt) anbefales. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgruppen. Statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % ($p = 0,05$) skal påvises. Med hensyn til metrisk respons (udviklingshastighed og vægt) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). T-testen justeret for forskel i varians eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whitney-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE

Eksponeringsbetingelser*Klargøring af forurenede sediment/vand-system*

22. Den spiking-metode, der er beskrevet i testmetode C.8, Toksicitet for regnorme, anbefales til tilsætning af teststoffet (14). De »spikede« (forurenede) sedimenter anbringes i bægerglas, og overliggende vand tilsættes for at frembringe et volumenforhold mellem sediment og vand på 1:4 (se afsnit 11 og 15). Sedimentlaget skal have en dybde på 1,5-3 cm. For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen, kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.
23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). I løbet af forsøget påfyldes der yderligere vand for at bevare det oprindelige volumen og kompensere for vandfordampning. Dette vand skal være destilleret eller deioniseret vand for at forhindre opbygning af salte.

Stabilisering

24. Når det forurenede sediment med overliggende vand er blevet fremstillet, afventes det, at teststoffet fordeler sig fra den vandige fase til sedimentet (3) (4) (6) (13). Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og kemikalie og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde flere uger (4-5 uger). Da mange kemikalier i dette tidsrum ville blive nedbrudt, afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer anbefales. Efter denne yderligere ækvilibreringstid måles koncentrationen af teststoffet i det overliggende vand, porevandet og sedimentet, som minimum ved den højeste koncentration og en lavere (se afsnit 38). Disse analyser af teststoffet gør det muligt at beregne massebalance og angive resultater baseret på målte koncentrationer.

Tilsætning af testorganismer

25. Fire til fem dage inden tilsætningen af testorganismer til testglassene udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Hvis sidstnævnte anvendes, tilsættes dyrkningsmediet en lille mængde foder, f.eks. grønalger og/eller et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for *Chironomus riparius* ved 20 °C og 1-4 dage for *Chironomus tentans* ved 23 °C og *Chironomus yoshimatsu* ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Larver i første stadium (2-3 eller 1-4 dage efter udklækning) bør anvendes i testen. Larver af dansemyg kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (6).
26. 20 æglarver fordeles vilkårligt til hvert testglas med forurenede sediment og vand ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet skal standses, mens larverne overføres til testglassene, og den skal være standset i endnu 24 timer efter tilsætningen af larver (se afsnit 25 og 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se afsnit 19 og 20) anvendes der mindst 60 larver pr. koncentration i forbindelse med bestemmelse af EC-punkter og 80 til bestemmelse af NOEC.

Testkoncentrationer

27. En test til bestemmelse af koncentrationsområde kan være nyttig, når koncentrationsområdet skal vælges til den endelige test. Til det formål anvendes en række spredte koncentrationer af teststoffet. For at opnå den overfladedensitet pr. chironomide, der anvendes i den endelige test, eksponeres chironomider for hver koncentration af teststoffet i en periode, der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer, og der kræves ingen replikater.
28. Testkoncentrationerne i den endelige test fastlægges ud fra testen til bestemmelse af koncentrationsområde. Mindst fem koncentrationer anvendes og vælges som beskrevet i afsnit 18-20.

Kontroller

29. Kontrolglas uden teststof, men med sediment, inkluderes i testen med et hensigtsmæssigt antal replikater (se afsnit 19-20). Hvis der er anvendt et opløsningsmiddel til tilsætning af teststoffet (se afsnit 16), anvendes også en opløsningsmiddelkontrol.

Testsystem

30. Der anvendes statiske systemer. Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med intermitterende eller kontinuerlig udskiftning af overliggende vand kan undtagelsesvis bruges, hvis specifikationerne for vandkvalitet bliver uhensigtsmæssige for testorganismen eller påvirker den kemiske ligevægt (hvis f.eks. koncentrationen af opløst ilt bliver for lav, koncentrationen af ekskretionsprodukter bliver for høj, eller mineraler udvaskes fra sedimentet og påvirker pH og/eller vandets hårdhed). Andre metoder til forbedring af det overliggende vands kvalitet, f.eks. beluftning, er normalt tilstrækkelige og bør foretrækkes.

Foder

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for *C. yoshimatu*) pr. larve pr. dag er tilstrækkelig til unge larver i de første 10 dage. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen skal reduceres i alle behandlingsprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis mortalitet observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen. Ved test af stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med $\log K_{ow} > 5$) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre organismernes overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden. Til det formål anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tør vægt) fintmalede blade af brændenælde (*Urtica dioica*), morbærtræ (*Morus alba*), hvidkløver (*Trifolium repens*) eller spinat (*Spinacia oleracea*). Andet plantemateriale (Cerophyl eller alfa-cellulose) kan også anvendes.

Inkubationsbetingelser

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages helst 24 timer efter tilsætningen af larver og foretages gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-glaspipette, der er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget (dvs. en eller få bobler pr. sekund). Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet.
33. Testen udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For *C. tentans* og *C. yoshimatu* anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten skal være 500-1 000 lux.

Eksponeringsvarighed

34. Eksponeringen begynder, når larver tilsættes de forurenede bægerglas og kontrolglassene. Den maksimale eksponeringsvarighed er 28 dage for *C. riparius* og *C. yoshimatu* og 65 dage for *C. tentans*. Hvis dansemys udvikles tidligere, kan testen afsluttes, når der er gået mindst fem dage efter emergensen af den sidste voksne i kontrolglasset.

Observationer

Emergens

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider bestemmes. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.
36. Testglassene observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere abnorm opførsel (hvis individer f.eks. forlader sediment eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af perioden for forventet emergens foretages en daglig tælling af de udviklede individer. Kønnen og antallet af fuldt udviklede individer registreres dagligt. Efter identifikation fjernes individerne fra bægerglassene. Ægmasse, der er afsat før afslutningen af testen, registreres og fjernes derefter for at forhindre gentaget tilførsel af larver til sedimentet. Antallet af synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Vejledning i måling af emergens findes i tillæg 5.

Vækst og overlevelse

37. Hvis der skal fremlægges data om larveoverlevelse og -vækst efter 10 dage, skal yderligere testglas medtages fra begyndelsen, så de kan anvendes efterfølgende. Sedimentet fra disse yderligere glas sigtes gennem en 250 µm sigte for at tilbageholde larverne. Kriterier for død er immobilitet eller manglende reaktion på mekaniske stimuli. Larver, der ikke genfindes, registreres også som døde (larver, der er døde ved begyndelsen af testen, kan være blevet nedbrudt af mikrober). Tør vægten (askefri) af de overlevende larver pr. testglas bestemmes, og den individuelle gennemsnitlige tør vægt pr. glas beregnes. Det er nyttigt at bestemme det stadium, som de overlevende larver befinder sig på. Til det formål anvendes en måling af bredden på hvert individs hovedkapsel.

Analysemålinger

Teststofkoncentration

38. Inden testen påbegyndes (dvs. inden larver tilsættes), udtages prøver af bulksediment fra mindst ét glas pr. behandling til analytisk bestemmelse af teststofkoncentrationen i sedimentet. Det anbefales, at prøver af som minimum det overliggende vand, porevandet og sedimentet analyseres ved begyndelsen (se afsnit 24) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Disse bestemmelser af teststofkoncentrationen giver oplysninger om teststoffets opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet.
39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.
40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt vand. Hvis det påvises, at teststoffet ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.

Fysisk-kemiske parametre

41. Testglassenes pH og temperatur måles på en hensigtsmæssig måde (se afsnit 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og et testglas ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Formålet med denne test er at bestemme virkningen af teststoffet på udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider eller virkningen på larvernes overlevelse og vægt, hvis en 10-dages test udføres. Hvis der ikke er indikationer på statistisk forskellige sensitiviteter mellem kønnene, kan resultaterne for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse. Kønsbetingede sensitivitetsforskelle kan vurderes statistisk ved hjælp af f.eks. en χ^2 -r × 2-test. Larvernes overlevelse og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas bestemmes om nødvendigt efter 10 dage.
43. Effektkoncentrationer udtrykt og baseret på tørvægt beregnes fortrinsvis ud fra målte sedimentkoncentrationer ved begyndelsen af testen (se afsnit 38).
44. For at beregne et punkttestimat for EC₅₀ eller en anden EC_x-værdi bruges data pr. glas som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en EC_x-værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at den kan ignoreres. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. EC_x-værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi.
45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC/LOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af nested ANOVA. Alternativt kan mere robuste test (21) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes.

Emergensforhold

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor et monotont dosisrespons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binomial fordeling indikerer (ofte betegnet som »ekstra-binomial« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (21).

Summen af individer, der har udviklet sig pr. glas, n_e , bestemmes og divideres med antallet af tilførte larver, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

hvor:

ER = emergensforhold

n_e = antal udviklede individer pr. glas

n_a = antal tilførte larver pr. glas

47. Ved store prøvestørrelser, hvor der er ekstra-binomial varians, kan emergensforholdet behandles som et kontinuert respons, og der kan bruges fremgangsmåder, som f.eks. Williams test, når et monotont dosis-respons forventes og er i overensstemmelse med disse ER-data. Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monotoni. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).
48. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdier først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukey-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis absolutte hyppigheder anvendes. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus ($\sin^{-1}$) af kvadratroden af ER.
49. I forbindelse med emergensforhold beregnes EC_x -værdier ved hjælp af regressionsanalyse (eller f.eks. probit (22), logit, Weibull, relevant software i handelen osv.). Hvis regressionsanalyse mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvare), anvendes andre ikke-parametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

Udviklingshastighed

50. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af dansemyg. (Ved beregning af den sande udviklingstid tages larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning). Udviklingshastigheden er det reciprokke tal til udviklingstiden (enhed: 1/dag) og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetsforsøg, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på normalfordelingen end udviklingstid. Testfremgangsmåder baseret på anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som et kontinuert respons kan EC_x -værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (23) (24)).
51. I forbindelse med følgende statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag x og dag $x-1$ (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas ($\bar{x}$) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

hvor:

$\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas

i : indeks for inspektionsinterval

m : maksimalt antal inspektionsintervaller

f_i : antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i

n_e : det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af forsøget ($= \sum f_i$)

x_i : udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

hvor:

day_i : inspektionsdag (siden behandling)

l_i : længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

Testrapport

52. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

- fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand osv.)
- kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af teststof.

Testart:

- anvendte testorganismer: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser
- information om håndtering af ægmasser og larver
- testorganismernes alder ved tilsætning til testglas.

Testbetingelser:

- anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret sediment
- for naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening; karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)
- fremstilling af formuleret sediment: ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. ved begyndelsen af testen)
- fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed osv. ved begyndelsen af testen)
- dybde af sediment og overliggende vand
- volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand
- testglas (materiale og størrelse)
- metode til sedimentspiking: anvendte testkoncentrationer, antal replikater og brug af evt. opløsningsmiddel
- stabiliserende ligevægtsfase for det spikede sediment/vand-system: varighed og betingelser
- inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (hyppighed og intensitet)
- detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed.

Resultater:

- nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme teststofkoncentrationen i testglasset
- kvaliteten af vandet i testglassene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak
- evt. udskiftning af fordampet vand
- antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag
- antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas
- individuel gennemsnitlige tørvægt af larver pr. glas og pr. stadium, hvis relevant
- procentvis emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider)

- gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede individer pr. replikat og behandlingshastighed (samlet for han- og hunindivider)
- estimater for toksicitetseffektparametre, f.eks. EC_x (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og/eller LOEC og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem
- diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streløkke og H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Endelig rapport til Europa-Kommissionen. Rapport nr. EC 3738. August 1994. WRc, Det Forenede Kongerige.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Fra WOSTA-workshop afholdt i Nederlandene.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 1125-1241. I ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ og Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.
- (15) Suedel BC og JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C og C Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.
 - (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.
 - (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.
 - (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.
 - (21) Rao JNK og Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.
 - (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.
 - (23) Bruce og Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.
 - (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Interstitielt vand eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

Spiked sediment eller forurenet sediment: sediment, som teststoffet er tilsat.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Anbefalinger vedrørende dyrkning af *Chironomus riparius*

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kiselgur (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholderne opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).
2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

Fortyndingsvand

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f.eks. Elendt M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet skal beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholderne udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkningsbeholderne uden at ødelægge larverene.

Fodring af larver

4. Chironomus-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Denne præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.
5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.
6. Nogle grønalger (f.eks. *Scenedesmus subspicatus* og *Chlorella vulgaris*) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

Fodring af udviklede voksne

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

Emergens

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholderne. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

Ægmasser

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Evt. ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvand. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.
10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

Etablering af nye dyrkningsglas

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

Fremstilling af testopløsninger M4 og M7

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. En artikel om M7-mediet er under forberedelse (Elendt, personlig meddelelse). I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af NaSiO_3 , $5 \text{ H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 og K_2HPO_4 , idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

Fremstilling af M7-mediet

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makro-næringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

LITTERATUR

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

Tabel 1

Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ⁽¹⁾	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽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
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	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
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.

⁽²⁾ Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Tabel 2

Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO_3	64 800	1,0	64,8
$\text{NaSiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	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

Tabel 3

Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne. Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille én vitaminopløsning.

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

Tillæg 3

FREMSTILLING AF FORMULERET SEDIMENT

Sammensætning af sediment

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

Bestanddel	Karakteristika	% af sediment (tørvægt)
Tørv	Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret	4-5
Kvartssand	Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm	75-76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	20
Organisk kulstof	Justeres ved tilsætning af tørv og sand	2 ($\pm 0,5$)
Calciumcarbonat	CaCO_3 , pulveriseret, kemisk rent	0,05-0,1
Vand	Ledevne ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30-50

Fremstilling

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvpulver i ioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til $5,5 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være $6,0 \pm 0,5$. Derefter blandes tørvsuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med CaCO_3 . Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

Opbevaring

De tørre bestanddele til fremstilling af kunstigt sediment lagres tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

LITTERATUR

Kapitel C.8 i dette bilag. Toksicitet for regnorme.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

Tillæg 4

Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding

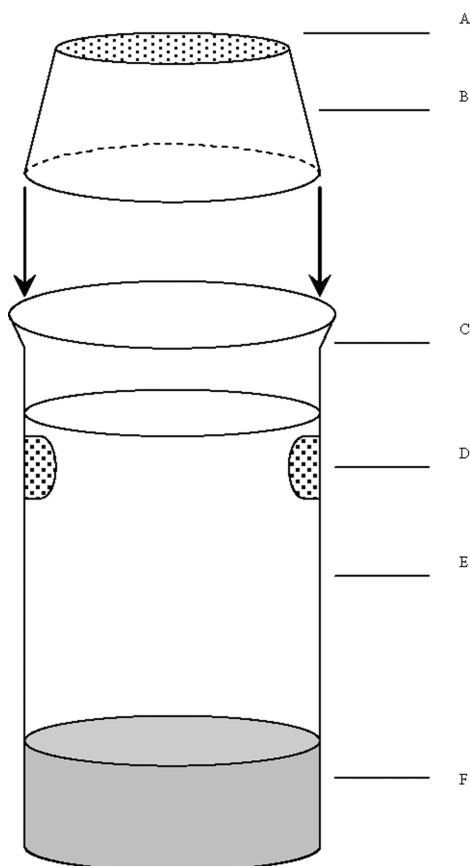
Stof	Koncentrationer
Faste stoffer	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhed som CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske phosphorpesticider	< 50 ng/l
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

Tillæg 5

Vejledning i overvågning af emergens af chironomidlarver

Emergensfiltre anbringes på testbærglassene. Disse filtre skal bruges fra dag 20 til slutningen af testen. Et eksempel på et filter vises nedenfor:



A: Nylonvæv

D: Åbninger med væv til vandudskiftning

B: Omvendte plastbægre

E: Vand

C: Eksponeringsbæger uden flange

F: Sediment

C. 28. TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET VAND**INDLEDNING**

- Denne testmetode svarer til OECD TG 219 (2004). Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på larver af ferskvandsdipteraen *Chironomus* sp., der lever i sediment, af forlænget eksponering for kemikalier. Den er primært baseret på BBA-vejledningen, der anvender et sediment- og vandtestsystem med syntetisk jord, og et vandsøjleeksponeringsscenario (1). Den inddrager også de eksisterende toksicitetstestprotokoller for *Chironomus riparius* og *Chironomus tentans*, der er blevet udviklet i Europa og Nordamerika (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) og ringtestet (1) (6) (9). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
- Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af vand. Valget af det mest velegnede eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Vandeksponeringsscenariet, hvor vandsøjlen spikes, har til formål at simulere et tilfælde af aerosolspredning af pesticider og dækker den første koncentrationstop i porevand. Det kan også anvendes i forbindelse med andre typer eksponering (herunder kemiske udslip) med undtagelse af akkumuleringsprocesser, der varer længere end testperioden.

3. Stoffer, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad forskellige veje. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af de fysisk-kemiske egenskaber af det pågældende kemikalie. Ved stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med $\log K_{ow} > 5$) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile stoffer kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af teststoffet. For at tage alle potentielle eksponeringsveje i betragtning fokuserer denne testmetode på langtidseksponering. Testens varighed er 20-28 dage for *C. riparius* og *C. yoshimatsui* og 28-65 dage for *C. tentans*. Hvis der kræves korttidsdata til særlige formål, f.eks. for at undersøge virkningerne af et ustabil kemikalie, kan yderligere replikater fjernes efter en periode på 10 dage.
4. De målte effektparametre er det samlede antal voksne, der har udviklet sig, og tiden, der er gået med udvikling. Det anbefales, at målinger af larvers overlevelse og vækst kun udføres efter en periode på 10 dage, hvis der kræves yderligere korttidsdata, ved hjælp af eventuelle yderligere replikater.
5. Det anbefales at anvende formuleret sediment. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:
 - udsvingene i forsøgene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikke-kontaminerede og rene sedimentkilder
 - testene kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna; brugen af formuleret sediment reducerer også omkostningerne i forbindelse med opsamling af tilstrækkelige mængder sediment i felten til rutinetest
 - anvendelsen af formuleret sediment gør det muligt at sammenligne toksicitet og rangordne stoffer i overensstemmelse hermed toksicitetsdata fra test med naturlige og kunstige sedimenter var sammenlignelige for flere kemikalier (2).
6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

TESTENS PRINCIP

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af teststoffet i sediment/vand-systemer. Testen indledes med, at æglarver anbringes i testbægerglas, som indeholder sediment/vand-systemet, og derefter tilsættes teststoffet vandet. Emergens- og udviklingstiden for chironomider måles ved afslutningen af testen. Larvernes overlevelse og vægt kan om nødvendigt også måles efter 10 dage (ved brug af yderligere replikater). Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at anslå den koncentration, der vil forårsage en reduktion på $\times$ % i emergens, larveoverlevelse eller larvevækst (f.eks. EC_{15} , EC_{50} osv.), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme en NOEC/LOEC. Sidstnævnte kræver sammenligning af effektværdier med kontrolværdier ved hjælp af statistiske test.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

8. Teststoffets vandopløselighed, damptryk, målt eller beregnet, fordeling i sediment og stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantificering af teststoffet i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter teststoffets strukturformel og renhed. Teststoffets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttige oplysninger. For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (12).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at testprotokollen og -betingelserne er pålidelige. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTENS VALIDITET

10. Testens validitet forudsætter følgende:

— emergensen i kontrolbeholderne skal være mindst 70 % ved testens afslutning (1) (6)

- emergensen af *C. riparius* og *C. yoshimatsui* til voksne fra kontrolglassene skal ske mellem 12 og 23 dage efter deres overførsel til testglassene; for *C. tentans* kræves der en periode på 20-65 dage
- ved testens afslutning måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hvert bægerglas. Koncentrationen af opløst ilt skal være mindst 60 % af værdien for mætning med luft (ASV) ved den anvendte temperatur, og pH i det overliggende vand skal være i intervallet 6-9 i alle bægerglas
- vandtemperaturen må højst variere med $\pm 1,0$ °C. Vandtemperatur kan styres ved at anvende et isotermisk rum, og i det tilfælde bekræftes rumtemperaturen med passende tidsintervaller.

BESKRIVELSE AF METODEN

Testglas

11. Forsøget udføres i 600 ml bægerglas med en diameter på 8 cm. Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sedimentoverfladen skal være tilstrækkelig (2 til 3 cm² pr. larve). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Testglas og andet udstyr, der kommer i berøring med testsystemet, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. Teflon).

Valg af fiskeart

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan også anvendes, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. *Chironomus yohimatsui* kan også anvendes. Detaljer om dyrkningsmetoder findes i tillæg 2 vedrørende *Chironomus riparius*. Oplysninger om dyrkningsbetingelser findes også for andre arter, dvs. *Chironomus tentans* (4) og *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikation af arten skal bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismer kommer fra en intern bestand.

Sediment

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomiderne. Inden naturligt sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på den syntetiske jord, der anvendes i testmetode C.8 (14), i denne test (1) (15) (16):

- a) 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret
- b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit
- c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μ m)
- d) deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %
- e) kemisk rent calciumcarbonat (CaCO_3) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på $7,0 \pm 0,5$
- f) det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % ($\pm 0,5$ %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litra a) og c).

14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske phosphorforbindelser osv.). Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

Vand

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som CaCO_3 . Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand skal anvendes i hele forsøget. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

Stamopløsninger — forurenat vand

16. Testkoncentrationer beregnes på grundlag af vandsøjlekoncentrationer, dvs. vandet over sedimentet. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger fremstilles fortrinsvis ved at opløse teststoffet i testmediet. Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Som opløsningsmiddel kan der benyttes acetone, ethanol, methanol, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose eller HCO-40. Koncentrationen af opløselighedsfremmere i det færdige testmedium skal være så lille som muligt (dvs. $\leq 0,1$ ml/l) og bør være den samme i alle behandlingsprøver. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, må den ikke have nogen signifikant virkning på overlevelsen eller synlig negativ virkning på chironomidlarven, hvilket kan afsløres ved en kontroltest, hvor kun opløsningsmidlet anvendes. Der skal ydes enhver indsats for at undgå brugen af sådanne materialer.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau samt antal larver pr. testglas. Design til beregning af EC-punkter, beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest beskrives. Regressionsanalyse foretrækkes frem for hypotesetest.

Design til regressionsanalyse

18. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. EC_{15} , EC_{50}) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer (EC_x) vil være mest nøjagtig og gyldig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. Ekstrapolering langt under den laveste positive koncentration eller over den højeste koncentration bør undgås. En præliminær test til bestemmelse af koncentrationsområdet kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende (se afsnit 27).
19. Hvis EC_x skal bestemmes, skal der testes mindst fem koncentrationer og tre replikater for hver koncentration. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosiskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen. Der kræves yderligere replikater, hvis larveoverlevelse og -vækst skal anslås for en periode på 10 dage.

Design til beregning af NOEC/LOEC

20. Hvis LOEC eller NOEC skal beregnes, anvendes fem testkoncentrationer med mindst fire replikater, og faktoren mellem koncentrationerne bør højst være to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % ($p = 0,05$). I forbindelse med udviklingshastigheden er en ANOVA-analyse normalt velegnet, f.eks. Dunnett-testen eller Williams-testen (17) (18) (19) (20). I forbindelse med emergensforholdet kan Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen anvendes.

Grænsetest

21. En grænsetest kan udføres (med en testkoncentration og kontrol), hvis der ikke blev observeret virkninger i den præliminære test til bestemmelse af koncentrationsområdet. Formålet med grænsetesten er at indicere, at teststoffets toksiske værdi er større end den testede grænsekoncentration. En anbefalet koncentration kan ikke foreslås i forbindelse med denne testmetode. Det overlades til myndighedernes vurdering. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgruppen. Statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % ($p = 0,05$) skal påvises. Med hensyn til metrisk respons (udviklingshastighed og vægt) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). T-testen justeret for forskel i varians eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whitney-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE**Eksponeringsbetingelser***Klargøring af forurenede vand- og sedimentsystem*

22. Passende mængder formuleret sediment (se afsnit 13-14 og tillæg 3) tilsættes testglasset, så der dannes et lag på mindst 1,5 cm. Vand tilsættes, så der fås en dybde på 6 cm (se afsnit 15). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af vandet må ikke overstige 1:4, og sedimentlaget må ikke være dybere end 3 cm. Sediment/vand-systemet hensættes til forsigtig beluftning i syv dage inden testorganismer tilsættes (se afsnit 14 og tillæg 3). For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen, kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.
23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). I løbet af forsøget påfyldes der yderligere vand for at bevare det oprindelige volumen og kompensere for vandfordampning. Dette vand skal være destilleret eller deioniseret vand for at forhindre opbygning af salte.

Tilsætning af testorganismer

24. Fire til fem dage inden tilsætningen af testorganismer til testglassene udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Hvis sidstnævnte anvendes, tilsættes dyrkningsmediet en lille mængde foder, f.eks. grønalger og/eller et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for *Chironomus riparius* ved 20 °C og 1-4 dage for *Chironomus tentans* ved 23 °C og *Chironomus yoshimatsu* ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Larver i første stadium (2-3 eller 1-4 dage efter udklækning) bør anvendes i testen. Larver af dansemyg kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (6).
25. 20 æglarver fordeles vilkårligt til hvert testglas med forurenede sediment og vand ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet skal standses, mens larverne overføres til testglassene, og den skal være standset i endnu 24 timer efter tilsætningen af larver (se afsnit 24 og 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se afsnit 19 og 20) anvendes der mindst 60 larver pr. koncentration i forbindelse med bestemmelse af EC-punkter og 80 til bestemmelse af NOEC.
26. 24 timer efter tilsætning af larverne tilsættes teststoffet i den overliggende vandsøjle, og let beluftning tilføres igen. Små mængder af teststofopløsninger tilsættes under vandoverfladen ved hjælp af en pipette. Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet.

Testkoncentrationer

27. En test til bestemmelse af koncentrationsområde kan være nyttig, når koncentrationsområdet skal vælges til den endelige test. Til det formål anvendes en række spredte koncentrationer af teststoffet. For at opnå den overfladedensitet pr. chironomide, der anvendes i den endelige test, eksponeres chironomider for hver koncentration af teststoffet i en periode, der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer, og der kræves ingen replikater.
28. Testkoncentrationerne i den endelige test fastlægges ud fra testen til bestemmelse af koncentrationsområde. Mindst fem koncentrationer anvendes og vælges som beskrevet i afsnit 18-20.

Kontroller

29. Kontrolglas uden teststof, men med sediment, inkluderes i testen med et hensigtsmæssigt antal replikater (se afsnit 19-20). Hvis der er anvendt et opløsningsmiddel til tilsætning af teststoffet (se afsnit 16), anvendes også en opløsningsmiddelkontrol.

Testsystem

30. Der anvendes statiske systemer. Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med intermitterende eller kontinuerlig udskiftning af overliggende vand kan undtagelsesvis bruges, hvis specifikationerne for vandkvalitet bliver uhensigtsmæssige for testorganismen eller påvirker den kemiske ligevægt (hvis f.eks. koncentrationen af opløst ilt bliver for lav, koncentrationen af ekskretionsprodukter bliver for høj, eller mineraler udvaskes fra sedimentet og påvirker pH og/eller vandets hårdhed). Andre metoder til forbedring af det overliggende vands kvalitet, f.eks. beluftning, er normalt tilstrækkelige og bør foretrækkes.

Foder

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for *C. yoshimatsui*) pr. larve pr. dag er tilstrækkelig til unge larver i de første 10 dage. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen skal reduceres i alle behandlingsprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis mortalitet observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen. Ved test af stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med $\log K_{ow} > 5$) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre organismernes overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden. Til det formål anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tørvægt) fintmalede blade af brændenælde (*Urtica dioica*), morbærtræ (*Morus alba*), hvidkløver (*Trifolium repens*) eller spinat (*Spinacia oleracea*). Andet plantemateriale (Cerophyl eller alfa-cellulose) kan også anvendes.

Inkubationsbetingelser

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages helst 24 timer efter tilsætningen af larver og foretages gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-glaspipette, der er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget (dvs. en eller få bobler pr. sekund). Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet.
33. Testen udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For *C. tentans* og *C. yoshimatsui* anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten skal være 500-1 000 lux.

Eksponeringsvarighed

34. Eksponeringen begynder, når larver tilsættes de forurenede bægerglas og kontrolglassene. Den maksimale eksponeringsvarighed er 28 dage for *C. riparius* og *C. yoshimatsui* og 65 dage for *C. tentans*. Hvis dansemyg udvikles tidligere, kan testen afsluttes, når der er gået mindst fem dage efter emergensen af den sidste voksne i kontrolglasset.

OBSERVATIONER

Emergens

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider bestemmes. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.
36. Testglassene observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere abnorm opførsel (hvis individer f.eks. forlader sediment eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af perioden for forventet emergens foretages en daglig tælling af de udviklede individer. Kønnen og antallet af fuldt udviklede individer registreres dagligt. Efter identifikation fjernes individerne fra bægerglassene. Ægmasse, der er afsat før afslutningen af testen, registreres og fjernes derefter for at forhindre gentaget tilførsel af larver til sedimentet. Antallet af synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Vejledning i måling af emergens findes i tillæg 5.

Vækst og overlevelse

37. Hvis der skal fremlægges data om larveoverlevelse og -vækst efter 10 dage, skal yderligere testglas medtages fra begyndelsen, så de kan anvendes efterfølgende. Sedimentet fra disse yderligere glas sigtes gennem en 250 µm sigte for at tilbageholde larverne. Kriterier for død er immobilitet eller manglende reaktion på mekaniske stimuli. Larver, der ikke genfindes, registreres også som døde (larver, der er døde ved begyndelsen af testen, kan være blevet nedbrudt af mikrober). Tørvægten (askefri) af de overlevende larver pr. testglas bestemmes, og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas beregnes. Det er nyttigt at bestemme det stadium, som de overlevende larver befinder sig på. Til det formål anvendes en måling af bredden på hvert individs hovedkapsel.

Analysemålinger*Teststofkoncentration*

38. Som minimum analyseres prøver af det overliggende vand, porevandet og sedimentet ved begyndelsen (helst en time efter tilsætning af teststoffet) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Disse bestemmelser af teststofkoncentrationen giver oplysninger om teststoffets opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet. Prøvetagning af sediment ved begyndelsen af testen kan påvirke testsystemet (f.eks. fjerne test-larver), og derfor bør der anvendes yderligere testglas til udførelsen af analysebestemmelser ved begyndelsen af

og i løbet af testen, hvis det er hensigtsmæssigt (se afsnit 39). Målinger i sediment er muligvis ikke nødvendige, hvis fordelingen af teststoffet mellem vand og sediment er blevet tydeligt bestemt i et vand- og sedimentforsøg under lignende betingelser (f.eks. forhold mellem vand og sediment, anvendelsestype og organisk kulstofindhold i sediment).

39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.
40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt vand. Hvis det påvises, at teststoffet ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.

Fysisk-kemiske parametre

41. Testglassenes pH og temperatur samt opløst ilt i vandet måles på en hensigtsmæssig måde (se afsnit 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og et testglas ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

42. Formålet med denne test er at bestemme virkningen af teststoffet på udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider eller virkningen på larvernes overlevelse og vægt, hvis en 10-dages test udføres. Hvis der ikke er indikationer på statistisk forskellige sensitiviteter mellem kønnene, kan resultaterne for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse. Kønsbetingede sensitivitetsforskelle kan vurderes statistisk ved hjælp af f.eks. en χ^2 -r × 2-test. Larvernes overlevelse og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas bestemmes om nødvendigt efter 10 dage.
43. Effektkoncentrationer udtrykt som koncentrationer i det overliggende vand beregnes fortrinsvis ud fra målte sedimentkoncentrationer ved begyndelsen af testen (se afsnit 38).
44. For at beregne et punktestimat for EC₅₀ eller en anden EC_x-værdi bruges data pr. glas som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en EC_x-værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at den kan ignoreres. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. EC_x-værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi.
45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC/LOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af nested ANOVA. Alternativt kan mere robuste test (21) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes.

Emergensforhold

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor et monotont dosisrespons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binomial fordeling indikerer (ofte betegnet som »ekstra-binomial« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (21).
47. Summen af individer, der har udviklet sig pr. glas, n_e , bestemmes og divideres med antallet af tilførte larver, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

hvor:

ER = emergensforhold

n_e = antal udviklede individer pr. glas

n_a = antal tilførte larver pr. glas

48. Ved store prøvestørrelser, hvor der er ekstra-binomial varians, kan emergensforholdet behandles som et kontinuert respons, og der kan bruges fremgangsmåder, som f.eks. Williams test, når et monotont dosis-respons forventes og er i overensstemmelse med disse ER-data. Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monoton. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).
49. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdier først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukey-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis absolutte hyppigheder anvendes. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus ($\sin^{-1}$) af kvadratroden af ER.
50. I forbindelse med emergensforhold beregnes EC_x -værdier ved hjælp af regressionsanalyse (eller f.eks. probit (22), logit, Weibull, relevant software i handelen osv.). Hvis regressionsanalyse mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvare), anvendes andre ikke-parametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

Udviklingshastighed

51. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af dansemyg. (Ved beregning af den sande udviklingstid tages larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning.) Udviklingshastigheden er det reciproke tal til udviklingstiden (enhed: 1/dag) og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetsforsøg, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på normalfordelingen end udviklingstid. Testfremgangsmåder baseret på anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som et kontinuert respons kan EC_x -værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (23) (24)).
52. I forbindelse med følgende statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag x og dag $x-l$ (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas (x) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

hvor:

- $\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas
- i : indeks for inspektionsinterval
- m : maksimalt antal inspektionsintervaller
- f_i : antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i
- n_e : det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af forsøget ($= \sum f_i$)
- x_i : udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = 1 / \left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

hvor:

- day_i : inspektionsdag (siden behandling)
- l_i : længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

Testrapport

53. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

- fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand osv.)
- kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af teststof.

Testart:

- anvendte forsøgsdyr: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser
- information om håndtering af ægmasser og larver
- forsøgsdyrenes alder ved tilsætning til testglas.

Testbetingelser:

- anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret sediment
- for naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening; karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)
- fremstilling af formuleret sediment: ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. ved begyndelsen af testen)
- fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed osv. ved begyndelsen af testen)
- dybde af sediment og overliggende vand
- volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand
- testglas (materiale og størrelse)
- metode til fremstilling af stamopløsninger og testkoncentrationer
- anvendelse af teststof: anvendte testkoncentrationer, antal replikater og brug af evt. opløsningsmiddel
- inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (hyppighed og intensitet)
- detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed.

Resultater:

- nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme teststofkoncentrationen i testglasset
- kvaliteten af vandet i testglassene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak
- evt. udskiftning af fordampet vand
- antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag
- antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas
- individuel gennemsnitlige tørvægt af larver pr. glas og pr. stadium, hvis relevant
- procentvis emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider)
- gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede individer pr. replikat og behandlingshastighed (samlet for han- og hunindivider)
- estimater for toksicitetseffektparametre, f.eks. EC_x (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og/eller LOEC og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem
- diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

LITTERATUR:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Endelig rapport til Europa-Kommissionen. Rapport nr. EC 3738. August 1994. WRc, Det Forenede Kongerige.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Fra WOSTA-workshop afholdt i Nederlandene.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 1125-1241. I ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850,1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ og Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.
- (15) Suedel BC og Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C og Rodrigues C (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.

-
- (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (21) Rao JNK og Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48:577-585.
- (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce og Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

Formuleret sediment eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

Overliggende vand: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

Interstitielt vand eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

Spiked vand eller forurenet vand: vand, som teststoffet er tilsat.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Anbefalinger vedrørende dyrkning af *Chironomus riparius*

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kiselgur (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholdere opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).
2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

Fortyndingsvand

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f.eks. Elenit M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet skal beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholdere udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkningsbeholdere uden at ødelægge larverørene.

Fodring af larver

4. Chironomus-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Denne præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.
5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.
6. Nogle grønalger (f.eks. Scenedesmus subspicatus og Chlorella vulgaris) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

Fodring af udviklede voksne

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

Emergens

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholdere. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

Ægmasser

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Evt. ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvandet. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.
10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

Etablering af nye dyrkningsglas

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

Fremstilling af testopløsninger M4 og M7

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. En artikel om M7-mediet er under forberedelse (Elendt, personlig meddelelse). I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af NaSiO_3 , $5 \text{ H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 og K_2HPO_4 , idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

Fremstilling af M7-mediet

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makro-næringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

Tabel 1

Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne

Stamopløsninger (I)	Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand	Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand		Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ⁽¹⁾	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽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
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	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
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.

⁽²⁾ Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Tabel 2

Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tabel 3

Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne

Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille én vitaminopløsning.

	Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg)	Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l)	Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP og Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

Tillæg 3

FREMSTILLING AF FORMULERET SEDIMENT

Sammensætning af sediment

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

Bestanddel	Karakteristika	% af sediment (tørvægt)
Tørv	Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret	4-5
Kvartssand	Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm	75-76
Kaolinholdigt ler	Kaolinindhold ≥ 30 %	20
Organisk kulstof	Justeres ved tilsætning af tørv og sand	2 ($\pm 0,5$)
Calciumcarbonat	CaCO_3 , pulveriseret, kemisk rent	0,05-0,1
Vand	Ledeevne ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30-50

Fremstilling

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvpulver i ioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til $5,5 \pm 0,5$ med CaCO_3 . Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være $6,0 \pm 0,5$. Derefter blandes tørvsuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med CaCO_3 . Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

Opbevaring

De tørre bestanddele til fremstilling af kunstigt sediment lagres tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

LITTERATUR:

Kapitel C.8 i dette bilag. Toksicitet for regnorme.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

Tillæg 4

Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding

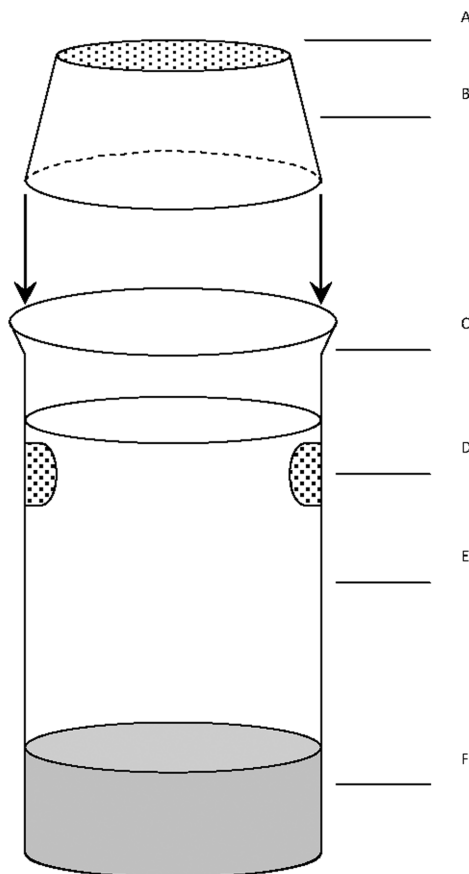
Stof	Koncentrationer
Faste stoffer	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhed som CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organiske phosphorpesticider	< 50 ng/l
Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

Tillæg 5

Vejledning i overvågning af emergens af chironomidlarver

Emergensfiltre anbringes på testbærglassene. Disse filtre skal bruges fra dag 20 til slutningen af testen. Et eksempel på et filter vises nedenfor:



A: Nylonvæv

B: Omvendte plastbægre

C: Eksponeringsbæger uden flange

D: Åbninger med væv til vandudskiftning

E: Vand

F: Sediment

C.29. LET BIONEDBRYDELIGHED — CO₂ I LUKKEDE BEHOLDERE (HEADSPACE-TEST)**INDLEDNING**

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 310 (2006). Denne testmetode er en screeningsmetode til evaluering af kemikaliers lette bionedbrydelighed og giver oplysninger, der svarer de oplysninger, der fås med de seks testmetoder, som er beskrevet i kapitel C.4 (A-F) i dette bilag. Et kemikalie, der giver positive resultater i forbindelse med denne testmetode, kan derfor betragtes som let bionedbrydeligt og derfor hurtigt nedbrydeligt i miljøet.
2. Den veletablerede kuldioxidmetode (CO₂) (1), der er baseret på Sturms originale test (2) til vurdering af organiske kemikaliers bionedbrydelighed, som måler den kuldioxid, der produceres ved mikrobiel aktivitet, har normalt været den foretrukne metode i forbindelse med test af tungtopløselige kemikalier og stærkt adsorberende kemikalier. Den er også blevet anvendt i forbindelse med opløselige (men ikke flygtige) kemikalier, da udviklingen af kuldioxid af mange betragtes som det eneste klare bevis for mikrobiel aktivitet. Eliminering af opløst organisk kulstof kan opnås ved hjælp af fysisk-kemiske processer — adsorption, fordampning, udfældning, hydrolyse — og ved hjælp af mikrobiel aktivitet, og mange ikke-biologiske reaktioner forbruger ilt. CO₂ produceres i sjældne tilfælde abiotisk fra organiske kemikalier. I den originale og tilpassede Sturm-test (1) (2)

elimineres CO₂ fra væskefasen til de absorberende kar som følge »sparging« (dvs. luftbobler, der er behandlet til at eliminere CO₂ via det flydende substrat), mens CO₂ i Larsons version (3) (4) overføres fra reaktionsbeholderen til absorberne ved at lade CO₂-fri luft passere gennem headspace og ved også kontinuerligt at ryste testbeholderen. Kun i Larsons version rystes reaktionsbeholderen. Omrystning foreskrives kun for uopløselige stoffer i ISO 9439 (5) og i den originale amerikanske version (6), som begge foreskriver sparging i stedet for headspace-udskiftning. I en anden officiel amerikansk EPA-metode (7), som er baseret på Gledhills metode (8), er den omrystede reaktionsbeholder lukket for atmosfæren, og det producerede CO₂ opsamles i et indbygget alkalisk filter direkte fra gasfasen som i klassiske Warburg/Barcroft-respirometerkolber.

3. Det er påvist, at uorganisk kulstof akkumuleres i mediet ved anvendelse af den traditionelle tilpassede Sturm-test på en række kemikalier (9). En koncentration af uorganisk kulstof på så meget som 8 mg/l blev fundet under nedbrydningen af 20 mg C/l anilin. Opsamling af CO₂ i alkalifiltre gav derfor ikke et sandt billede af den mængde CO₂, der produceres mikrobiologisk på forskellige tidspunkter i løbet af nedbrydningen. Som følge deraf opfyldes forskriften om, at en teoretisk maksimal CO₂-produktion > 60 % skal opsamles inden for et »10-dages-vindue« (de 10 dage umiddelbart efter opnåelsen af 10 % bionedbrydning), for at et testkemikalie kan klassificeres som let bionedbrydeligt, ikke for visse kemikalier, der klassificeres som sådan ved hjælp af eliminering af opløst organisk kulstof (DOC).
4. Når den procentvise nedbrydning er en lavere værdi end forventet, akkumuleres uorganisk kulstof muligvis i testopløsningen. Bionedbrydelighed kan derefter vurderes med andre test for let bionedbrydelighed.
5. På grund af andre ulemper ved Sturm-metoden (besværlig, tidskrævende, mere udsat for forsøgsfejl og ikke-anvendelig i forbindelse med flygtige kemikalier) har man tidligere forsøgt at finde en teknik med en lukket beholder — ud over Gledhills — i stedet for gasgennemstrømning (10) (11). Boatman et al. (12) gennemgik de tidligere metoder og anvendte et indesluttet headspace-system, hvor CO₂ blev frigivet til headspace ved slutningen af inkubationen gennem forsuring af mediet. CO₂ blev målt ved hjælp af gaskromatografi (GC)/analyse af uorganisk kulstof i automatisk udtagne prøver fra headspace, men opløst uorganisk kulstof (DIC) i væskefasen blev ikke taget i betragtning. De anvendte beholdere var desuden meget små (20 ml) og indeholdt kun 10 ml medium, hvilket gav problemer f.eks. ved tilsætning af de nødvendigvis meget små mængder uopløselige testkemikalier. Der kunne også være for få eller ingen mikroorganismer til stede i det inokulerede medium, som kan nedbryde testkemikalierne.
6. Disse vanskeligheder er blevet afhjulpet af de forsøg, som Struijs og Stoltenkamp (13) samt Birch og Fletcher (14) hver for sig har udført, idet sidstnævnte har været inspireret af erfaringer med apparatur anvendt i den anaerobe bionedbrydningstest (15). I den førstnævnte metode (13) måles CO₂ i headspace efter forsuring og ækvilibrering, mens DIC i sidstnævnte metode (14) måles i både gasfasen og væskefasen uden behandling. Over 90 % af det dannede uorganiske kulstof var til stede i væskefasen. Begge metoder har fordele i forhold til Sturm-testen, idet testsystemet var mere kompakt og håndterbart, flygtige kemikalier kan testes, og muligheden for forsinkelse i målingen af det producerede CO₂ undgås.
7. De to metoder blev kombineret i ISO Headspace CO₂-standarden (16), som blev ringtestet (17), og det er denne standard, der er grundlaget for denne testmetode. De to metoder er ligeledes blevet anvendt i den amerikanske EPA-metode (18). Der anbefales to metoder til måling af CO₂, nemlig CO₂ i headspace efter forsuring (13) og uorganisk kulstof i væskefasen efter tilsætning af yderligere alkali. Sidstnævnte metode blev introduceret af Peterson under CONCAWE-ringtesten (19) af denne headspace-metode med tilpasning til måling af iboende bionedbrydelighed. De ændringer, der blev foretaget i revisionen af metoderne i kapitel C.4 Bestemmelse af let bionedbrydelighed i dette bilag i 1992 (20), er indarbejdet i denne testmetode, således at betingelserne (medium, varighed osv.) i øvrigt er de samme som i den reviderede Sturm-test (20). Birch og Fletcher (14) har påvist, at næsten samme resultater blev opnået med denne headspace-test som med de samme kemikalier i OECD-ringtesten (21) af de reviderede testmetoder.

TESTENS PRINCIP

8. Som eneste kulstof- og energikilde inkuberes testkemikaliets, normalt ved 20 mg C/l, i et medium af bufrede mineralsalte, som er inokuleret med en blandet population af mikroorganismer. Testen udføres i lukkede flasker med headspace af luft, som skaber et iltreservoir til aerob bionedbrydning. CO₂-udviklingen som følge af den fuldstændige aerobe bionedbrydning af testkemikaliets bestemmes ved at måle det uorganiske kulstof, der produceres i testflaskerne, ud over det, der produceres i blindprøver, som kun indeholder inokuleret medium. Graden af bionedbrydning udtrykkes som en procentdel af den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof (ThC) baseret på den mængde testkemikalie (som organisk kulstof), der oprindeligt blev tilsat.
9. DOC-eliminering og/eller graden af primær bionedbrydning af testkemikaliets kan også måles (20).

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

10. Testkemikaliet organiske kulstofindhold (% w/w) skal kendes enten fra dets kemiske struktur eller ved måling, således at den procentvise nedbrydning kan beregnes. For flygtige testkemikalier kan en målt eller beregnet Henrys konstant bruges til at bestemme et hensigtsmæssigt forhold mellem headspace og væskevolumen. Information om testkemikaliet toksicitet over for mikroorganismer kan bruges til at vælge en hensigtsmæssig testkoncentration og fortolke resultater, der påviser lav bionedbrydelighed. Kontrol for hæmning bør medtages, medmindre det er påvist, at testkemikallet ikke hæmmer mikrobielle aktiviteter (se afsnit 24).

METODENS ANVENDELSESOMRÅDE

11. Testen kan anvendes i forbindelse med vandopløselige og uopløselige testkemikalier, men god dispergering af testkemikallet skal sikres. Ved hjælp af det anbefalede forhold mellem headspace og væskevolumen på 1:2 kan flygtige kemikalier med en Henrys konstant på op til $50 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ testes, da testkemikaliet andel af headspace ikke overstiger 1 % (13). Et mindre headspace-volumen kan anvendes ved test af kemikalier, der er mere flygtige, men hvis biotilgængelighed virker begrænsende, navnlig hvis de er tungtopløselige i vand. Brugere skal dog sikre, at forholdet mellem headspace og væskevolumen og koncentrationen af testkemikallet er af en sådan karakter, at der er ilt nok til stede til at muliggøre fuldstændig aerob bionedbrydning. Det skal f.eks. undgås at bruge en høj substratkoncentration og et lille headspace-volumen. Vejledning i dette findes i (13) (23).

REFERENCEKEMIKALIER

12. For at kontrollere testfremgangsmåden testes et referencekemikalie med kendt bionedbrydelighed parallelt. Til det formål kan anilin, natriumbenzoat eller ethylenglycol anvendes i forbindelse med test af vandopløselige testkemikalier og 1-octanol til tungtopløselige testkemikalier (13). Bionedbrydning af disse kemikalier skal nå op på > 60 % af den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof inden for 14 dage.

REPRODUCERBARHED

13. I ISO-ringtesten af metoden (17) blev følgende resultater opnået under de anbefalede betingelser, herunder 20 mg C testkemikalie pr. liter.

Testkemikalie	Gennemsnitlig bionedbrydning i % (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Anilin	90	16	17
1-octanol	85	12	14

Variabiliteten inden for testen (replikabilitet), ved brug af anilin, var lav, idet variationskoefficienterne var mindre end 5 % i næsten alle testserier. I de to tilfælde, hvor replikabiliteten var ringere, skyldtes den større variabilitet sandsynligvis en høj produktion af uorganisk kulstof i blindprøverne. Replikabiliteten var ringere med 1-octanol, men stadig mindre end 10 % for 79 % af testserierne. Denne større variabilitet inden for testen kan skyldes doseringsfejl, da en lille mængde (3-4 µl) 1-octanol skulle injiceres i lukkede testflasker. Der opnås højere variationskoefficienter, når der anvendes lavere koncentrationer af testkemikallet, især ved koncentrationer under 10 mg C/l. Dette kan delvist afhjælpes ved at reducere koncentration af det totale kulstofindhold i inokulum.

14. I en EU-ringtest (24) af fem overfladeaktive stoffer, som blev tilsat med 10 mg C/l, blev der opnået følgende resultater:

Testkemikalie	Gennemsnitlig bionedbrydning i % (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Tetrapropylbenzensulfonat	17	45	10
Di-isoctylsulfo-succinat (anionisk)	72	22	9
Hexadecyl-trimethyl- (*) ammoniumchlorid (kationisk)	75	13	10

Testkemikalie	Gennemsnitlig bionedbrydning i % (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Isononylphenol- (ethoxylat) ₉ (nonionisk)	41	32	10
Coco-amid-propyl- dimethylhydroxy- sulfofetain (amfoter)	60	23	11

(*) SiO₂ blev tilsat for at neutralisere toksicitet.

I henhold til resultaterne var variabiliteten generelt højere for de mindre velnedbrudte overfladeaktive stoffer. Variabiliteten inden for testen var mindre end 15 % for over 90 % af tilfældene, og den højeste nåede op på 30-40 %.

BEMÆRK: De fleste overfladeaktive stoffer er ikke enkeltmolekyler, men er blandinger af isomerer, homologer osv., der nedbrydes efter forskellige karakteristiske lag-perioder og ved forskellige kinetiske hastigheder, så der fås »uklare« kurver, som betyder, at pass-værdien på 60 % måske ikke nås inden for 10-dages-vinduet, selv om hvert molekyle når op på > 60 % inden for 10 dage, hvis det testes alene. Dette kan også observeres i forbindelse med andre komplekse blandinger.

BESKRIVELSE AF METODEN

Apparatur

15. Sædvanligt laboratorieudstyr og:

- Glasserumflasker, lukket med propper af butylgummi og »crimp-on« aluminiumslåg. Den anbefalede størrelse er »125 ml«, som har et samlet volumen på ca. 160 ml. Volumen for hver flaske skal være angivet til 160 ± 1 ml. En mindre beholder kan bruges, hvis resultaterne opfylder betingelserne i afsnit 66 og 67.
- Kulstofanalysator eller andet instrument (f.eks. gaskromatograf) til måling af uorganisk kulstof.
- Sprøjter med høj præcision til gasformige og flydende prøver.
- Orbitalryster i temperaturreguleret miljø.
- Tilførsel af CO₂-fri luft — dette kan fremstilles ved at lade luft passere gennem natriumhydroxidperler eller ved hjælp af en gasblanding af 80 % N₂/20 % O₂ (valgfrit) (se afsnit 28).
- Membranfiltreringsapparat med porøsitet på 0,20-0,45 µm (valgfrit).
- Organisk kulstofanalysator (valgfrit).

Reagenser

16. Anvend reagenser af analysekvalitet i hele testen.

Vand

- Der anvendes destilleret eller deioniseret vand med ≤ 1 mg/l samlet organisk kulstof. Det repræsenterer ≤ 5 % af det indledende organiske kulstofindhold tilført ved den anbefalede dosis af testkemikaliets.

Stamopløsninger til medium med mineralsalte

- Stamopløsningerne og mediet af mineralsalte ligner dem, der anvendes i ISO 14593 (16) og testen for let bionedbrydelighed i kapitel C.4 i dette bilag (20). Der bør kun undtagelsesvis anvendes en højere koncentration af ammoniumchlorid (2,0 g/l i stedet for 0,5 g/l), f.eks. når koncentrationen af testkemikaliets er > 40 mg C/l. Stamopløsninger opbevares i køleskab og kasseres efter seks måneder eller tidligere, hvis der er tegn på udfældning eller mikrobiel vækst. Følgende stamopløsninger fremstilles:

a) Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

Dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

Dinatriumhydrogenfosfatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40 g

Ammoniumchlorid (NH_4Cl) 0,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Denne opløsnings pH skal være 7,4 ($\pm 0,2$). Hvis det ikke opnås, fremstilles en ny opløsning.

b) Calciumchloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

c) Magnesiumsulfatheptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

d) Jern(III)chloridhexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Tilsæt en dråbe koncentreret HCl.

Fremstilling af mineralsk medium

19. 10 ml af opløsning a) blandes med ca. 800 ml vand (afsnit 17), og af opløsning b), c) og d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 liter med fortyndingsvand (afsnit 17).

Andre reagenser

20. Koncentreret orthophosphorsyre (H_3PO_4) (> 85 % masse pr. volumenenhed).

7 M natriumhydroxidopløsning

21. 280 g natriumhydroxid (NaOH) opløses i 1 liter vand (afsnit 17). Bestem koncentrationen af opløst uorganisk kulstof (DIC) i denne opløsning, og anvend denne værdi ved beregningen af testresultatet (se afsnit 55 og 61), især på baggrund af validitetskriteriet i afsnit 66, litra b). Fremstil en frisk opløsning, hvis DIC-koncentrationen er for høj.

Testkemikalie

22. Fremstil en stamopløsning af et tilstrækkeligt vandopløseligt testkemikalie i vand (afsnit 17) eller i testmediet (afsnit 19) ved en koncentration, der helst er 100 gange højere end den slutkoncentration, der skal anvendes i testen. Det kan være nødvendigt at justere stamopløsningens pH. Stamopløsningen tilsættes det mineralske medium for at opnå en endelig koncentration for organisk kulstof på 2-40 mg C/l, helst 20 mg C/l. Hvis der anvendes lavere koncentrationer end disse, kan det påvirke den opnåede præcision. Opløselige og uopløselige flydende kemikalier kan tilsættes beholderne direkte ved hjælp af højpræcisionssprøjter. Lavt opløselige og uopløselige testkemikalier kan kræve særlig behandling (25). Der findes følgende valgmuligheder:

a) direkte tilsætning af kendte vejede mængder

b) ultralydsdispergering inden tilsætning

c) dispergering med hjælp fra emulgeringsmidler, hvor det dog fastlægges, om de har hæmmende eller stimulerende virkning på den mikrobielle aktivitet, inden tilsætning

d) adsorption af flydende testkemikalier eller en opløsning i et egnet flygtigt opløsningsmiddel til et inert medium eller underlag (f.eks. glasfiberfilter) efterfulgt af fordampning af det anvendte opløsningsmiddel og direkte tilsætning af kendte mængder

e) tilsætning af et kendt volumen af en opløsning af testkemikallet i et meget flygtigt opløsningsmiddel til en tom testbeholder efterfulgt af fordampning af opløsningsmidlet.

Stoffer eller opløsningsmidler, der er anvendt i c), d) og e) skal testes for evt. stimulerende eller hæmmende virkning på den mikrobielle aktivitet (se afsnit 42, litra b)).

Referencekemikalie

23. Fremstil en stamopløsning af det opløselige referencekemikalie i vand (afsnit 17) ved en koncentration, der helst er 100 gange større end den slutkoncentration, der skal anvendes i testen (20 mg C/l).

Test for hæmning

24. Testkemikalier udviser ofte ingen signifikant nedbrydning under de betingelser, der anvendes i forbindelse med vurderinger af let bionedbrydelighed. Det kan skyldes, at testkemikaliet har hæmmende virkning på inokulum ved den koncentration, som det anvendes med i testen. En test for hæmning kan indgå i testdesignet for at gøre det lettere (efterfølgende) at udpege hæmning som en mulig årsag eller medvirkende faktor. Alternativt kan testen for hæmning udelukke en sådan påvirkning og vise, at ingen eller kun let nedbrydning kan tilskrives manglende mulighed for mikrobielt angreb under de anvendte testbetingelser. For at få oplysninger om testkemikaliet toksicitet for (aerobe) mikroorganismer fremstilles en opløsning af testmediet, der indeholder testkemikaliet og referencekemikaliet (afsnit 19) ved de koncentrationer, som de er tilsat ved (se afsnit 22 og 23).

Inokulum

25. Inokulum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktiveret slam, spildevandsafløb (ikke-chlorerede), overfladevand og -jord eller en blanding af disse (20). Kildens biologiske nedbrydningsaktivitet skal kontrolleres ved hjælp af et referencekemikalie. Uanset kilden må mikroorganismer, der tidligere er eksponeret for testkemikaliet, ikke anvendes, hvis fremgangsmåden skal bruges som en test for let bionedbrydelighed.

Advarsel: Aktiveret slam, spildevand og spildevandsafløb kan indeholde patogene organismer og skal håndteres med forsigtighed.

26. Erfaringer har vist, at det optimale volumen for inokulum er det volumen, som:

- er tilstrækkeligt til at skabe den nødvendige bionedbrydende aktivitet
- nedbryder referencekemikaliet med den angivne procentdel (se afsnit 66)
- giver 10^2 til 10^5 kolonidannende enheder pr. ml endelig blanding
- normalt giver en koncentration på 4 mg/l suspenderede stoffer i den endelige blanding, når aktiveret slam anvendes; koncentrationer på op til 30 mg/l kan anvendes, men kan forøge blindprøvernes CO_2 -produktion markant (26)
- bidrager med under 10 % af det indledende organiske kulstofindhold tilført af testkemikaliet
- generelt udgør 1-10 ml af inokulum til 1 liter testopløsning.

Aktiveret slam

27. Aktiveret slam udtages frisk fra beluftningstanken ved et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Om nødvendigt fjernes grove partikler ved sigtning (f.eks. ved hjælp af en sigte med et net på 1 mm²), og slammet opbevares aerobisk indtil anvendelsen.
28. Alternativt kan slammet henstå til bundfældning eller centrifugeres (f.eks. ved 1 100 × g i 10 min), efter at grove partikler er fjernet. Supernatanten kasseres. Slammet kan vaskes i den mineralske opløsning. Det koncentrerede slam suspenderes til en koncentration på 3-5 g suspenderede stoffer pr. liter, hvorefter det beluftes indtil anvendelse.
29. Slammet skal tages fra et velfungerende konventionelt rensningsanlæg. Slammet vaskes, hvis det er nødvendigt at tage det fra et stærkt belastet rensningsanlæg, eller et rensningsanlæg, som menes at indeholde hæmmende stoffer. Det resuspenderede slam henstår til bundfældning eller centrifugeres efter grundig blanding, supernatanten fjernes, og det vaskede slam resuspenderes i mineralsk medium. Denne fremgangsmåde gentages, indtil slammet menes at være fri for overskud af substrat eller hæmmende stoffer.
30. Lige før brugen udtages der en prøve af det fuldstændigt resuspenderede slam eller af det ubehandlede slam med henblik på at bestemme mængden af suspenderede stoffer.

31. Et andet alternativ er at homogenisere aktiveret slam (3-5 g suspenderede stoffer pr. liter). Slammet behandles i en Waring-blender i 2 minutter ved middel hastighed. Det homogeniserede slam henstår til bundfældning i mindst 30 minutter, og væsken dekanteres fra til brug som inokulum i en mængde på 10 ml pr. liter mineralsk medium.
32. Yderligere reduktion af den blinde CO₂-udvikling kan opnås ved at belufte slammet natten over med CO₂-fri luft. Brug 4 mg/l aktiverede slamfaststoffer som inokulumkoncentration i denne test (13).

Sekundært spildevand

33. Inokulum kan også fremstilles af sekundært udløb fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Prøven opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Hvis det ikke er muligt, skal den prækonditioneres. Udløbet filtreres gennem et groft filter for at fjerne grove partikler, og pH-værdien måles.
34. For at reducere indholdet af uorganisk kulstof tilføres filtreret CO₂-fri luft (»såkaldt sparging«) (afsnit 15, litra e)), i 1 time, mens pH-værdien holdes på 6,5 ved hjælp af orthophosphorsyre (afsnit 20). pH-værdien genoprettes til den oprindelige værdi ved hjælp af natriumhydroxid (afsnit 21), og efter bundfældning i ca. 1 time udtages en passende mængde supernatant til inokulering. Denne »sparging« reducerer indholdet af uorganisk kulstof i inokulum. Når den anbefalede maksimumsmængde af filtreret »sparget« udløb (100 ml) pr. liter blev anvendt som inokulum, var mængden af uorganisk kulstof i blindkontrollerne i intervallet 0,4 til 1,3 mg/l (14), hvilket repræsenterede 2-6,5 % af testkemikaliet C ved 20 mg C/l og 4-13 % ved 10 mg C/l.

Overfladevand

35. En prøve udtages af egnet overfladevand. Den opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Prøven koncentrerer om nødvendigt ved filtrering eller centrifugering. Den mængde inokulum, der skal anvendes i hver testbeholder, skal opfylde kriterierne i afsnit 26.

Jord

36. En prøve udtages af egnet jord i en dybde på op til 20 cm under jordoverfladen. Sten, planterester og hvirvelløse dyr fjernes fra jordprøven, inden den sigtes gennem et 2 mm net (hvis prøven er for våd til sigtning, lufttørres den inden sigtning). Den opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Hvis prøven transporteres i en løst bundet sort plastpose, kan den opbevares i posen ved 2-4 °C i op til en måned).

Prækonditionering af inokulum

37. Inokulum kan prækonditioneres til forsøgsbetingelserne, men må ikke tilvænnenes til testkemikaliet. Prækonditionering kan reducere den blinde CO₂-udvikling. Prækonditioneringen består i beluftning af aktiveret slam efter fortynding i testmediet til 30 mg/l med fugtig CO₂-fri luft i op til 5-7 dage ved testtemperatur.

TESTPROCEDURE

Antal flasker

38. Det antal flasker (afsnit 15, litra a)), der skal bruges til en test, afhænger af analysehyppigheden og testvarigheden.
39. Det anbefales, at et tredobbelt antal flasker analyseres efter et tilstrækkeligt antal tidsintervaller, således at 10-dages-vinduet kan påvises. Mindst fem testflasker (afsnit 15, litra a)) fra sæt a), b) og c) (se afsnit 42) analyseres ved testens afslutning for at gøre det muligt at beregne 95 %-konfidensintervallet for den gennemsnitlige bionedbrydning i procent.

Medium med inokulum

40. Inokulum bruges ved en koncentration på 4 mg/l aktiveret slam med faststoffer. Umiddelbart inden anvendelse fremstilles en tilstrækkelig mængde inokuleret medium ved f.eks. at tilsætte 2 ml korrekt behandlet aktiveret slam (afsnit 27-32) ved 2 000 mg/l til 1 liter medium med mineralsalte (afsnit 19). Når sekundært spildevandsudløb bruges, tilsættes op til 100 ml udløb (afsnit 33) til 900 ml medium med mineralsalte (afsnit 19), som fortyndes til 1 liter med medium.

Klargøring af flasker

41. Prøver af inokuleret medium dispenseres til replikatflasker, så der fås et forhold mellem headspace og væske på 1:2 (tilsæt f.eks. 107 ml til flasker med en kapacitet på 160 ml). Andre forhold kan anvendes, men se advarslen i afsnit 11. Uanset den anvendte type inokulum skal det sikres, at det inokulerede medium blandes tilstrækkeligt, så det fordeles ensartet til testflaskerne.
42. Sæt af flasker (afsnit 15, litra a)) klargøres til at indeholde følgende:
- a) testbeholdere (benævnt som F_T), som indeholder testkemikaliet
 - b) blindkontroller (benævnt F_B), som kun indeholder testmediet plus inokulum; evt. kemikalier, opløsningsmidler, stoffer eller glasfiberfiltre, der anvendes til at tilsætte testkemikaliet til testbeholderen, skal også tilsættes
 - c) beholdere (benævnt F_C) med referencekemikaliet til at kontrollere fremgangsmåden
 - d) om nødvendigt beholdere (benævnt F_I) til at kontrollere, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes både test- og referencekemikalie ved samme koncentration (afsnit 24) som i de andre flasker (henholdsvis F_T og F_C)
 - e) beholdere (benævnt F_S) til at kontrollere evt. abiotisk nedbrydning som a) plus 50 mg/l HgCl_2 eller steriliseret på anden måde (f.eks. ved autoklavering).
43. Vandopløselige testkemikalier og referencekemikalier tilsættes som vandige stamopløsninger (afsnit 22, 23 og 24), så der fås en koncentration på 10 til 20 mg C/l.
44. Uopløselige testkemikalier og uopløselige referencekemikalier hældes på flasker på forskellige måder (se afsnit 22, litra a-e)) afhængigt af kemikaliet karakter enten før eller efter tilsætningen af mediet med inokulum og afhængigt af metoden til behandling af testkemikaliet. Hvis en af de fremgangsmåder, der er beskrevet i afsnit 22, litra a-e), anvendes, behandles blindkontrollerne F_B (afsnit 42, litra b)) på en lignende måde, men uden at tilsætte testkemikaliet eller referencekemikaliet.
45. Flygtige testkemikaliet injiceres i lukkede flasker (afsnit 47) ved brug af en mikrosprøjte. Dosis beregnes ud fra det injicerede volumen og testkemikaliet densitet.
46. Vand tilsættes beholdere efter behov for at opnå samme væskevolumen i hver beholder. Det skal sikres, at forholdet mellem headspace og væskevolumen (normalt 1:2) og koncentrationen af testkemikaliet er af en sådan karakter, at der er ilt nok til stede til at muliggøre fuldstændig bionedbrydning.
47. Alle flasker lukkes derefter med f.eks. propper af butylgummi og aluminiumskapsler. Flygtige testkemikalier tilsættes på dette trin (afsnit 45). Hvis reduktionen i testopløsningens DOC-koncentration skal overvåges, og der skal udføres analyser fra nultid af den indledende koncentration af uorganisk kulstof (sterile kontroller, afsnit 42, litra e)) eller andre determinanter, udtages en passende prøve fra testbeholderen. Derefter kasseres testbeholderen med indhold.
48. De lukkede flasker anbringes på en orbitalryster (afsnit 15, litra d)), og der anvendes en rystehastighed, så flaskens indhold forbliver velblandet og suspenderet (f.eks. 150-200 rpm). Flaskernes inkuberes i mørke ved 20 °C (± 1 °C).

Prøvetagning

49. Prøvetagningsmønsteret afhænger af lag-perioden og den kinetiske hastighed af testkemikaliet bionedbrydning. Flasker bruges til analyse på dagen for prøvetagning, som skal ske mindst ugentligt eller hyppigere (f.eks. to gange om ugen), hvis der kræves en fyldestgørende kurve for nedbrydning. Det krævede antal replikatflasker, herunder F_T , F_B og F_C samt evt. F_I og F_S (se afsnit 42), udtages fra rysteren. Testen forløber normalt over 28 dage. Hvis kurven for bionedbrydning indicerer, at der er opnået et plateau inden dag 28, kan testen afsluttes tidligere end efter 28 dage. Udtag prøver fra de fem flasker, der er reserveret til testens 28. dag, til analyse, og anvend resultaterne til at beregne konfidensintervallet eller variationskoefficienten for den procentvise bionedbrydning. Der skal ikke tages prøver af flasker, der anvendes til test for hæmning og abiotisk nedbrydning, så ofte som af de øvrige flasker. Dag 1 og dag 28 er nok.

Analyse af uorganisk kulstof

50. CO₂-produktionen i flasker bestemmes ved at måle stigningen i koncentrationen af uorganisk kulstof under inkubering. Der findes to anbefalede metoder til måling af den mængde uorganisk kulstof, der produceres i løbet af testen, og de er beskrevet nedenfor. Da metoderne kan give lidt forskellige resultater, bør den samme metode anvendes i hele testforløbet.
51. Metode a) anbefales, hvis mediet sandsynligvis indeholder rester af f.eks. glasfilterpapir og/eller uopløseligt testkemikalie. Denne analyse kan udføres ved hjælp af en gaskromatograf, hvis en kulstofanalysator ikke er til rådighed. Det er vigtigt, at flaskerne er ved eller tæt på testtemperaturen, når headspace-gassen analyseres. Metode b) kan være nemmere at anvende for laboratorier, der bruger en kulstofanalysator til at måle uorganisk kulstof. Det er vigtigt, at den natriumhydroxidopløsning (afsnit 21), der bruges til at omdanne CO₂ til karbonat, er friskfremstillet, eller at dens indhold af uorganisk kulstof er kendt, således at den kan tages i betragtning ved beregningen af testresultaterne (se afsnit 66, litra b)).

Metode a): forsuring til pH < 3

52. Inden hver analyseserie kalibreres kulstofanalysatoren ved hjælp af en hensigtsmæssig standard for uorganisk kulstof (f.eks. 1 % w/w CO₂ i N₂). Koncentreret orthophosphorsyre (afsnit 20) injiceres i låget på hver udtaget flaske for at reducere pH i mediet til < 3 (tilsæt f.eks. 1 ml til 107 ml testmedium). Flaskerne sættes tilbage på rysteren. Efter 1 times rysten ved testtemperaturen tages flaskerne af rysteren. Aliquoter (f.eks. 1 ml) af gas udtages fra headspace på hver flaske og overføres til kulstofanalysatoren. De målte koncentrationer af uorganisk kulstof registreres som mg C/l.
53. Efter forsuring til pH < 3 og ækvilibrering ved 20 °C er ligevægtskonstanten for fordelingen af CO₂ mellem væske- og gasfasen i testflaskerne ved denne metode 1,0, når den måles som en koncentration (13). Dette påvises mindst én gang for et testsystem på følgende måde:

Klargør flasker med 5 og 10 mg/l som inaktivt kulstof ved hjælp af en opløsning af vandfrit natriumcarbonat (Na₂CO₃) i CO₂-frit vand klargjort ved forsuring af vand til pH 6,5 med koncentreret orthophosphorsyre (afsnit 20), sparging natten over med CO₂-fri luft og forøgelse af pH til neutralitet med alkali. Sørg for, at forholdet mellem headspace og væskevolumen er det samme som i testene (f.eks. 1:2). Foretag forsuring og ækvilibrering som beskrevet i afsnit 52, og mål koncentrationerne af uorganisk kulstof i både headspace- og væskefasen. Kontroller, at de to koncentrationer er ens inden for margenen for forsøgsfejl. Hvis ikke, gennemgås fremgangsmåderne. Det er ikke nødvendigt at udføre denne kontrol af fordelingen af uorganisk kulstof mellem væske- og gasfasen, hver gang testen udføres. Den bør udføres i forbindelse med kalibreringen.

54. Hvis DOC-eliminering skal måles (kun vandopløselige testkemikalier), udtages prøver af væskefasen fra separate (ikke-forsurede) flasker. De filtreres gennem en membran og overføres til DOC-analysatoren. Disse flasker kan efter behov anvendes til andre analyser for at måle den primære bionedbrydning.

Metode b): omdannelse af CO₂ til karbonat

55. Inden hver analyseserie kalibreres kulstofanalysatoren ved hjælp af en hensigtsmæssig standard for uorganisk kulstof, f.eks. en opløsning af natriumbicarbonat (NaHCO₃) i CO₂-frit vand (se afsnit 53) i intervallet 0 til 20 mg/l som uorganisk kulstof. 7 M natriumhydroxidopløsning (afsnit 21) (f.eks. 1 ml til 107 ml medium) injiceres i låget på hver udtaget flaske, og flaskerne rystes i 1 time ved testtemperatur. Brug den samme NaOH-opløsning til alle flasker, der bruges på en bestemt dag, men ikke nødvendigvis til alle prøvetagninger i løbet af en test. Hvis der kræves absolutte blindværdier for uorganisk kulstof ved alle prøvetagninger, skal uorganisk kulstof i NaOH-opløsningen bestemmes, hver gang den anvendes. Flaskerne tages af rysteren og henstilles til bundfældning. Passende mængder (f.eks. 50 til 1 000 µl) af væskefasen i hver flaske udtages ved hjælp af en sprøjte. Prøverne overføres til kulstofanalysatoren, og koncentrationerne af uorganisk kulstof registreres. Det skal sikres, at analysatoren er udstyret til at håndtere alkaliske prøver, der er fremstillet ved hjælp af denne metode.
56. Efter tilsætning af alkali og omrysten er koncentrationen af uorganisk kulstof ved denne metode ubetydelig. For testsystemet bør dette kontrolleres mindst én gang ved hjælp af standarder for uorganisk kulstof, tilsætning af alkali og ækvilibrering samt måling af koncentrationen af uorganisk kulstof i både headspace- og væskefasen (se afsnit 53). Koncentrationen i headspace skal være nær nul. Det er ikke nødvendigt at udføre denne kontrol af næsten fuldstændig absorption af CO₂, hver gang testen udføres.
57. Hvis DOC-eliminering skal måles (kun vandopløselige testkemikalier), udtages prøver af væskefasen fra separate flasker (uden tilsat alkali). De filtreres gennem en membran og overføres til DOC-analysatoren. Disse flasker kan efter behov anvendes til andre analyser for at måle den primære bionedbrydning.

DATA OG RAPPORTERING

Beregning af resultater

58. Hvis 100 % mineralisering af testkemikaliet til CO₂ antages, er den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof (ThIC) ud over det, der produceres i blindkontrollerne, lig med det opløste organiske kulstof (TOC), der tilsættes hver flaske ved begyndelsen af testen, dvs.:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}$$

Den samlede masse (mg) af uorganisk kulstof (TIC) i hver flaske er:

$$\text{TIC} = (\text{mg C i væske} + \text{mg C i headspace}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Ligning [1]}$$

hvor:

V_L = volumen af væske i flasken (liter)

C_L = koncentration af organisk kulstof i væske (mg/l som kulstof)

V_H = volumen af headspace (liter)

C_H = koncentration af organisk kulstof i headspace (mg/l som kulstof).

Beregningerne af TIC til de to analysemetoder, der anvendes til måling af uorganisk kulstof i denne test, er beskrevet nedenfor i afsnit 60 og 61. Den procentvise bionedbrydning (%D) fås i hvert tilfælde ved:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{Ligning [2]}$$

hvor:

TIC_t = mg TIC i testflaske på tidspunktet t

TIC_b = gennemsnitlig mg TIC i blindflasker på tidspunktet t

TOC = mg TOC indledningsvis tilsat testbeholderen.

Den procentvise bionedbrydning %D beregnes for testflasken (F_T), referenceflasken (F_C) og evt. flasken til kontrol for hæmning (F_I) ud fra de respektive mængder TIC, der er produceret indtil prøvetagningstidspunktet.

59. Hvis der er sket en signifikant stigning i TIC-indholdet i de sterile kontroller (F_S) i løbet af testperioden, kan det konkluderes, at der er sket abiotisk nedbrydning af testkemikaliet, og at dette skal tages i betragtning i beregningen af D i ligning [2].

Forsuring til pH < 3

60. Eftersom forsuring til pH < 3 og ækvilibrering fører til udligning af koncentrationen af TIC i væske- og gasfasen, skal kun koncentrationen af organisk kulstof måles i gasfasen. I henhold til ligning [1] $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, hvor V_B = volumen i serumflaske.

Omdannelse af CO₂ til karbonat

61. I forbindelse med denne metode udføres beregningerne som i ligning [1], men den ubetydelige mængde af uorganisk kulstof i gasfasen ignoreres, dvs. $V_H \times C_H = 0$, og $TIC = V_L \times C_L$.

Angivelse af resultater

62. En bionedbrydningskurve fås ved at afsætte den procentvise bionedbrydning, D , i forhold til inkubationstiden. Hvis det er muligt, angives lag-fasen, bionedbrydningsfasen, 10-dages-vinduet og plateau-fasen, dvs. den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig. Hvis sammenlignelige resultater opnås for parallelle testflasker F_T (forskel på $< 20\%$), afsættes en gennemsnitlig kurve (se tillæg 2, figur 1); hvis ikke, afsættes kurver for hver flaske. Gennemsnitsværdien for den procentvise bionedbrydning i plateau-fasen bestemmes, eller den højeste værdi vurderes (f.eks. når kurven falder i plateaufasen), men det er i sidstnævnte tilfælde vigtigt at kontrollere, at værdien ikke er en ekstrem værdi. Dette maksimale niveau af bionedbrydning angives som »graden af bionedbrydningen af testkemikaliets« i testrapporten. Hvis antallet af testbeholdere var utilstrækkeligt til at indicere en plateaufase, anvendes de data, der er målt for den sidste testdag, til at beregne en gennemsnitlig værdi. Denne sidste værdi, gennemsnittet af fem replikater, bruges til at indicere den præcision, hvormed den procentvise bionedbrydning er bestemt. Endvidere rapporteres den værdi, der blev indhentet ved afslutningen af 10-dages-vinduet.
63. På samme måde afsættes der en kurve for referencekemikaliets, F_C , samt kontrollen for abiotisk eliminering, F_S , og kontrollen for hæmning, F_I , hvis de er medtaget.
64. De mængder af TIC, der er til stede i blindkontrollerne (F_B), registreres, og det samme gælder mængderne i F_S -flaskerne (abiotisk kontrol), hvis de er medtaget i testen.
65. Beregn D for F_T -flaskerne baseret på den teoretiske værdi for uorganisk kulstof, der fås fra blandingens referencekomponent alene. Hvis $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25\%$ på dag 28, kan det antages, at testkemikaliets har hæmmet aktiviteten for inokulum, og at de lave værdier for D_{FI} , der blev opnået under testbetingelserne, kan tilskrives dette. I dette tilfælde gentages testen ved hjælp af en lavere testkoncentration og helst med reduktion af DIC i inokulum og TIC dannet i blindprøverne, da den lavere koncentration ellers vil reducere metodens præcision. Ellers kan der anvendes et andet inokulum. Hvis der i flasken F_S (abiotisk) observeres en signifikant stigning ($> 10\%$) i mængden af TIC, kan abiotiske nedbrydningsprocesser være opstået.

Resultaternes validitet

66. En test anses for gyldig, hvis:
- a) den gennemsnitlige procentvise nedbrydning i F_C -flasker, som indeholder referencekemikaliets, er $> 60\%$ på den 14. inkubationsdag, og
 - b) den gennemsnitlige mængde af TIC i blindkontrollerne F_B ved slutningen af testen er > 3 mg C/l.

Hvis disse grænser ikke overholdes, gentages testen med et inokulum fra en anden kilde, og/eller de anvendte fremgangsmåder kontrolleres. Hvis f.eks. en høj blindproduktion af uorganisk kulstof er et problem, følges fremgangsmåden i afsnit 27-32.

67. Hvis testkemikaliets ikke når op på 60% ThIC, og det er påvist, at det ikke er hæmmende (afsnit 65), kan testen gentages med en højere inokulumkoncentration (op til 30 mg/l aktiveret slam og 100 ml udløb/l) eller inokulum fra andre kilder, navnlig hvis nedbrydning var i intervallet 20 - 60% .

Fortolkning af resultater

68. Bionedbrydning $> 60\%$ ThIC inden for 10-dages-vinduet i denne test viser, at testkemikaliets er let bionedbrydeligt under aerobe betingelser.
69. Hvis pass-værdien på 60% ThIC ikke opnås, bestemmes pH-værdien i medier i flasker, der ikke er blevet forsuret eller alkaliske. En værdi på mindre end $6,5$ kunne indicere, at nitrificering er forekommet. I det tilfælde gentages testen med en bufferopløsning med en højere koncentration.

⁽¹⁾ Den procentvise nedbrydning i F_C -flasker med referencestoffet.

⁽²⁾ Den procentvise nedbrydning i F_I -flasker.

Testrapport

70. Opstil en tabel over % D for hver testflaske (F_T), referenceflaske (F_C) og evt. flaske til kontrol for hæmning (F_I) for hver prøvetagningsdag. Hvis sammenlignelige resultater opnås for replikatflasker, afsættes en kurve over gennemsnitlig % D i forhold til tid. Registrer mængden af TIC i blindflasker (F_B) og i de sterile kontrolflasker (F_S) samt DOC og/eller andre determinanter og deres procentvise eliminering.
71. Bestem gennemsnitsværdien for % D i plateaufasen, eller anvend den højeste værdi, hvis kurven for bionedbrydning falder i plateaufasen, og rapporter dette som »graden af bionedbrydningen af testkemikaliet«. I sidstnævnte tilfælde er det vigtigt at kontrollere, at værdien ikke er en ekstrem værdi.
72. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel og relevante fysisk-kemiske egenskaber
- renhed (urenheder) af teststoffet.

Testbetingelser:

- reference til denne testmetode
- beskrivelse af det anvendte testsystem (f.eks. beholderens volumen, forhold mellem headspace og væske, omrøringsmetode osv.)
- tilførsel af testkemikaliet og referencekemikaliet til testsystemet: anvendt testkoncentration, mængde af kulstof tilsat hver testflaske og anvendte opløsningsmidler
- detaljer om det anvendte inokulum, evt. forbehandling og prækonditionering
- inkubationstemperatur
- validering af princippet for analyse af uorganisk kulstof
- primære karakteristika for den anvendte kulstofanalysator (og andre anvendte analysemetoder)
- antal replikater.

Resultater:

- rådata og beregnede værdier for bionedbrydelighed opstillet i tabelform
- afbildning af den procentvise nedbrydning i forhold til tid for test- og referencekemikalier med angivelse af lag-periode, nedbrydningsfase, 10-dages-vindue og hældning
- procentvis eliminering ved plateau, ved testens afslutning og efter 10-dages-vinduet
- årsager til evt. afvisning af testresultaterne
- andre fakta, der er relevante for den anvendte fremgangsmåde
- diskussion af resultater.

LITTERATUR:

- (1) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed — CO₂-udvikling (metode C.4-C).
- (2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A., Oil Chem Soc. 50: 159-167.
- (3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.
- (4) Larson RJ, Hansmann MA og Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; revideret 1999). Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm).
- (6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.
- (9) Weytjens D, Van Ginneken I og Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.
- (10) Ennis DM og Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.
- (11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzocchi PH og Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.
- (12) Boatman RJ, Cunningham SL og Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.
- (13) Struijs J og Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.
- (14) Birch RR og Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.
- (15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, og Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.
- (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 (CO₂ headspace test).
- (17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO₂ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR og Starkey M (1999). An »inherent« biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

-
- (20) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.
- (21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) og Final report (M. Kitano og M. Takatsuki; CITI). Paris.
- (22) Kapitel C.11 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest.
- (23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ og Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.
- (24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, Det Forenede Kongerige.
- (25) ISO 10634 (1996) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
-

Tillæg 1

FORKORTELSER OG DEFINITIONER

IC: uorganisk kulstof.

ThCO₂: teoretisk kuldioxid (mg) er den mængde kuldioxid, der ifølge beregninger på grundlag af testkemikaliets kendte eller målte kulstofindhold skulle dannes ved fuldstændig nedbrydning af testkemikaliets; den udtrykkes også i mg udviklet kuldioxid pr. mg testkemikalie.

DOC: opløst organisk kulstof er den mængde organisk kulstof, der er til stede i opløsning, passerer gennem et 0,45 µm filter eller forbliver i centrifugatet efter centrifugering ved 4 000 g (ca. 40 000 ms⁻²) i 15 minutter.

DIC: opløst uorganisk kulstof.

ThIC: teoretisk uorganisk kulstof.

TIC: totalt uorganisk kulstof.

Let bionedbrydelig: en arbitrær klasse af kemikalier, der har bestået visse specifikke screeningstest for fuldstændig bionedbrydning; disse test er så krævende, at sådanne kemikalier i vandigt miljø under aerobe forhold hurtigt vil blive fuldstændigt nedbrudt.

10-dages-vindue: den periode på 10 dage, der begynder, når nedbrydningen er nået op på 10 %.

Iboende bionedbrydelighed: en klasse af kemikalier, som ved enhver bionedbrydelighedstest klart har vist sig at kunne omdannes ved bionedbrydning (primær eller fuldstændig).

Endelig aerob bionedbrydning: den nedbrydningsgrad, der er nået, når mikroorganismer har opbrugt et testkemikalie fuldstændigt under samtidig dannelse af kuldioxid, vand, mineralsalte og nye cellebestanddele (biomasse).

Mineralisering: fuldstændig nedbrydning af en organisk forbindelse til CO₂ og H₂O under aerobe betingelser, og til CH₄, CO₂ og H₂O under anaerobe betingelser.

Lag-fase: den tid, der går fra et forsøg begynder, indtil de nedbrydende mikroorganismer har tilpasset sig, og nedbrydningsgraden for et testkemikalie eller organisk materiale har nået et detekterbart omfang (f.eks. 10 % af den teoretiske maksimale bionedbrydning, evt. mindre, afhængigt af måleteknikkens nøjagtighed).

Nedbrydningsfase: tidsrummet mellem lag-periodens afslutning og det tidspunkt, hvor nedbrydningen har nået 90 % af sin maksimale værdi.

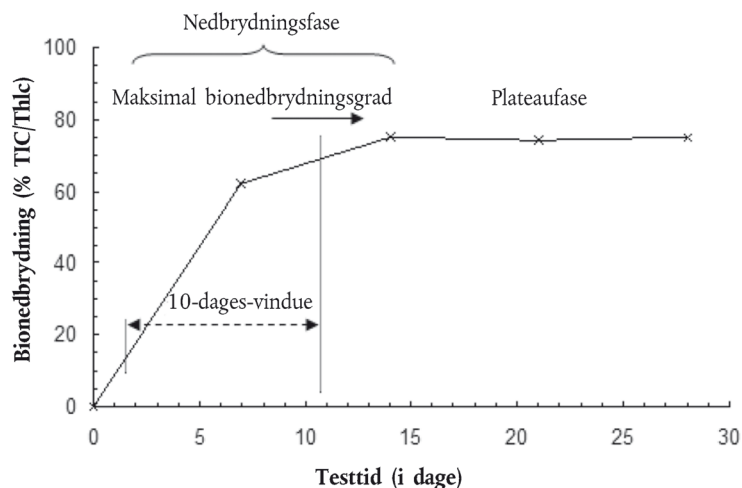
Plateaufase: den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig.

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Eksempel på kurve for bionedbrydning

Figur 1

Bionedbrydning af 1-octanol i test af CO₂ i headspace

Ordliste

Bionedbrydning

Nedbrydningsfase

Maksimal bionedbrydningsgrad

Plateaufase

10-dages-vindue

Testtid (i dage)

C.30. BIOAKKUMULERING I TERRESTRISKE OLIGOCHAETER

INDLEDNING

- Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 317 (2010). Blandt testmetoderne vedrørende skæbne i miljøet blev Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk (kapitel C.13 i dette bilag (49)) og Bioakkumulering i bentiske oligochaeter, der lever i sediment (53), offentliggjort i henholdsvis 1996 og 2008. Ekstrapoleringen af data om akvatisk bioakkumulering til landorganismer, som f.eks. regnorm, er vanskelig, hvis overhovedet mulig. Modelberegninger baseret på et testkemikalies lipofile karakter, f.eks. (14) (37), anvendes i dag til at vurdere bioakkumulering af kemikalier i jord, som f.eks. EU's Technical Guidance Document (19). Behovet for en rumspecifik testmetode er allerede blevet imødekommet, f.eks. (55). En sådan metode er især vigtig for evalueringen af sekundær forgiftning i landbaserede fødekæder (4). Flere nationale testmetoder omhandler spørgsmålet om bioakkumulering i andre organismer end fisk, f.eks. (2) og (72). En metode vedrørende måling af bioakkumulering fra forurenede jord i regnorm (*Eisenia fetida*, Savigny) og kompostorm er udviklet af American Society for Testing and Materials (3). En internationalt anerkendt metode til bestemmelse af bioakkumulering i forurenede jord vil forbedre risikovurderingen af kemikalier i terrestriske økosystemer, f.eks. (25) (29).
- Invertebrater, der lever af jord, eksponeres for jordbundne kemikalier. Blandt disse dyr spiller terrestriske oligochaeter en vigtig rolle for jordbundens struktur og funktion (15) (20). Terrestriske oligochaeter lever i jord og delvist på jordoverfladen (især i strølaget). De repræsenterer i mange tilfælde den mest rigelige art med hensyn til biomasse (54). Ved bioturbation af jorden og som byttedyr kan disse dyr have en stærk indvirkning på biotilgængeligheden af kemikalier for andre organismer, herunder invertebrater (såsom rovmider og biller; f.eks. (64)) eller vertebrate rovdyr (såsom ræve og måger) (18) (62). Nogle arter af terrestriske oligochaeter, som i øjeblikket anvendes i forbindelse med økotoxikologiske test, er beskrevet i tillæg 5.

3. ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) indeholder mange vigtige og nyttige oplysninger om udførelsen af denne testmetode vedrørende bioakkumulering i jord. Yderligere dokumenter, der henvises til i denne testmetode, er kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømnings-test med fisk (49) og OECD TG 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes (53). Praktisk erfaring med forsøg vedrørende bioakkumulering i jord og publikationer, f.eks. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) og (79), er andre vigtige kilder til oplysninger i forbindelse med denne testmetode.
4. Denne testmetode gælder primært for stabile, neutrale organiske kemikalier, der ofte adsorberes til jord. Test for bioakkumulering af jordtilknyttede, stabile organiske metalforbindelser kan også udføres ved hjælp af denne testmetode. Den kan også anvendes i forbindelse med metaller og andre sporstoffer.

FORUDSÆTNINGER

5. Test, der har til formål at måle bioakkumuleringen af et kemikalie i terrestriske oligochaeter, er udført med tungmetaller (se f.eks. (63)) og persistente, organiske kemikalier med $\log K_{ow}$ -værdier mellem 3,0 og 6,0, f.eks. (40). Sådanne test kan også udføres i forbindelse med:
 - kemikalier, der har en $\log K_{ow}$ på mere end 6,0 (super-hydrofobe kemikalier)
 - kemikalier, der tilhører en klasse af organiske kemikalier, der vides at have potentialet til at bioakkumuleres i levende organismer, f.eks. overfladeaktive kemikalier eller kemikalier med høj adsorptionsevne
 - kemikalier, hvis strukturelle karakteristika indikerer et potentiale for bioakkumulering, f.eks. analoger til kemikalier med kendt bioakkumuleringspotentiale, og
 - metaller.
6. Oplysninger om testkemikalien, f.eks. generisk navn, kemisk navn (fortrinsvis IUPAC-navn), strukturformel, CAS-nummer, renhed, sikkerhedsforanstaltninger, korrekt opbevaring og analysemetoder, indhentes, inden forsøget påbegyndes. Derudover skal følgende oplysninger foreligge:
 - a) opløselighed i vand
 - b) oktanol/vandfordelingskoefficient, K_{ow}
 - c) jord/vandfordelingskoefficient, K_{oc}
 - d) damptryk
 - e) nedbrydelighed (f.eks. i jord eller vand)
 - f) kendte metabolitter.
7. Der kan anvendes testkemikalier med og uden radioaktiv mærkning. Af hensyn til analysen anbefales det dog at bruge et radioaktivt mærket testkemikalie. Denne beslutning træffes ud fra detektionsgrænserne eller et krav om at måle et oprindeligt testkemikalie og metabolitter. Hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes, og den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles, er det vigtigt, at det radioaktive restmateriale i både jorden og testorganismene karakteriseres med hensyn til procentdele af oprindeligt testkemikalie og mærkede ikke-oprindelige kemikalier, f.eks. i prøver udtaget ved steady state eller ved slutningen af optagelsesfasen, således at en bioakkumuleringsfaktor (BAF) kan beregnes for det oprindelige testkemikalie og de undersøgte jordmetabolitter (se afsnit 50). Den metode, der beskrives her, skal evt. tilpasses, f.eks. for at opnå tilstrækkelig biomasse, ved måling af organiske testkemikalier eller metaller, der ikke er radioaktivt mærkede. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles (ved hjælp af væskescintillationstælling efter ekstraktion, forbrænding eller opløsning af væv), baseres bioakkumuleringsfaktoren på det oprindelige testkemikalie og metabolitter. BAF-beregningen bør baseres på koncentrationen af det oprindelige testkemikalie i organismene og den samlede mængde radioaktivt restmateriale. Efterfølgende beregnes biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF), normaliseret til fedtindholdet i orm og det organiske kulstofindhold i jord, ud fra BAF for at kunne sammenligne resultaterne mellem forskellige bioakkumuleringstest.

8. Testkemikaliet toksicitet for de arter, der anvendes i testen, skal være kendt, f.eks. en effektkoncentration (EC_x) eller letal koncentration (LC_x) på tidspunktet for optagelsesfasen (f.eks. (19)). Den valgte koncentration af testkemikaliet bør være ca. 1 % af den akutte asymptotiske LC₅₀ og mindst 10 gange højere end detektionsgrænsen i jord ved den anvendte analysemetode. Der anvendes fortrinsvis toksicitetsværdier fra langvarige forsøg vedrørende subletale effektparametre (51) (52), hvis de foreligger. Hvis sådanne data ikke er tilgængelige, vil en akut toksicitetstest give nyttige oplysninger (se f.eks. (23)).
9. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og sensitivitet til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsninger, jord og biologisk materiale, oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares, samt sikkerhedsdatablade for materialer. Oplysninger om analytiske detektionsgrænser for testkemikaliet i jord og ormevæv skal også foreligge. Hvis der bruges et ¹⁴C-mærket testkemikalie, skal den specifikke radioaktivitet (dvs. Bq mol⁻¹) og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, være kendt. Testkemikaliet specifikke radioaktivitet skal være høj nok til at muliggøre analyse, og de anvendte testkoncentrationer må ikke fremkalde toksiske virkninger.
10. Testen kan udføres med syntetisk eller naturlig jord. Oplysninger om karakteristika for den anvendte naturlige jord, f.eks. jordens oprindelse eller bestanddele, pH, organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og vandbindingsevne (WHC), skal foreligge, inden testen påbegyndes (3) (48).

TESTENS PRINCIP

11. De parametre, der karakteriserer bioakkumuleringen af et testkemikalie, omfatter bioakkumuleringsfaktoren (BAF), hastighedskonstanten for optagelse (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e). Definitioner findes i tillæg 1.
12. Testen omfatter to faser: optagelsesfasen (eksponering) og elimineringsfasen (efter-eksponering). I optagelsesfasen eksponeres replikate grupper af orme for jord, der er »spiked« (foruren) med testkemikaliet. Ud over testorganismene holdes grupper af kontrolorme under identiske betingelser, men uden testkemikaliet. Testorganismernes tørvægt og fedtindhold måles. Dette kan gøres ved hjælp af orme i kontrolgruppen. Analytiske baggrundsværdier (blinde) kan fås ved at analysere prøver af kontrolorme og jord. Ved elimineringsfasen overføres ormene til jord uden testkemikaliet. Der kræves altid en elimineringsfase, medmindre optagelsen af testkemikaliet i eksponeringsfasen har været ubetydelig. En elimineringsfase giver oplysninger om den hastighed, hvormed testkemikaliet udskilles af testorganismene (f.eks. (27)). Hvis der ikke opnås steady state i optagelsesfasen, baseres bestemmelsen af de kinetiske parametre — kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAF_k), hastighedskonstanter for optagelse og eliminering — fortrinsvis på samtidig tilpasning af resultaterne af optagelses- og elimineringsfaserne. Koncentrationen af testkemikaliet i/på ormene overvåges i løbet af begge faser i testen.
13. I løbet af optagelsesfasen foretages målinger på prøvetagningstidspunkter i op til 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), indtil steady state er opnået (11) (12) (67). Steady state opnås, når en kurve over koncentrationen i orme i forhold til tid bliver parallel med tidsaksen, og tre på hinanden følgende koncentrationsanalyser af prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden baseret på statistiske sammenligninger (f.eks. variansanalyse og regressionsanalyse).
14. I elimineringsfasen overføres testorganismene til beholdere med samme substrat, men uden testkemikaliet. I løbet af elimineringsfasen foretages målinger på prøvetagningstidspunkter i 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), medmindre tidligere analytisk bestemmelse har påvist en reduktion af reststoffer af testkemikaliet i orme på 90 %. Koncentrationen af testkemikaliet i ormene ved slutningen af elimineringsfasen rapporteres som ikke-eliminerede reststoffer. Steady state-bioakkumuleringsfaktoren (BAF_{ss}) beregnes så vidt muligt både som forholdet mellem koncentrationen i orme (Ca) og i jorden (Cs) ved steady state og som en kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAF_k), som forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra jord (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e) (definitioner findes i tillæg 1), idet kinetikken antages at være af første orden (beregninger findes i tillæg 2). Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, anvendes andre modeller.
15. Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for eliminering (eller konstanterne, hvis andre modeller anvendes), den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAF_k) og så vidt muligt konfidensgrænserne for hver af disse parametre beregnes ud fra computerbaserede modelligninger (se vejledning i tillæg 2). En models tilpasningsgrad kan bestemmes ud fra f.eks. korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter tæt på én indikerer god tilpasning), eller den kan beregnes ved hjælp af chi i anden. Størrelsen af standardfejl eller konfidensinterval omkring de estimerede parametre kan også indicere modellens tilpasningsgrad.
16. For at reducere variabiliteten i testresultater for stærkt lipofile testkemikalier udtrykkes bioakkumuleringsfaktorer i forhold til fedtindholdet og det organiske kulstofindhold (kg organisk kulstof i jord/kg-fedt i 1 orme). Denne tilgang er baseret på den kendsgerning, at der for nogle kemiske stofgrupper er en tydelig sammenhæng mellem kemikaliernes bioakkumuleringspotentiale og deres lipofile karakter. Dette er veldokumenteret for fisk (47). Der

er en sammenhæng mellem fiskenes fedtindhold og sådanne kemikaliers bioakkumulering. For benthiske organismer er der konstateret lignende korrelationer, f.eks. (30) (44). For terrestriske oligochaeter er denne korrelation også påvist, f.eks. (5) (6) (7) (14). Hvis tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, kan testorganismernes fedtindhold bestemmes på det samme biologiske materiale som det, der benyttes til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliets. Alternativt kan fedtindholdet måles på kontroldyr.

TESTENS VALIDITET

17. Hvis en test skal være gyldig, skal følgende kriterier opfyldes af både kontroller og behandlingsprøver:

— Ved slutningen af testen må den samlede mortalitet i optagelses- og elimineringsfasen ikke overstige 10 % (regnorm) eller 20 % (enchytraeider) af det samlede antal tilførte orm.

— For *Eisenia fetida* og *Eisenia andrei* må det gennemsnitlige tab målt ved slutningen af optagelsesfasen og slutningen af elimineringsfasen ikke overstige 20 % sammenlignet med den indledende frisk vægt ved begyndelsen af hver fase.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forsøgsarter

18. Der anbefales flere arter af terrestriske oligochaeter til test af bioakkumulering. De oftest anvendte arter, *Eisenia fetida* eller *Eisenia andrei* (Lumbricidae), *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* eller *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae), er beskrevet i tillæg 5.

Apparatur

19. Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, som kan opløses, adsorbere testkemikaliets eller afgive andre kemikalier og have en skadelig virkning på testorganismene. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardbeholdere af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af forsøgsorm. Udstyr, der kommer i kontakt med testmedierne, kan være fremstillet af rustfrit stål, plast eller glas. Testbeholderne skal overdækkes for at forhindre, at ormene slipper ud, men der skal være tilstrækkelig luftforsyning. For kemikalier med høj adsorptionskoefficient, såsom syntetiske pyrethroider, kan det være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde skal udstyret kasseres efter brug (49). Udslip af radioaktivt mærkede testkemikalier og flygtige kemikalier skal forhindres. Udskillere (f.eks. gasvaskeflasker i glas) med egnede absorbenter anvendes til at tilbageholde reststoffer, der fordamper fra testbeholderne.

Jord

20. Testjord skal være af en sådan kvalitet, at testorganismene kan overleve og helst forplante sig i akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Ormene skal kunne grave sig ned i jorden.

21. Det anbefales at bruge den syntetiske jord, der er beskrevet i kapitel C.8 i dette bilag (48), som substrat i testene. Fremstilling af syntetisk jord til brug i bioakkumuleringstest og anbefalinger vedrørende opbevaring af syntetisk jord findes i tillæg 4. Lufttørret syntetisk jord kan opbevares ved rumtemperatur indtil anvendelse.

22. Naturlig jord fra ikke-forurenede steder kan dog bruges som test- og/eller dyrkningsjord. Naturlig jord skal karakteriseres ved mindst oprindelse (opsamlingssted), pH, organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og maksimal vandbindingsevne (WHC_{max}) samt vandindhold i procent (3). En analyse af jorden eller dens bestanddele for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger. Hvis feltjord fra landbrugsarealer anvendes, må den ikke være blevet behandlet med plantebeskyttelsesmidler eller husdyrgødning fra behandlede dyr i mindst et år og med organisk gødning i mindst seks måneder inden prøvetagning (50). Fremgangsmåderne til håndtering af naturlig jord inden økotoxikologiske test med oligochaeter i laboratoriet er beskrevet i (3). Naturlig jord opbevares så kort tid i laboratoriet som muligt.

Applikation af testkemikaliets

23. Testkemikaliets indarbejdes i jorden. Testkemikaliets fysiske-kemiske egenskaber tages i betragtning. Et vandopløseligt testkemikaliets opløses fuldstændigt i vand, inden det blandes med jorden. Den anbefalede spiking-procedure i forbindelse med testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, omfatter overfladebehandling af en eller flere af bestanddelene i den naturlige eller syntetiske jord med testkemikaliets. Kvarssand eller en del heraf kan f.eks. gennemblødes med en opløsning af testkemikaliets i et egnet organisk opløsningsmiddel, som derefter

langsomt fordampes, indtil det er tørt. Den overfladebehandlede andel blandes derefter med den våde jord. Den vigtigste fordel ved denne fremgangsmåde er, at der ikke tilsættes opløsningsmidler til jorden. Når naturlig jord anvendes, kan testkemikaliet tilsættes ved at spike en lufttørret del af jorden som beskrevet ovenfor for syntetisk jord eller ved at røre testkemikaliet ind i den våde jord. Dette efterfølges af et fordampningstrin, hvis en opløselighedsfremmer er blevet anvendt. Generelt bør det undgås, at den våde jord kommer i kontakt med opløsningsmidler. Følgende bør tages i betragtning (3):

- Hvis et andet opløsningsmiddel end vand anvendes, skal det kunne blandes med vand og/eller fjernes (f.eks. ved fordampning), så kun testkemikaliet er tilbage i jorden.
 - Hvis der anvendes en opløsningsmiddelkontrol, er der ikke brug for en negativ kontrol. Opløsningsmiddelkontrollen skal indeholde den højeste koncentration af det opløsningsmiddel, der er tilført jorden, og skal være fra samme batch, som det middel, der er anvendt i stamopløsningen. Opløsningsmidlets toksicitet og flygtighed samt opløseligheden af testkemikaliet i det valgte opløsningsmiddel bør være de primære kriterier ved valget af en egnet opløselighedsfremmer.
24. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, kan 2,0-2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder blandes med testkemikaliet, f.eks. ved hjælp af en morter og støder, for at opnå den ønskede testkoncentration. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt med en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding fordeles i testbeholderne. Fremgangsmåden gentages for hver testkoncentration, og der klargøres også en kontrol med 2,0-2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder.
25. Koncentrationen af testkemikaliet i jorden bestemmes efter spiking. Inden testorganismerne tilsættes, kontrolleres det, at testkemikaliet er ensartet fordelt i jorden. Den anvendte spiking-metode og begrundelsen for valget af den pågældende metode anføres i rapporten (24).
26. Der etableres ideelt ligevægt mellem jord- og porevandsfasen, inden testorganismerne tilsættes. En periode på fire dage ved 20 °C anbefales. For mange organiske kemikalier, der er tungtopløselige i vand, kan det tage flere dage eller måneder at opnå ægte ligevægt mellem adsorberede og opløste andele. Afhængigt af forsøgets formål, hvis f.eks. miljøforholdene skal efterlignes, kan den spikede jord »ældes« i længere tid. Hvis det drejer sig om metaller, kan det f.eks. være tre uger ved 20 °C (22).

Dyrkning af testorganismer

27. Orm holdes fortrinsvis i permanente laboratoriesystemer. Vejledning om laboratoriedyrkningsmetoder findes i tillæg 5, for så vidt angår arterne *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* og *Enchytraeid* (se også (48) (51) (52)).
28. De orme, der anvendes i test, må ikke have synlige sygdomme, misdannelser eller parasitter.

UDFØRELSE AF TESTEN

29. Testorganismerne eksponeres for testkemikaliet i løbet af optagelsesfasen. Optagelsesfasen bør vare 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), medmindre det kan påvises, at steady state er indtrådt.
30. Ved elimineringsfasen overføres ormene til jord uden testkemikaliet. Den første prøve udtages 4-24 timer efter elimineringsfasens start. Eksempler på prøvetagningsplaner for en 21-dages optagelsesfase og en 21-dages elimineringsfase findes i tillæg 3.

Testorganismer

31. For mange arter af terrestriske enchytraeider er den individuelle vægt meget lav (f.eks. 5-10 mg vådvægt pr. individ for *Enchytraeus albidus* og mindre for *Enchytraeus crypticus* og *Enchytraeus luxuriosus*). For at kunne foretage vejningen og den kemiske analyse kan det være nødvendigt at samle ormene fra de replikate testbeholdere (dvs. alle orme i en replikat testbeholder bruges til at opnå et analyseresultat for væv). 20 individuelle enchytraeider tilsættes hver replikat, og der anvendes mindst tre replikater. Hvis den analytiske detektionsgrænse for testkemikaliet er meget høj, skal der muligvis bruges flere orme. For testarter med højere individuel vægt (*Eisenia fetida* og *Eisenia andrei*) kan der bruges replikate beholdere med ét individ.
32. De regnorm, der bruges i en test, bør være af ensartet vægt (*Eisenia fetida* og *Eisenia andrei* bør f.eks. have en individuel vægt på 250-600 mg). Enchytraeider (f.eks. *Enchytraeus albidus*) bør have en længde på ca. 1 cm. Alle orme i en bestemt test bør komme fra samme kilde og være voksne dyr med bælte (se tillæg 5). Da et dyrs

vægt og alder kan have betydning for BAF-værdierne (f.eks. på grund af varierede fedtindhold og/eller tilstedeværelse af æg), registreres disse parametre nøjagtigt og under hensyntagen til fortolkningen af resultater. Desuden kan der i eksponeringsperioden være afsat kokoner, som også påvirker BAF-værdierne. Det anbefales, at man inden testen danner sig et skøn over gennemsnitsvægten (våd og tør) ved at veje en delprøve af testormene.

33. Der bør anvendes et højt jord-til-orm-forhold for at minimere reduktionen i koncentrationen af testkemikaliets i jorden i løbet af optagelsesfasen. Til *Eisenia fetida* og *Eisenia andrei* anbefales som minimum 50 g jord (tørvægt) pr. orm, og til enchytraeider anbefales som minimum 10-20 g jord (tørvægt) pr. testbeholder. Beholderne skal indeholde et jordlag på 2-3 cm (enchytraeider) eller 4-5 cm (regnorm).
34. De orm, der anvendes i en test, udtages fra dyrkningssystemet (f.eks. enchytraeider med pincet). Voksne dyr overføres fra ubehandlet testjord med henblik på akklimatisering og fodres (se afsnit 36). Hvis testbetingelserne adskiller sig fra dyrkningsbetingelserne, er en akklimatiseringsfase på 24-72 timer nok til at tilpasse ormene til testbetingelserne. Efter akklimatisering skylles ormene ved at overføre dem til glasplader (f.eks. petriglas) med rent vand. Efterfølgende vejes de, inden de tilsættes testjorden. Inden vejningen fjernes overskydende vand fra ormene ved forsigtigt at holde dem mod kanten af glaspladen eller duppe dem forsigtigt med et let fugtigt papirhåndklæde.
35. Testorganismernes nedgravningsadfærd observeres og registreres. I test med regnorm vil dyrene (kontrol og behandlingsprøver) normalt grave sig ned i jorden inden for en periode på få timer. Dette kontrolleres senest 24 timer efter tilsætning af ormene til testbeholderne. Hvis regnormene ikke graver sig ned (f.eks. mere end 10 % i løbet af mere end halvdelen af optagelsesfasen), indikerer det, at testbetingelserne ikke er hensigtsmæssige, eller at testorganismene ikke er sunde. I det tilfælde afbrydes testen, hvorefter den gentages. Enchytraeider lever primært i de interstitielle porer i jorden, og deres integument er ofte kun i delvis kontakt med det omgivende substrat. Eksponering af gravende og ikke-gravende enchytraeider antages at være den samme, og en test skal ikke nødvendigvis gentages, selv om enchytraeider ikke graver sig ned.

Fodring

36. Fodring planlægges, hvis der anvendes jord med lavt samlet organisk kulstofindhold. Hvis der anvendes syntetisk jord, anbefales ugentlig fodring (dvs. ormene fodres én gang om ugen) bestående af 7 mg tørret møg pr. g jord (tørvægt) til regnorm, og en ugentlig fodring bestående af 2-2,5 mg maledede havregryn pr. g jord (tørvægt) til enchytraeider (11). Den første fodration blandes i jorden umiddelbart inden tilsætningen af testorganismene. Der anvendes fortrinsvis samme type foder som i dyrkningssystemet (se tillæg 5).

Lys og temperatur

37. Testene gennemføres under reguleret belysning med 16 timers lys og 8 timers mørke, helst 400-800 lux, i det område, hvor testbeholderne opbevares (3). Testtemperaturen skal være 20 ± 2 °C i hele testen.

Testkoncentrationer

38. Der anvendes én koncentration. Situationer, hvor yderligere koncentrationer kræves, skal begrundes. Hvis testkemikaliets toksicitet (EC_x) ligger tæt på den analytiske detektionsgrænse, bør et radioaktivt mærket testkemikalie med høj specifik radioaktivitet anvendes. For metaller bør koncentrationen ligge over baggrundsniveauet i væv og jord.

Replikater

39. Til kinetiske målinger (optagelses- og elimineringsfasen) skal antallet af behandlede replikater beholdere som minimum være tre pr. prøvetagningstidspunkt. Der skal klargøres et tilstrækkeligt antal replikater til at dække alle prøvetagningstidspunkter i optagelses- og elimineringsfasen.
40. Til biologiske observationer og målinger (f.eks. forhold mellem tør- og vådvægt, fedtindhold osv.) og til analyse af baggrundskoncentrationer i orm og jord skal der bruges mindst 12 replikatbeholdere med en negativ kontrol (fire prøver ved start, fire ved afslutning af optagelse og fire ved afslutning af eliminering), hvis der ikke anvendes et andet opløsningsmiddel end vand. Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer til tilsætning af testkemikaliets, skal der tilvejebringes en opløsningsmiddelkontrol (fire prøver ved start, fire ved afslutning af optagelse og fire ved afslutning af eliminering), som indeholder alle bestanddele med undtagelse af testkemikaliets, ud over de behandlede replikater. I dette tilfælde kan der også klargøres fire yderligere replikater beholdere til en negativ kontrol (intet opløsningsmiddel) til evt. prøvetagning ved afslutningen af optagelsesfasen. Disse replikater kan derefter sammenlignes biologisk med opløsningsmiddelkontrollen for at få oplysninger om en mulig indvirkning af opløsningsmidlet på testorganismene. Det anbefales, at der klargøres et tilstrækkeligt antal yderligere replikater reservebeholdere (f.eks. otte) til behandlingsprøver og kontrol.

Hyppighed af målinger af jordkvaliteten

41. Jordens pH, jordens fugtindhold og temperaturen (kontinuerlig) i testrummet måles ved begyndelsen og slutningen af optagelses- og elimineringsfasen. En gang om ugen kontrolleres jordens fugtindhold ved at veje testbeholderne og sammenligne de faktiske vægte med de indledende vægte ved testens begyndelse. Vandtab kompenseres ved tilsætning af deioniseret vand.

Prøvetagning og analyse af orm og jord

42. Et eksempel på en tidsplan for optagelses- og elimineringsfasen i test af bioakkumulering i regnorm og enchytraeider findes i tillæg 3.
43. Der udtages prøver af jorden fra testbeholderne med henblik på bestemmelse af testkemikaliekoncentrationen, både inden ormene tilsættes og i løbet af optagelses- og elimineringsfasen. I løbet af testen måles koncentrationerne af testkemikallet i ormene og jorden. Generelt måles de samlede koncentrationer i jord. Koncentrationer i porevand kan også måles. I det tilfælde bør begrundelsen og metoderne fastlægges, inden forsøget indledes, og anføres i rapporten.
44. Der tages prøver af orm og jord mindst seks gange i løbet af optagelses- og elimineringsfasen. Hvis stabiliteten af et testkemikalie påvises, kan antallet af jordanalyser reduceres. Der bør analyseres mindst tre replikater ved begyndelsen af afslutningen af optagelsesfasen. Hvis den koncentration i jord, der måles ved afslutningen af optagelsesfasen, afviger fra den indledende koncentration med mere end 30 %, analyseres jordprøver udtaget på de andre datoer også.
45. Udtag ormene fra jorden i en replikatbeholder på hvert prøvetagningstidspunkt (f.eks. efter at have spredt jorden i beholderen ud på en bakke og samlet ormene op med en pincet), skyl dem hurtigt med vand i et lavt glas eller på en stålbakke. Fjern overskydende vand (se afsnit 34). Overfør forsigtigt ormene til en allerede vejlet beholder, og vej dem straks med tarmindehold.
46. Regnormene (*Eisenia* sp.) placeres derefter på f.eks. fugtigt filterpapir i en overdækket petriskål (se afsnit 34) natten over, så de kan tømme deres tarme. Efter udtømming bestemmes ormenes vægt, så en evt. reduktion i biomasse i løbet af testen kan vurderes (se validitetskriterierne i afsnit 17). Vejning og vævsanalyse af enchytraeider udføres uden tømning af tarme, da det er teknisk vanskeligt på grund af disse ormes lille størrelse. Straks efter den endelige fastlæggelse af vægten aflives ormene på den mest hensigtsmæssige måde (f.eks. ved hjælp af flydende nitrogen eller nedfrysning ved temperaturer under -18°C).
47. I løbet af elimineringsfasen udskifter ormene forurenede tarmindehold med ren jord. Det betyder, at målinger i ikke-udtømte orm (enchytraeider i denne sammenhæng), der udtages umiddelbart inden elimineringsfasen, omfatter forurenede tarmjord. For akvatiske oligochaeters vedkommende antages det, at størstedelen af det forurenede tarmindehold er blevet erstattet af rent sediment efter de første 4-24 timer af elimineringsfasen (se f.eks. (46)). Lignende resultater er rapporteret for regnorm i forsøg vedrørende akkumulering af radioaktivt mærket cadmium og zink (78). For så vidt angår ikke-udtømte enchytraeider, kan koncentration af denne første prøve i løbet af elimineringsfasen betragtes som koncentrationen i væv efter tarmtømming. For at tage højde for den uforurenede jords fortynding af testkemikaliekoncentrationen i løbet af elimineringsfasen kan vægten af tarmindeholdet estimeres ud fra forholdet mellem ormenes vådvægt/ormenes askevægt eller ormenes tørvægt/ormenes askevægt.
48. Jord- og ormeprøver bør analyseres umiddelbart efter udtagningen (dvs. inden for 1-2 dage), så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og elimineringshastigheder. Hvis analysen forsinkes, opbevares prøverne på en hensigtsmæssig måde, f.eks. ved dybfrysning ($\leq -18^{\circ}\text{C}$).
49. Det kontrolleres, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfindning af testkemikallet i både jord og orm for den valgte metode. Ekstraktionsgraden, detektionsgrænsen (LOD) og kvantificeringsgrænsen (LOQ) rapporteres. Det kontrolleres ligeledes, at testkemikallet ikke kan detekteres i kontrolbeholderne i højere koncentrationer end baggrundskoncentrationerne. Hvis koncentrationen af testkemikallet i testorganismen $\text{Ca} > 0$ i kontrolormene, medtages dette i beregningen af de kinetiske parametre (se tillæg 2). Alle prøver håndteres i hele testen på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. som følge af adsorption af testkemikallet til prøvetagningsudstyret) minimeres.

50. Når der anvendes radioaktivt mærkede testkemikalier, kan det oprindelige testkemikalie og metabolitter analyseres. Kvantificering af det oprindelige testkemikalie og metabolitter ved steady state eller ved afslutningen af optagelsesfasen giver vigtige oplysninger. Prøverne »oprenses« derefter, så det oprindelige testkemikalie kan kvantificeres separat. Hvis individuelle metabolitter overstiger 10 % af den samlede radioaktivitet i de analyserede prøver, bør disse metabolitter identificeres.
51. Den samlede genfindning og genfindingen af testkemikalie i orm, jord og evt. udskillere, der indeholder absorbenter for at fastholde fordampet testkemikalie, registreres og rapporteres.
52. Individer udtaget fra en testbeholder kan samles i en pool, hvis det drejer sig om enchytraeider, som er mindre end regnorm. Hvis denne »pooling« reducerer antallet af replikater, indskrænkes mulighederne for statistisk behandling af dataene. Hvis der kræves en bestemt statistisk metode og styrke, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange replikate testbeholdere til, at den ønskede pooling, metode og styrke tilgodeses.
53. BAF bør udtrykkes både som funktion af samlet tørvægt og som funktion af fedtindholdet, hvis det kræves (f.eks. for meget hydrofobe kemikalier). Fedtindholdet bestemmes ved hjælp af egnede metoder. Eksisterende metoder, f.eks. (31) og (58), tilpasses til dette formål. Disse metoder anvender ekstraktion med chloroform/methanol. For at undgå brugen af chlorerede opløsningsmidler bør der anvendes en tilpasning af Bligh og Dyer-metoden (9) som beskrevet i (17). Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier, er det vigtigt at give nærmere oplysninger om den anvendte metode. Når det er muligt, dvs. når tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, skal lipidanalysen foretages på samme prøve eller ekstrakt som det, der blev anvendt til analyse for testkemikaliets, eftersom lipiderne ofte skal fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved gaskromatografi (49). Alternativt kan fedtindholdet måles på kontrol dyr og derefter anvendes til at normalisere BAF-værdier. Sidstnævnte tilgang reducerer forureningen af udstyr med testkemikaliets.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

54. Testkemikaliets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i/på ormene i løbet af optagelsesfasen i forhold til tiden (lineære akser). Når kurven når et plateau, eller steady state (se definitioner i tillæg 1), beregnes steady state-bioakkumuleringsfaktoren BAF_{ss} ved hjælp af:

$$\frac{C_a \text{ ved steady state eller afslutning af optagelsesfase (gennemsnit)}}{C_s \text{ ved steady state eller afslutning af optagelsesfase (gennemsnit)}}$$

C_a er koncentrationen af testkemikalie i testorganisme

C_s er koncentrationen af testkemikalie i jord

55. Hvis steady state ikke nås, bestemmes BAF_k, baseret på hastighedskonstanter, i stedet for BAF_{ss}, som beskrevet nedenfor:

— Bestem akkumuleringsfaktoren (BAF_k) som forholdet k_s/k_e .

— Optagelses- og elimineringshastigheder beregnes helst samtidig (se ligning 11 i tillæg 2).

— Hastighedskonstanten for eliminering (k_e) bestemmes normalt ud fra elimineringskurven (dvs. en afbildning af koncentrationen af testkemikaliets i ormene i løbet af elimineringsfasen). Dernæst beregnes hastighedskonstanten for optagelse (k_s) på grundlag af k_e og en værdi af C_a , som udledes af optagelseskurven (disse metoder er også beskrevet i tillæg 2). Til at finde BAF_k og hastighedskonstanterne, k_s og k_e foretrækkes computerbaserede ikke-lineære parameterestimeringsmetoder. Hvis det er åbenbart, at elimineringen ikke er af første orden, anvendes andre modeller.

Testrapport

56. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie:

- alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet's akutte toksicitet eller langtidstoksicitet (f.eks. EC_{50} , LC_{50} og NOEC) over for terrestriske oligochaeter
- renhed, fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. $\log K_{ow}$ og vandopløselighed
- kemisk identifikation; testkemikaliet's herkomst, identitet og koncentration af evt. opløsningsmiddel
- hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes: den præcise position af de mærkede atomer, den specifikke radioaktivitet og den radiokemiske renhed.

Testart:

- videnskabeligt navn, stamme, herkomst, evt. forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse osv.

Testbetingelser:

- anvendt testfremgangsmåde
- belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed
- testdesign (f.eks. testbeholdernes antal og størrelse, jordmasse og højde af jordlag, antal replikater, antal orm pr. replikat, antal testkoncentrationer, varighed af optagelses- og elimineringsfaser samt prøvetagningshyppighed)
- begrundelse for valget af testbeholdermateriale
- metode til klargøring og applikation af testkemikalie samt begrundelse for valg af specifik metode
- de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testbeholderne og den metode, der er benyttet til at bestemme disse værdier
- oprindelsen af bestanddele i syntetisk jord eller — hvis naturlige medier er anvendt — oprindelsen af jorden, beskrivelse af evt. forbehandling, resultater af kontroller (overlevelse, biomasseudvikling og reproduktion), jordkarakteristika (pH, samlet organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), WHC_{max} , vandindhold i procent ved testens start og afslutning og evt. andre målinger)
- detaljerede oplysninger om, hvordan jord- og ormeprøver er behandlet, herunder forberedelse, opbevaring, spiking, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for testkemikalie i orm og jord og fedtindhold (hvis bestemt) samt genfinding af testkemikaliet.

Resultater:

- mortalitet for kontrolorm og orm i hver testbeholder samt evt. iagttaget unormal adfærd (f.eks. undvigelse af jord eller manglende reproduktion i bioakkumulerings-test med enchytraeider)
- forholdet mellem tørvægt og vådvægt for jord og testorganismer (anvendes til normalisering)
- ormenes vådvægt på hvert prøvetagningstidspunkt; for regnorm også vådvægten ved begyndelsen af testen og på hvert prøvetagningstidspunkt før og efter udtømmning af tarme
- testorganismernes fedtindhold (hvis bestemt)

- kurver, der viser optagelses- og elimineringskinetikken for testkemikallet i ormene samt tiden til steady state
- C_a og C_s (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) på alle prøvetagningstidspunkter (C_a udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af legemsvægt, C_s udtrykt i g kg^{-1} våd- og tørvægt af jord). Hvis en biota-jord-akkumuleringsfaktor (BSAF) kræves (f.eks. til sammenligning af resultaterne fra to eller flere test udført med dyr med forskelligt fedtindhold), kan C_a også udtrykkes som g kg^{-1} fedtindhold i organismen, og C_s kan udtrykkes som g kg^{-1} organisk kulstofindhold i jorden
- BAF (udtrykt i $\text{kg jord} \cdot \text{kg}^{-1}$ orm), hastighedskonstant for optagelse fra jord k_s (udtrykt i g jord kg^{-1} orm dag^{-1}) og hastighedskonstant for eliminering k_e (udtrykt i dag^{-1}); BSAF (udtrykt i $\text{kg jord organisk kulstof} \cdot \text{kg}^{-1}$ orm fedtindhold) kan også rapporteres
- hvis målt: procentdele af oprindeligt kemikalie, metabolitter og bundne reststoffer, dvs. den procentdel af testkemikalie, der ikke kan ekstraheres med almindelige ekstraktionsmetoder, detekteret i jord og testorganismer
- metoder, der er anvendt til statistisk analyse af data.

Evaluering af resultater:

- resultaternes overensstemmelse med validitetskriterierne i afsnit 17
- uventede eller usædvanlige resultater, f.eks. ufuldstændig eliminering af testkemikallet fra testorganismerne.

LITTERATUR:

- (1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 s.
- (4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. I Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.
- (6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.
- (7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- (8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.
- (9) Bligh EG og Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.
- (10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 s.

-
- (11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.
- (13) Conder JM og Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.
- (14) Connell DW og Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W (2003). Oligochaeta, I: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Nederlandene, s. 555-576.
- (17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF, EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.
- (20) Edwards CA og Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 s.
- (21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- (22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th og Römbke J (2009). Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 s. Findes på: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (23) Elmegaard N og Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 s.
- (24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull. OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

- (27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- (28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 s.
- (29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225-1231.
- (31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.
- (32) Hawker DW og Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K og Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-träger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.
- (36) Jaenike J (1982). »*Eisenia foetida*« is two biological species. *Megadrilogica* 4: 6-8.
- (37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.
- (38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.
- (39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.
- (40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.
- (41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.
- (43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 s.
- (44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

- (45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.
- (46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.
- (47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations, I: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.
- (49) Kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk.
- (50) Kapitel C.21 i dette bilag, Jordmikroorganismer: Kvælstofomdannelsestest.
- (51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (54) Petersen H og Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. I: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.
- (57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 s.
- (60) Römbke J og Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 s.
- (61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W, Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

- (63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H-J og Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R og Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93-100.
- (66) Sims R W og Gerard BM (1985). Earthworms, I: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557-2563.
- (68) Spacie A og Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. I: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation — Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marts 2000.
- (73) Van Brummelen TC og Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, I: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel CA og Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- (77) Venter JM og Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161-165.
- (78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B og Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.
-

Tillæg 1

DEFINITIONER

Bioakkumulering: en koncentrationsforøgelse af testkemikallet i eller på en organisme i forhold til koncentrationen af testkemikallet i det omgivende medium. Bioakkumulering er resultatet af både biokoncentrerings- og biomagnifikationsprocesser (se nedenfor).

Biokoncentration: en koncentrationsforøgelse af testkemikallet i eller på en organisme som følge af optagelsen af kemikallet alene fra det omgivende medium (dvs. via legemsflade og fordøjet jord) i forhold til koncentrationen af testkemikallet i det omgivende medium.

Biomagnifikation: en koncentrationsforøgelse af testkemikallet i eller på en organisme primært som følge af optagelsen af forurenede foder eller bytte i forhold til koncentrationen af testkemikallet i foder eller bytte. Biomagnifikation kan medføre overførsel eller akkumulering af testkemikallet i fødekæder.

Eliminering af testkemikalie: tabet af kemikallet fra testorganismens væv ved aktive eller passive processer, der forekommer uafhængigt af tilstedeværelsen eller fraværet af testkemikallet i det omgivende medium.

Bioakkumuleringsfaktoren (BAF) på ethvert tidspunkt i denne bioakkumuleringstests optagelsesfase: koncentrationen af testkemikallet i eller på testorganismen (C_a i $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tørvægt orm) divideret med koncentrationen af testkemikallet i det omgivende medium (C_s som $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tørvægt jord); BAF angives i enheder af $\text{kg jord}\cdot\text{kg}^{-1}$ orm.

Steady state-bioakkumuleringsfaktor (BAF_{ss}): er BAF ved steady state og ændres ikke signifikant over en længere periode, idet koncentrationen af testkemikallet i det omgivende medium (C_s som $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tørvægt jord) er konstant i denne tidsperiode.

Bioakkumuleringsfaktorer beregnet direkte ud fra forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra jord og hastighedskonstanten for eliminering (k_s og k_e , se nedenfor) betegnes kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAF_k).

Biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF): den fedtindholdsnormaliserede koncentration af testkemikallet i eller på testorganismen divideret med den organisk kulstofnormaliserede koncentration af testkemikallet i jorden ved steady state. C_a udtrykkes da som $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ fedtindhold i organismen, og C_s som $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ organisk indhold i jorden; BSAF angives i enheder af $\text{kg organisk kulstof}\cdot\text{kg}^{-1}$ fedt.

Plateau eller steady state: ligevægten mellem de optagelses- og elimineringsprocesser, der forekommer samtidig i løbet af eksponeringsfasen. Man taler om steady state i afbildningen af BAF i forhold til tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af BAF i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikante forskelle mellem de tre prøvetagningsperioder. For testkemikalier, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende (49).

Organisk kulstof/vandfordelingskoefficient (K_{ow}): forholdet mellem et kemikalies koncentration i eller på andelen af organisk kulstof i jord og kemikaliet koncentration i vand ved ligevægt.

Octanol-vandfordelingskoefficient (K_{ow}): forholdet mellem et kemikalies opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt, også betegnet P_{ow} . Logaritmen til K_{ow} ($\log K_{ow}$) benyttes som rettesnor for et kemikalies potentiale for bioakkumulering i vandorganismer.

Optagelses- eller eksponeringsfasen: det tidsrum, hvori testorganismerne udsættes for testkemikallet.

Hastighedskonstanten for optagelse fra jord (k_s): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den forøgelse af koncentrationen af testkemikallet i eller på testorganismen, der følger af fasen for optagelse fra jord. k_s udtrykkes i $\text{g jord}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Elimineringsfasen: tidsrummet efter overførsel af testorganismerne fra et forurenede medium til et medium uden testkemikallet, hvor elimineringen (eller nettotabet) af kemikallet fra testorganismerne undersøges.

Hastighedskonstanten for eliminering (k_e): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den reduktion af koncentrationen af testkemikallet i eller på testorganismen, efter at testorganismerne er overført fra et medium med testkemikallet til et medium uden dette stof; k_e udtrykkes i d^{-1} .

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Tillæg 2

Beregning af parametre for optagelse og eliminering

Den primære effektparameter i en bioakkumuleringstest er bioakkumuleringsfaktoren, BAF. Den målte BAF beregnes ved at dividere koncentration i testorganismen, C_a , med koncentrationen i jord, C_s , ved steady state. Hvis steady state ikke nås i optagelsesfasen, beregnes BAF_K ud fra hastighedskonstanter i stedet for BAF_{ss} . Det skal angives, om BAF er baseret på steady state-koncentrationer.

Den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAF_K), hastighedskonstanten for optagelse fra jord (k_s) og hastighedskonstanten for eliminering (k_e) fås sædvanligvis ved at bruge computerbaserede ikke-lineære parameterestimeringsmetoder, f.eks. baseret på de modeller, der er beskrevet i (68). Ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og modelligningerne:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ligning 1}]$$

eller

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e t_c} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ligning 2}]$$

hvor:

C_a = koncentration af kemikalie i orm [g kg⁻¹ våd- eller tørvægt]

k_s = hastighedskonstant for optagelse i væv [g jord kg⁻¹ orm d⁻¹]

C_s = koncentration af kemikalie i jord [g kg⁻¹ våd- eller tørvægt]

k_e = hastighedskonstant for eliminering [d⁻¹]

t_c = tid ved afslutningen af optagelsesfasen

beregner disse computerprogrammer værdier for BAF_K , k_s og k_e .

Når baggrundskoncentration i ikke-eksponerede orm, f.eks. på dag 0, adskiller sig signifikant fra nul (det kan f.eks. være tilfældet for metaller), skal denne baggrundskoncentration ($C_{a,0}$) medtages i ligningerne, så de lyder:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ligning 3}]$$

og

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e t_c} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ligning 4}]$$

Hvis der observeres et signifikant fald i koncentrationen af testkemikaliets i jord i løbet af optagelsesfasen, kan følgende model anvendes, f.eks. (67) (79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{ligning 5}]$$

hvor:

C_s = koncentration af kemikalie i jord [g kg⁻¹ våd- eller tørvægt]

k_0 = hastighedskonstant for nedbrydning i jord [d⁻¹]

C_0 = indledende koncentration af kemikalie i jord [g kg⁻¹ våd- eller tørvægt]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ligning 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c} \times e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{ligning 7}]$$

hvor:

C_a = koncentration af kemikalie i orm [g kg⁻¹ våd- eller tørvægt]

k_s = hastighedskonstant for optagelse i væv [g jord kg⁻¹ orm d⁻¹]

k_0 = hastighedskonstant for nedbrydning i jord [d⁻¹]

k_e = hastighedskonstant for eliminering [d⁻¹]

t_c = tid ved afslutningen af optagelsesfasen.

Når steady state opnås i løbet af optagelsesfasen (dvs. $t = \infty$), kan ligning 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ligning 1}]$$

reduceres til:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

eller

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{ligning 8}]$$

I så fald er $k_s/k_e \times C_s$ en tilgang til koncentrationen af testkemikaliets i ormevæv ved steady state ($C_{a,ss}$).

Biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF) beregnes på følgende måde:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{ligning 9}]$$

hvor f_{oc} er andelen af organisk kulstof i jord, f_{lip} er andelen af fedtindhold i orm, som begge fortrinsvis bestemmes på prøver udtaget fra testen og baseret på henholdsvis tørvægt eller vådvægt.

Elimineringskinetikken kan modelleres ved hjælp af data fra elimineringsfasen og ved anvendelse af følgende modelligning og en computerbaseret ikke-lineær parameterestimeringsmetode. Hvis de datapunkter, der er afsat i forhold til tid, indikerer et konstant eksponentielt fald i koncentrationen af testkemikaliets i testorganismerne, kan en etrummodel (ligning 9) bruges til at beskrive tidsforløbet for eliminering.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{ligning 10}]$$

Elimineringsprocesser kan være tofasede og udvise et hurtigt fald i C_a i begyndelsen, som ændres til et langsommere tab af testkemikalie i slutningen af elimineringsfasen, f.eks. (27) (68). De to faser kan fortolkes ud fra den antagelse, at der er to forskellige rum i organismen, hvorfra testkemikalie går tabt med forskellige hastigheder. I sådanne tilfælde henvises til specifik litteratur, f.eks. (38) (39) (40) (78).

Ved hjælp af modelligningerne ovenfor kan de kinetiske parametre (k_s og k_e) også beregnes i ét trin ved at anvende modellen for førsteordenskinetik på alle data fra både optagelses- og elimineringsfasen samtidig. En beskrivelse af en metode, der understøtter en sådan kombineret beregning af hastighedskonstanterne for optagelse og eliminering, findes i (41) (73) og (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{K_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{ligning 11}]$$

Bemærk: Når optagelses- og elimineringsparametre estimeres samtidig fra de kombinerede optagelses- og elimineringsdata, er »m« som vist i ligning 11 en deskriptor, der sætter computerprogrammet i stand til at tildele ligningens underled til datasættene for den enkelte fase og udføre evalueringen korrekt ($m = 1$ for optagelsesfasen; $m = 2$ for elimineringsfasen).

Disse modelligninger skal dog bruges med forsigtighed, især når testkemikaliets biotilgængelighed eller (bio)nedbrydning ændres i løbet af testen (se f.eks. (79)).

Tillæg 3

EKSEMPLER PÅ TIDSPLANER FOR BIOAKKUMULERINGSTEST

Test med regnorm

a) Optagelsesfase med otte prøvetagningsdatoer til beregning af kinetik

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering af fremstillet jord i 48 timer.
– 4	Spiking af jordandel med opløsning af testkemikaliet. Fordampning af opløsningsmiddel. Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Ækvilibrering ved testbetingelser i fire dage (tre uger for jord spiked med metal).
– 3 til – 1	Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering. Fremstilling og befugtning af jordbestanddele.
0	Måling af temperatur og pH i jord. Udtagning af jordprøver fra behandlede beholdere og opløsningsmiddelkontroller til bestemmelse af koncentration af testkemikalie. Tilsætning af foderration. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Opbevaring af tilstrækkeligt antal delp prøver af orm til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt og fedtindhold. Vejning af alle testbeholdere for at kontrollere fugtindhold i jord. Kontrol af luftforsyning ved anvendelse af lukket testsystem.
1	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af testkemikalie.
2	Samme som dag 1.
3	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur.
4	Samme som dag 1.
5 til 6	Samme som dag 3.
7	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
8 til 9	Samme som dag 3.
10	Samme som dag 1.
11 til 13	Samme som dag 3.
14	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
15 til 16	Samme som dag 3.
17	Samme som dag 1.
18 til 20	Samme som dag 3.
21	Samme som dag 1. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Afslutning af optagelsesfase. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord til elimineringsfasen (ingen tarmudtømning). Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller.
	Aktiviteter før eksponering (ækvilibreringsfase) planlægges under hensyntagen til testkemikaliet's egenskaber.
	Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

b) Elimineringsfase

Dag	Aktivitet
– 6	Fremstilling og befugtning af jordbestanddele. Konditionering af fremstillet jord i 48 timer.
– 4	Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Inkubation ved testbetingelser i fire dage.
0 (afslutning af optagelsesfase)	Måling af temperatur og pH i jord. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Tilsætning af foderration. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord. Udtagning af jord- og ormeprøver efter 4-6 timer med henblik på bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet.
1	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af testkemikalie.
2	Samme som dag 1.
3	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur.
4	Samme som dag 1.
5 til 6	Samme som dag 3.
7	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
8 til 9	Samme som dag 3.
10	Samme som dag 1.
11 til 13	Samme som dag 3.
14	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
15 til 16	Samme som dag 3.
17	Samme som dag 1.
18 til 20	Samme som dag 3.
21	Samme som dag 1. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller.
	Inden starten på elimineringsfasen skal jord fremstilles på samme måde som inden optagelsesfasen.
	Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

Test med enchytraeider

a) Optagelsesfase med otte prøvetagningsdatoer til beregning af kinetik

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering af fremstillet jord i 48 timer.
– 4	Spiking af jordandel med opløsning af testkemikaliet. Fordampning af opløsningsmiddel. Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Ækvilibrerings ved testbetingelser i fire dage (tre uger for jord spiked med metal).

Dag	Aktivitet
– 3 til – 1	Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering. Fremstilling og befugtning af jordbestanddele.
0	Måling af temperatur og pH i jord. Udtagning af jordprøver fra behandlede beholdere og opløsningsmiddelkontroller til bestemmelse af koncentration af testkemikalie. Tilsætning af foderration. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Opbevaring af tilstrækkeligt antal delprøver af orm til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt og fedtindhold. Vejning af alle testbeholdere for at kontrollere fugtindhold i jord. Kontrol af luftforsyning ved anvendelse af lukket testsystem.
1	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af teststof.
2	Samme som dag 1.
3	Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur.
4	Samme som dag 1.
5 til 6	Samme som dag 3.
7	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration til jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand.
9	Samme som dag 1.
10	Samme som dag 3.
11	Samme som dag 1.
12 til 13	Samme som dag 3.
14	Samme som dag 1. Tilsætning af foderration til jord. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Afslutning af optagelsesfase. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord til elimineringsfasen (ingen tarmudtømmning). Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller.
	Aktiviteter før eksponering (ækvilibreringsfase) planlægges under hensyntagen til testkemikaliet's egenskaber.
	Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage).

Tillæg 4

Syntetisk jord — anbefalinger vedrørende fremstilling og opbevaring

Da naturlig jord fra en bestemt kilde ikke er tilgængelig hele året, og da hjemmehørende organismer og tilstedeværelsen af mikroforurenere kan påvirke testen, anbefales det at bruge et syntetisk substrat, den syntetiske jord i henhold til kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme (48), i denne test. Flere forsøgsarter kan overleve, vokse og forplante sig i denne jord, og der opnås maksimal standardisering samt sammenlignelighed af test- og dyrkningsbetingelser inden for og mellem laboratorier.

Jordbestanddele

Tørv:	10 %	Sphagnumtørv i overensstemmelse med OECD Guideline 207 no. (48)
Kvartssand:	70 %	Industrielt kvartssand (lufttørret); kornstørrelse: over 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 µm, men alle partikler skal være ≤ 2 mm
Kaolinholdigt ler:	20 %	Kaolinindhold ≥ 30 %
Calciumcarbonat:	≤ 1 %	CaCO ₃ , pulveriseret, kemisk rent

Det organiske kulstofindhold i den syntetiske jord kan evt. reduceres, f.eks. ved at reducere indholdet af tørv til 4-5 % af tørrjorden og øge sandindholdet tilsvarende. Ved en sådan reduktion af det organiske kulstofindhold kan mulighederne for, at testkemikaliets adsorberes til jorden (organisk kulstof), reduceres, og testkemikaliets tilgængelighed for orme øges (74). Det er blevet påvist, at *Enchytraeus albidus* og *Eisenia fetida* kan opfylde validitetskriterierne for reproduktion ved test i feltjord med lavere organisk kulstofindhold, f.eks. 2,7 % (33) (61), og erfaringer viser, at dette også kan opnås i syntetisk jord med 5 % tørv.

Fremstilling

De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratoriemixer). Dette gøres ca. en uge, inden testen påbegyndes. De blandede tørre jordbestanddele fugtes med deioniseret vand mindst 48 timer inden tilsætning af testkemikaliets for at ækvilibrere/stabilisere surheden. Til bestemmelse af pH-værdien anvendes en blanding af jord og 1 M KCl-opløsning i forholdet 1:5. Hvis pH-værdien ikke er inden for det krævede interval ($6,0 \pm 0,5$), tilsættes en passende mængde CaCO₃ til jorden, eller en ny batch jord fremstilles.

Den maksimale vandbindingsevne (WHC) for den syntetiske jord bestemmes i overensstemmelse med ISO 11268-2 (35). Mindst to dage inden påbegyndelsen af testen fugtes den tørre syntetiske jord ved at tilsætte så meget deioniseret eller rekonstitueret vand, at ca. halvdelen af det endelige vandindhold opnås. Det endelige vandindhold skal være 40-60 % af den maksimale WHC. Når testen påbegyndes, fordeles den fugtede jord i så mange batches som det anvendte antal testkoncentrationer og kontroller, og fugtindholdet justeres til 40-60 % af WHC_{max} ved hjælp af en opløsning af testkemikaliets og/eller ved at tilsætte deioniseret eller rekonstitueret vand. Fugtindholdet bestemmes ved begyndelsen og slutningen af testen (ved 105 °C). Det skal være optimalt i forhold til artens behov. Fugtindholdet kan også kontrolleres på følgende måde: Når jorden presses forsigtigt i hånden, skal små dråber vand vise sig mellem fingrene.

Opbevaring

De tørre bestanddele i syntetisk jord kan opbevares ved rumtemperatur indtil anvendelse. Den fremstillede og fugtede jord kan opbevares køligt i op til tre dage inden spiking. Fordampningen af vand skal minimeres. Jord, der er tilsat testkemikaliets, anvendes straks, medmindre information indikerer, at den pågældende jord kan opbevares, uden at det påvirker testkemikaliets toksicitet og biotilgængelighed. Prøver af spiked jord opbevares i det tilfælde under de betingelser, der anbefales for det pågældende testkemikaliets, indtil analyse.

Tillæg 5

Arter af terrestriske oligochaeter, der anbefales til test af bioakkumulering fra jord**Regnorm**

Den anbefalede testart er *Eisenia fetida* (Savigny 1826), som tilhører familien Lumbricidae. Siden 1972 har den været opdelt i to underarter (*Eisenia fetida* og *Eisenia andrei* (10)). I henhold til Jaenike (36) er de ægte særskilte arter. *Eisenia fetida* er letgenkendelig på sine lyse, gule striber mellem leddene, mens *Eisenia andrei* er ensartet mørkerød. De stammer sandsynligvis oprindeligt fra området omkring Sortehavet, men findes i dag i hele verden, især i menneskeskabte levesteder, som f.eks. kompostbunker. Begge kan bruges til økotoxikologiske test og bioakkumuleringstest.

Eisenia fetida og *Eisenia andrei* kan fås i handelen, f.eks. som fiskemadding. Sammenlignet med andre lumbricidregnorme har de en kort livscyklus på ca. 2-3 måneder (ved rumtemperatur). Deres optimale temperatur er ca. 20-24 °C. De foretrækker relativt fugtige substrater med næsten neutral pH og et højt indhold af organisk materiale. Da disse arter har været anvendt bredt i standardiserede økotoxikologiske test i omkring 25 år, er deres dyrkning veletableret (48) (77).

Begge arter kan opdrættes i forskellige dyreksekrementer. Som avlsmedium kan anbefales af ISO (35) en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Mediet skal have en pH-værdi på ca. 6-7 (justeret med calciumcarbonat) og en lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration), og det må ikke være uforholdsmæssigt forurenset med ammoniak eller dyreurin. Kommerciel havejord fri for additiver eller syntetisk jord i henhold til OECD (48) eller en lige blanding af de to kan anvendes. Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt. Avlekasser med et rumfang på 10-50 l er passende.

For at få orm af standardalder og -masse er det bedst at starte dyrkningen med kokoner. Voksne orm sættes derfor i en avlekasse, der indeholder frisk substrat, med henblik på producere kokoner. Praktiske erfaringer har vist, at en populationstæthed på ca. 100 voksne orm pr. kg substrat (vådvægt) giver god reproduktion. Efter 28 dage fjernes de voksne orm. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne efter mindst to måneder, men højest efter 12 måneder.

Orm af de arter, der er beskrevet ovenfor, betragtes som sunde, hvis de bevæger sig gennem substratet, ikke forsøger at forlade substratet og formerer sig løbende. Meget langsom bevægelse eller gul bagende (i *Eisenia fetida*s tilfælde) indikerer udtømmelse af substrat. I det tilfælde bør der gives frisk substrat, og/eller antallet af orm pr. beholder bør reduceres.

Yderligere udvalgte referencer

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egele P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

Sims R W og Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London, 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. I: Earthworm Ecology — from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 s.

Enchytraeider

Den anbefalede testart er *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (hvid kompostorm). *Enchytraeus albidus* er en af de største (op til 15 mm) arter af Enchytraeidae-slægten af Oligochaeta (annelida), og den findes i hele verden, f.eks. (8). *Enchytraeus albidus* findes på marine, limniske og terrestriske levesteder, primært i organiske materialer under nedbrydning (tang og kompost) og sjældent i engområder (42). Den brede økologiske tolerance og visse morfologiske variationer indikerer, at arten omfatter forskellige racer.

Enchytraeus albidus sælges som fiskefoder. Det bør undersøges, om bestanden er kontamineret af andre, normalt mindre arter (60). Hvis kontaminering forekommer, bør alle orm skylles med vand i en petriskål. Store voksne individer af *Enchytraeus albidus* udvælges derefter (ved hjælp af stereomikroskop) for at starte en ny bestand. Alle andre orm kasseres.

Ormens livscyklus er kort, da den når sin modenhed mellem 33 dage (ved 18 °C) og 74 dage (ved 12 °C). Kun bestande, der har været i laboratoriet i mindst fem uger (en generation) uden problemer, bør anvendes i en test.

Andre arter af Enchytraeus-slægten kan også anvendes, navnlig *Enchytraeus luxuriosus*. Denne art er en ægte jordinhabitant, som er beskrevet for nylig i (65). Hvis andre arter af *Enchytraeus* anvendes, skal de identificeres klart, og begrundelsen for valget af art skal anføres i rapporten.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) er en art, der tilhører samme gruppe som *Enchytraeus luxuriosus*. Det er ikke med sikkerhed dokumenteret, at den findes i det fri, og er kun blevet beskrevet fra dyrkede regnormebestande og kompostbunker (Römbke 2003). Dens oprindelige økologiske behov kendes derfor ikke. Nylige laboratorieforsøg i forskellige feltjorde har dog bekræftet, at denne art udviser bred tolerance over for jordegenskaber, som f.eks. pH og tekstur (Jänsch et al. 2005). I de senere år er denne art ofte blevet anvendt i økotoksikologiske forsøg på grund af dens ukomplerede formering og test, f.eks. Kuperman et al. 2003). Den er dog lille (3-12 mm; 7 mm i gennemsnit (Westheide & Müller 1996), og det gør den vanskeligere at håndtere end *Enchytraeus albidus*. Hvis denne art bruges i stedet for *Enchytraeus albidus*, kan testbeholderen være mindre, men det er ikke nødvendigt. Det skal desuden tages i betragtning, at denne art reproduceres meget hurtigt og har en generationstid på mindre end 20 dage ved 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) og endda hurtigere ved højere temperaturer.

Enchytraeider af arten *Enchytraeus albidus* (og andre *Enchytraeus*-arter) kan avles i store plastikkasser (f.eks. 30 × 60 × 10 cm eller 20 × 12 × 8 cm, som er egnet til dyrkning af små orm) fyldt med en blanding af syntetisk jord og uforurennet havejord fri for additiver, som fås i handelen. Kompostmateriale bør undgås, da det kan indeholde toksiske kemikalier, som f.eks. tungmetaller. Fauna fjernes fra avlsjorden inden brug ved tredobbelt dybfrysning. Ren syntetisk jord kan også bruges, men reproduktionshastigheden kan være langsommere sammenlignet med hastigheden i blandede substrater. Substratet skal have en pH på 6,0 ± 0,5. Bestanden holdes i en inkubator ved en temperatur på 15 ± 2 °C uden lys. Temperaturer over 23 °C skal undgås. Det syntetiske/naturlige jord bør være fugtigt, men ikke vådt. Når jorden presses forsigtigt i hånden, skal små dråber vand vise sig mellem fingrene. Iltfattige betingelser skal undgås. Hvis der f.eks. bruges et låg, skal der være så mange huller i låget, at der kan ske en tilstrækkelig luftudskiftning. Jorden i avlekassen skal belufes ved at blande den forsigtigt en gang om ugen.

Ormene fodres mindst en gang om ugen ad libitum med havregryn, der anbringes i en fordybning på jordoverfladen og dækkes med jord. Hvis der stadig er foder tilbage i beholderen fra den forrige fodringsdato, tilpasses mængden af foder i overensstemmelse hermed. Hvis der vokser svampe på den resterende foder, erstattes den med en ny portion havregryn. For at stimulere reproduktionen kan havregrynene hver anden uge suppleres med vitaminberiget proteinpulver, som fås i handelen. Efter tre måneder overføres ormene til friskfremstillet dyrknings- eller avlesubstrat. Havregrynene, som skal opbevares i lukkede beholdere, autoklaveres eller opvarmes inden brug for at undgå infektion med melmidder (f.eks. *Glycyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) eller rovmider (f.eks. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Efter desinfektion males foderet, så det nemt kan strøs ud på jordoverfladen. Gær eller fiskefoderet TetraMin® kan også bruges som foder.

Generelt er dyrkningsbetingelserne hensigtsmæssige, hvis ormene ikke forsøger at forlade substratet, bevæger sig hurtigt gennem jorden, har en blank overflade uden fastsiddende jordpartikler eller er mere eller mindre hvide, og hvis der ses orme i forskellige aldre. Orm betragtes faktisk som sunde, hvis de kontinuerligt formerer sig.

Yderligere udvalgte referencer

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W og Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W og Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.